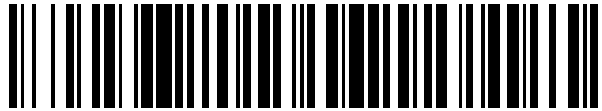


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 436**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2009 E 09797474 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2307538**

54 Título: **Proceso escalable para cultivar células PER.C6 y producir productos a partir de estas**

30 Prioridad:

**15.07.2008 EP 08160392**  
**15.07.2008 US 134992**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.02.2016**

73 Titular/es:

**CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)**  
**Archimedesweg 4**  
**2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**VERSCHUUR, MAARTJE;**  
**YALLOP, CHRISTOPHER, ADAM y**  
**MEIJER, JULIA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 558 436 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Proceso escalable para cultivar células PER.C6 y producir productos a partir de estas

5 La invención se refiere al campo de la biotecnología. En particular, se refiere al cultivo de células humanas. Más particularmente, se refiere al cultivo adherente de células PER.C6.

Antecedentes de la invención

10 Las células de mamífero se cultivan de manera adherente o en suspensión, dependiendo del tipo de célula. Por motivos de escalabilidad, la tendencia es la de adaptar células adherentes a cultivos en suspensión. La capacidad para adaptar muchos tipos celulares al cultivo en suspensión y el uso de aditivos poliméricos para reducir el daño por cizalladura han permitido la aplicación extendida del cultivo en suspensión, que es el sistema de elección para aplicaciones a gran escala (Chu y Robinson, 2001).

15 El aumento de escala de células adherentes es mucho más difícil de lograr y ha dado lugar a una gran cantidad de sistemas de cultivo alternativos. Un sistema particular que permite el aumento de escala de células adherentes son los cultivos con microtransportadores. La ventaja de esta metodología es que las células, cuando crecen en pequeños transportadores, pueden tratarse como un cultivo en suspensión con todas las ventajas de un gran aumento de escala unitario, homogeneidad y condiciones ambientales fácilmente controladas (Griffiths, 2001). Además, los cultivos en microtransportador ofrecen una gran proporción de superficie a volumen que da lugar a rendimientos de alta densidad celular y a un potencial para obtener productos celulares altamente concentrados.

20 Se han producido varios avances en la tecnología de microtransportadores. Se han optimizado la capacidad del grupo de carga y el tamaño de la perla de los microtransportadores para potenciar el crecimiento celular. Se han aplicado materiales de recubrimiento, tales como colágeno/gelatina, vidrio, ProNectin y poli-lisina a las superficies de los microtransportadores. Se han introducido más materiales transportadores de matriz, incluyendo DEAE dextrano, colágeno/gelatina, vidrio, poliestireno, poliacrilamida y celulosa (Kong et al., 1999).

25 Los cultivos de células adherentes se usan ampliamente en la industria biofarmacéutica, por ejemplo, para la producción de factores de coagulación recombinantes (por ejemplo, el documento US 2006/0194289) o la producción de vacunas contra la gripe (Brands et al., 1999). Se usan diferentes líneas celulares en estos procesos incluyendo CHO, BHK, MDCK y Vero (Brühl et al., 2001; Rourou et al., 2007).

30 Hay disponible un gran número de microtransportadores y debe ensayarse la capacidad de las células para proliferar de manera satisfactoria en microtransportadores para cada línea celular.

35 La línea celular humana PER.C6, que se usa para la producción de anticuerpos, vacunas y proteínas recombinantes (Jones et al., 2003; documento WO 00/63403; WO 01/38624), es particularmente adecuada para cultivo en suspensión (Yallop et al., 2005). Sin embargo, para la producción de algunos productos, las células PER.C6 pueden cultivarse preferentemente de manera adherente.

40 Subramanian et al., divulgan el cultivo adherente de PER.C6 en matraces T y la producción de partículas de adenovirus tras la transfección. Subramanian et al también divulga que las células PER.C6 no se unen fácilmente a los sustratos del cultivo celular y las células PER.C6 tuvieron que adaptarse a las condiciones de cultivo adherente. El documento WO 2008/081025 describe el cultivo adherente de células PER.C6 en botellas rotatorias para producir factor XI recombinante. Aunque las células PER.C6 se han cultivado de manera adherente en matraces a pequeña escala, no se han descrito hasta la fecha procesos escalables de cultivo adherente de células PER.C6.

45 La posibilidad de cultivar células PER.C6 de manera adherente combinada con la capacidad para aumentar la escala del cultivo podría ampliar el intervalo de aplicaciones para la línea celular PER.C6.

Sumario de la invención

50 Sorprendentemente, se ha descubierto que las células PER.C6 no se adhieren y crecen bien en la mayoría de microtransportadores disponibles comercialmente en la actualidad salvo para microtransportadores cargados positivamente. Además, las células PER.C6 pueden, sorprendentemente, desprenderse fácilmente de estos transportadores. Esto permite que las células PER.C6 se subcultiven de un biorreactor a otro, lo que es una ventaja para el aumento de escala del proceso.

55 La presente invención proporciona un método para cultivar células PER.C6 de manera adherente que comprende a) unir dichas células a las superficies de uno o más microtransportadores recubiertos con DEAE; y b) cultivar dichas células en medio de cultivo.

60 En otras realizaciones, el método de la invención comprende además una etapa de: c) desprender dichas células de los microtransportadores y posteriormente cultivar adicionalmente dichas células.

En otra realización de la invención dichas células producen un producto. En una realización preferida, dicho producto es una proteína. En otra realización preferida, dicho producto es un factor de coagulación de la sangre.

5 Es también un objeto de la presente invención proporcionar un método para producir un producto por una célula PER.C6, comprendiendo el método de la invención y comprendiendo además una etapa de: d) recoger el producto.

La invención también proporciona un cultivo celular que comprende células PER.C6 unidas a microtransportadores recubiertos con DEAE, en el que dichos microtransportadores están cargados positivamente.

10 Breve descripción de las figuras.

Fig. 1: Una representación de un cultivo, en la que las células no se unieron a los transportadores (referencia al ejemplo 2).

15 Fig. 2: Una representación de un cultivo, en el que las células se distribuyeron de manera no homogénea y tendieron a crecer en grandes cúmulos unidos a uno o más transportadores (referencia al ejemplo 2).

Fig. 3: Una representación de células PER.C6 en microtransportadores Cytodex-1.

Fig. 4: Crecimiento de células PER.C6 en microtransportadores Cytodex-1 cargados positivamente.

20 Fig. 5: Concentraciones de metabolitos en cultivo de células PER.C6 creciendo de manera adherente en microtransportadores Cytodex-1.

Fig. 6: Concentraciones de metabolitos en cultivo de células PER.C6 creciendo de manera adherente en microtransportadores Cytopore-1.

Fig. 7: Concentraciones de metabolitos en cultivo de células PER.C6 creciendo de manera adherente en microtransportadores Cytopore-2.

25 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con estos y otros objetos, la presente invención proporciona métodos para cultivar de manera adherente células PER.C6, que comprenden las etapas de unir dichas células a las superficies de microtransportadores cargados positivamente, cultivar dichas células en medio de cultivo celular, desprender dichas células de los microtransportadores y cultivar adicionalmente dichas células.

30 Las "células adherentes" son células, incluyendo células de mamífero que se unen a la superficie, por ejemplo, una superficie de matraz de cultivo tisular o una superficie de una partícula microtransportadora, para replicar en cultivo tisular.

35 Las células de la invención proceden de células HER inmortalizadas en E1, tales como células PER.C6. Las células PER.C6 para los fines de la presente solicitud se han descrito en la Patente de Estados Unidos 5.994.128 y debe significar células de un pase aguas arriba o aguas abajo o un descendente de un pase aguas arriba o aguas abajo de células, tal como se ha depositado con el n.º ECACC 96022940.

40 "Microtransportadores" se refiere a partículas, perlas o gránulos útiles para la unión y crecimiento de células adherentes en cultivo. Los microtransportadores tienen las siguientes propiedades: (a) Son lo suficientemente pequeños para permitir su uso en cultivos en suspensión (con una velocidad de agitación que no provoca un daño por cizalladura significativo a los microtransportadores o a las células); (b) Son sólidos, o tienen un núcleo sólido con un recubrimiento poroso en la superficie; y (c) Sus superficies (superficie exterior e interior en caso de transportadores porosos) pueden estar cargadas o no positivamente. Los microtransportadores pueden, por ejemplo, pero sin limitación, estar basados en poliestireno, celulosa, polietileno o dextrano, lo que significa que la matriz de los transportadores puede estar formada de diferentes materiales, por ejemplo, poliestireno, celulosa, polietileno o dextrano. Además, los microtransportadores pueden recubrirse con un factor de adhesión, tal como gelatina, fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina o tenascina. Estas características distintivas influyen en la capacidad de unión de diferentes tipos celulares a los microtransportadores y la capacidad de las células para crecer en microtransportadores.

55 En un aspecto, los microtransportadores tienen un diámetro general de partícula de entre aproximadamente 150 y 350 µm. En un aspecto, tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 3,0 meq/g. La carga positiva la proporcionan los grupos de DEAE (N,N,-dietilaminoetil). También puede proporcionarse la carga positiva por otros grupos, por ejemplo, se sabe que los grupos DEAE también se usan en cromatografía de intercambio aniónico, donde también se usan grupos con carga positiva alternativos, tales como grupos de amonio cuaternario. Por lo tanto también es posible que dichos grupos positivos alternativos puedan acoplarse también a microtransportadores y usarse de acuerdo con la invención. Los microtransportadores útiles están disponibles comercialmente, por ejemplo, con el nombre Cytodex 1, Cytopore 1 y Cytopore 2 (de GE Healthcare). En determinadas realizaciones, el microtransportador es un transportador sólido (por ejemplo, Cytodex-1). La partícula transportadora también puede ser un microtransportador poroso (por ejemplo, Cytopore 1 y Cytopore 2).

65 En la presente invención, se ensayaron diferentes líneas celulares respecto de su capacidad para adherirse a varios tipos de microtransportadores comercialmente disponibles. Se descubrió que las células CHO pueden cultivarse satisfactoriamente en todos los tipos de microtransportadores ensayados. Por el contrario, las células PER.C6 no

5 pudieron unirse a ninguno de estos microtransportadores, a excepción de los microtransportadores cargados positivamente. De hecho, se ha descubierto sorprendentemente que las células PER.C6 pueden unirse exclusivamente a microtransportadores cargados positivamente. Los microtransportadores usados de acuerdo con el método de la invención están por lo tanto cargados positivamente. Los microtransportadores, que se unen a células PER.C6, comprenden una matriz de dextrano reticulada que se sustituye con grupos de N,N-dietilaminoetilo (DEAE) cargados positivamente. Los grupos cargados se distribuyen a lo largo de la matriz del microtransportador. En el presente documento se cita a un microtransportador que comprende una matriz reticulada de dextrano como "basado en dextrano". En otras realizaciones de la presente invención, los microtransportadores cargados positivamente están "basados en celulosa". En determinadas realizaciones, los microtransportadores no están recubiertos con un factor de adhesión.

15 El método de la invención permite cultivar células adherentes en medio de cultivo convencional (GE Healthcare, Macrocarrier cell culture. Principles and methods. 18-1140-62). En realizaciones preferidas, el medio contiene suero. El suero, que se usa para suplementar el medio de cultivo, puede proceder de una diversidad de fuentes, y se usa a concentraciones en el intervalo del 0,1 % al 30 % (v/v). El suero cumple varias funciones. En primer lugar, ayuda a las células a unirse a la superficie de cultivo. En segundo lugar, los factores de crecimiento y las hormonas en el suero promueven la proliferación celular. El suero también tiene un efecto protector en las células y productos. Una función adicional del suero es proporcionar inhibidores de proteasas que inactiven a enzimas proteolíticas usadas en el subcultivo rutinario.

20 Las células se cultivan en recipientes convencionales, tales como matraces de agitación, botellas rotatorias y similares. Se encuentra dentro del conocimiento de un experto en la materia la selección del medio y de las condiciones de crecimiento óptimas, tales como suplementos del medio, suero, temperatura, pH, velocidad de agitación, concentración del microtransportador, etc. (GE Healthcare. Macrocarrier cell culture. Principles and methods. 18-1140-62). La concentración del microtransportador al comienzo del cultivo celular se encuentra preferentemente en el intervalo de 1-2 g/l. La densidad celular del cultivo se encuentra preferentemente en entre 0,1 y 0,3 millones de células viables por ml.

30 Para aumentar la escala del proceso, se prefiere que las células adherentes puedan desprenderse de los transportadores y subcultivarse en un volumen mayor. Las células adherentes pueden, por ejemplo, desprenderse de los transportadores mediante la adición de enzimas proteolíticas, tales como, sin limitación, dispasa, colagenasa o tripsina al medio. En determinadas realizaciones, la enzima proteolítica de acuerdo con la invención es tripsina.

35 Sorprendentemente, se descubrió que tras la adición de tripsina, las células PER.C6 se desprenden fácilmente de los microtransportadores cargados positivamente. Esto era en gran medida inesperado teniendo en consideración el hecho de el fabricante específica que estos transportadores específicos se unen fuertemente a las líneas celulares y que por lo tanto estos se usan ampliamente como transportadores para las etapas finales de la producción (GE Healthcare. Macrocarrier cell culture. Principles and methods. 18-1140-62).

40 De acuerdo con una realización preferida de la invención, las células adherentes pueden desprenderse de los transportadores y transferirse a un envase con un volumen mayor. En una realización preferida, las células vuelven a unirse a los microtransportadores y se cultivan adicionalmente. Esta realización permite el uso de las células adherentes en un proceso industrial, lo que normalmente requiere de varias etapas de aumento de escala.

45 Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de un producto por células PER.C6 adherentes que comprende las etapas de unir las células PER.C6 a la superficie de los microtransportadores, cultivar dichas células en medio de cultivo, en el que el producto se libera por dichas células y posteriormente se recoge el producto producido.

50 De acuerdo con una realización del método, el producto producido por las células adherentes de la invención puede ser una proteína, como por ejemplo, pero sin limitación, factores de coagulación de la sangre (por ejemplo, factor V, VIII, IX, X, XI, factor V resistente a APC). Para la producción de proteínas, las células de la invención comprenden sustancialmente ácido nucleico, que codifica a dichas proteínas, en asociación operativa con elementos capaces de dirigir la expresión de dichas proteínas (véase, por ejemplo, el documento WO 00/63403).

55 Además, las células adherentes de la invención pueden usarse para la producción de virus por las células (véase, por ejemplo, el documento WO 01/38362), ya que algunos virus pueden infectar a células de manera más eficaz cuando las células son adherentes. Por lo tanto, un producto producido mediante los métodos de la invención puede ser en algunas realizaciones un virus.

60 Los expertos en la materia conocen métodos para recoger y purificar adicionalmente el producto, quienes son capaces de diseñar un proceso aguas abajo adecuado para recuperar dicho producto a partir de una suspensión celular.

65 La presente invención, por primera vez, divulga células PER.C6 unidas a microtransportadores. Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona un cultivo celular de células PER.C6 adherentes unidas a microtransportadores,

en el que dichos microtransportadores están cargados positivamente. En determinadas realizaciones, dichos microtransportadores están basados en dextrano. En otras realizaciones, dichos microtransportadores están basados en celulosa. Dichos cultivos celulares pueden usarse en procesos de acuerdo con la invención y, por ejemplo, en el aumento de escala.

De acuerdo con la invención, dicho cultivo celular comprende medio de cultivo y los microtransportadores. Se encuentra dentro del conocimiento del experto en la materia la selección de los componentes del medio adecuados para permitir un crecimiento celular y una producción de producto máximos (GE Healthcare. Macrocarrier cell culture. Principles and methods. 18-1140-62). En una realización concreta, el medio contiene suero. Los componentes del suero pueden tener una función protectora para los productos que tienden a ser inestables, por ejemplo, anticuerpos o factores de coagulación de la sangre (por ejemplo, factor V, VII, IX, X, XI, factor V resistente a APC). El cultivo celular puede comprender además producto producido por las células.

Habiendo descrito de manera general la presente invención, la misma se entenderá por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan en el presente documento con fines únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo de células CHO en microtransportadores usados de manera común.

Se ensayó la capacidad de las células CHO para adherirse a varios microtransportadores incluyendo Cytodex-1 y Cytodex-3 (GE Healthcare); 2D Microhex y Biosilon (Nunc); HyQsphere CGEN 102-L, Pro-F 102-L, P102-L, Fact 102-L (Hyclone). Las células CHO se cultivaron en dichos microtransportadores de acuerdo con métodos convencionales. La cantidad de transportadores recomendada por los fabricantes (1-20 g/l) se esterilizó, se lavó con medio de cultivo y se incubaron en configuraciones adecuadas en matraces rotatorios durante 30 min. Las células, que se obtuvieron mediante tripsinización de cultivos en matraces T, se inocularon a una densidad de  $0,1-0,2 \times 10^6$  células/ml, según se recomienda por el fabricante. Las células se cultivaron en matraces de agitación que contenían 75 ml de medio de DMEM:F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % en un incubador humidificado a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % y 30 rpm. El cultivo de células CHO-K1, unidas a los microtransportadores anteriormente mencionados, se llevó a cabo de manera satisfactoria. En todos los casos, las células se unieron bien a los transportadores, se logró el crecimiento en confluencia en los transportadores y se obtuvieron cultivos homogéneos.

Ejemplo 2: Cultivo de células PER.C6 en microtransportadores usados de manera común.

Se ensayaron células PER.C6 en microtransportadores similares a los del ejemplo anterior (tabla 1), de acuerdo con el mismo protocolo. Parecía que las células PER.C6 no podían cultivarse satisfactoriamente en ninguno de los siguientes transportadores: Cytodex-3 (GE Healthcare); 2D Microhex y Biosilon (Nunc); HyQsphere CGEN 102-L, Pro-F 102-L, P102-L, Fact 102-L (Hyclone). En algunos casos, las células no se unieron al transportador (se muestra una representación de dicho cultivo en la fig. 1), y en otros casos, las células no se distribuyeron de manera homogénea y tendieron a crecer en grandes cúmulos unidos a uno o más transportadores (se muestra una representación de dicho cultivo en la fig. 2).

Ejemplo 3: Cultivo satisfactorio de células PER.C6 en microtransportadores cargados positivamente.

También se ensayaron células PER.C6 en microtransportador cargado positivamente (Cytodex-1) de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1. Las células crecieron hasta la confluencia en aproximadamente 4-5 días (se muestra un cultivo no confluyente en el día 3 en la fig. 3) y se logró una homogeneidad suficiente del cultivo (es decir, las células se distribuyeron de manera uniforme sobre los microtransportadores). Se ensayaron cuatro líneas celulares PER.C6 diferentes que expresaban diferentes glucoproteínas. Todas se cultivaron satisfactoriamente en microtransportadores cargados positivamente.

Ya que las células se adhieren fuertemente a microtransportadores cargados positivamente, el uso de este tipo de transportadores el fabricante los recomienda para el cultivo de producción final (GE Healthcare. Macrocarrier cell culture. Principles and methods. 18-1140-62). Se ensayó la posibilidad de desprender células viables de estos microtransportadores y de hecho, las células CHO no podían desprenderse de los microtransportadores cargados positivamente.

Sorprendentemente, se descubrió que las células PER.C6 podían desprenderse de los transportadores cargados positivamente mediante tripsinización.

Tabla 1. Resumen de los resultados de los ejemplos 1, 2 y 3.

Descripción del microtransportador		Resultados propios con Crucell	
Nombre	Carga	PER.C6	CHO
2D Microhex	Sí (-)	-	+
Cytodex-1	Sí (+)	+	+

Descripción del microtransportador		Resultados propios con Crucell	
Cytodex-3	No	-	+
Biosilon	Sí (-)	-	+
HyQSphere CGEN 102L	No	-	+
HyQSphere Pro-F 102L	No	-	+
HyQSphere P102L	No	-	+

En general, puede concluirse que las células PER.C6 no crecen bien en la mayoría de microtransportadores comercialmente disponibles en la actualidad salvo para los microtransportadores cargados positivamente. Además, las células PER.C6 pueden desprenderse de estos transportadores mediante tripsinización. Esto permite el subcultivo y por lo tanto el aumento de escala del proceso, lo que es necesario para un proceso industrial.

Aparte del microtransportador cargado positivamente Cytodex-1, se ensayaron dos microtransportadores cargados positivamente macroporosos (Cytopore-1 y Cytopore-2) y se demostró que las células PER.C6 podían cultivarse satisfactoriamente en estos microtransportadores cargados positivamente alternativos. Las figuras 5, 6 y 7 muestran el consumo de glucosa y la producción de lactato de células PER.C6 que crecen de manera adherente en microtransportadores macroporosos cargados positivamente. La disminución en la concentración de glucosa y el aumento en la producción de lactato después de cada pase demuestran que las células PER.C6 se cultivaron satisfactoriamente en estos microtransportadores.

Ejemplo 4: Cultivo por lotes de células PER.C6 en transportadores cargados positivamente en matraces rotatorios.

En este ejemplo, se cultivaron células PER.C6 sobre transportadores cargados positivamente en matraces rotatorios. Las células se inocularon a una densidad de 0,1-0,2x10E6 células/ml en medio DMEM suplementado con FBS al 10 %. En el momento de la inoculación, cada perla contenía entre 10 y 90 células, tal como se muestra en la Fig. 4. Después de 9 días, se alcanzaron concentraciones celulares de aproximadamente 5x10E6 cv/ml, con aproximadamente 1000 células/perla (cultivo en confluencia). Se obtuvieron cultivos celulares satisfactorios en intervalos amplios de los parámetros operativos convencionales, tales como la velocidad del agitador (20-80 rpm) y volumen de trabajo (150-250 ml).

Ejemplo 5: Cultivo por lotes de células PER.C6 sobre transportadores cargados positivamente en biorreactores.

Se cultivaron células PER.C6 sobre transportadores cargados positivamente en biorreactores de 2 l. Las células se cultivaron satisfactoriamente. Las células se unieron bien a los transportadores, lográndose el crecimiento confluyente sobre los transportadores y se obtuvieron cultivos homogéneos.

Ejemplo 6: Producción de proteínas recombinantes por células PER.C6 sobre transportadores cargados positivamente.

Se midieron los niveles de producción de varios productos producidos por células PER.C6 sobre microtransportadores cargados positivamente (en matraces agitados). Se descubrió que los niveles de producción de estas proteínas estaban en el intervalo de niveles obtenidos previamente en sistemas de referencia (matraces T). Los niveles de producción de las proteínas de factor V en transportadores cargados positivamente (en matraces agitados) fueron de entre 1000-2000 ng/ml, comparado con los 1500-3000 ng/ml en un matraz T. Los niveles de producción de proteínas de factor XI sobre los mismos microtransportadores (en matraces agitados) fueron de entre 7000-12000 ng/ml, en comparación con aproximadamente 15000 ng/ml en un matraz T.

Ejemplo 7: Proceso previsto.

Basándose en los resultados descritos se propone el proceso siguiente. Se aumenta la escala de cultivos previos de células PER.C6 adherentes hasta escala de producción usando microtransportadores Cytodex. Posteriormente, la producción (de por ejemplo, proteínas recombinantes) se lleva a cabo en uno o varios cultivos repetidos por lotes (por ejemplo, 3-6) con cambio de medio. Para esta etapa final de producción, se usan los microtransportadores Cytodex-1. Como alternativa, pueden usarse también microtransportadores macroporosos. Esto puede ser ventajoso ya que pueden alcanzarse densidades celulares mayores, y se ha observado que el crecimiento de las células PER.C6 en estos transportadores era prometedor. Sin embargo, debido a que las células no pueden desprenderse de estos transportadores, no son adecuados para las etapas intermedias de precultivo/aumento de escala.

Referencias

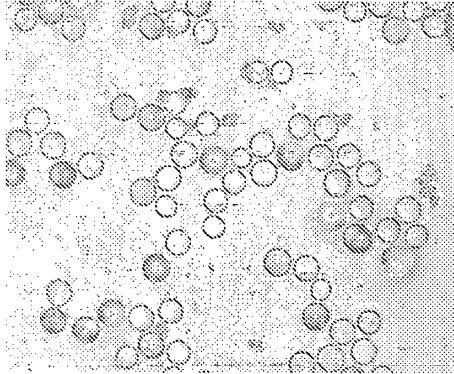
Brands et al. Influvac: A safe madin darby canine kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine in Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM: Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture, Dev Biol Stand. Basel, Karger, 1999, vol 98, págs. 93-100.

- Brühl P, Kerschbaum A, Kistner O, Barrett N, Dorner F, Gerencer M. Humoral and cell-mediated immunity to Vero cell-derived influenza vaccine. *Vaccine* 19 (2001) 1149-1158.
- 5 Chu L, y Robinson, D. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology* 2001, 12: 180-187.
- Griffiths B. Scale-up of suspension and anchorage-dependent animal cells. *Molecular Biotechnology*, Volume 17, 2001.
- 10 Jones D, Kroos N, Anema R, van Montfort B, Vooy's A, van der Kraats S, van der Helm E, Smits S, Schouten J, Brouwer K, Lagerwerf F, van Berkel P, Opstelten DJ, Logtenberg T, Bout A. High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. *Biotechnol Prog.* 2003 Jan-Feb; 9(1):163-8.
- 15 Kong D, Chen M, Gentz R y Zhang J. Cell growth and protein formation on various microcarriers. *Cytotechnology* 29: 149-156, 1999.
- Rourou S, Van der Ark A, Van der Velden T, Kallel H. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. *Vaccine* 25 (2007) 3879-3889.
- 20 Subramanian Shyamsundar et al: "Scalable production of adenoviral vectors by transfection of adherent PER.C6 cells." *BIOTECHNOLOGY PROGRESS*, vol. 23, no. 5.
- 25 Yallop C, Crowley J, Cote J, Hegmans-Brouwer K, Lagerwerf F, Gagne R, Martin JC, Oosterhuis N, Opstelten DJ, Bout A. Per.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins. *Modern Biopharmaceuticals - Design, Development and Optimization*. Vol. 3, 2005.

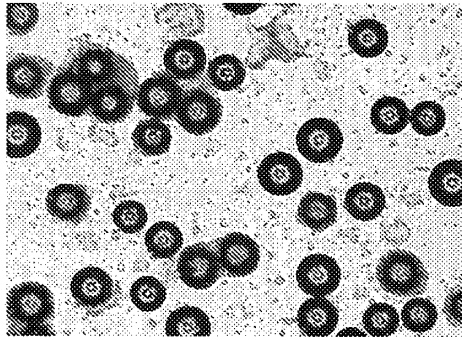
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para cultivar de manera adherente células PER.C6 depositadas con el n.º ECACC 96022940 que comprende:
- a) unir células PER.C6 a microtransportadores recubiertos con DEAE; y  
b) cultivar dichas células en medio de cultivo.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de:
- c) desprender dichas células de los microtransportadores y posteriormente cultivar adicionalmente dichas células.
- 15 3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos microtransportadores están basados en dextrano.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas células producen un producto.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho producto es una proteína.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho producto es un factor de coagulación de la sangre.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 6, que además comprende una etapa de:
- 25 d) recoger el producto.
8. Un cultivo que comprende células PER.C6 depositadas con el n.º 96022940 unidas a microtransportadores recubiertos con DEAE.

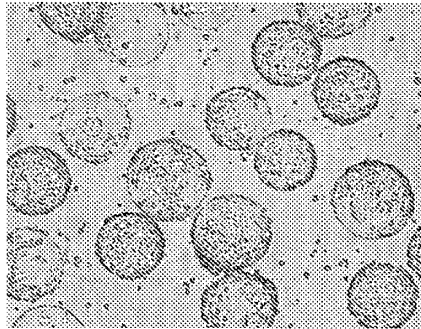




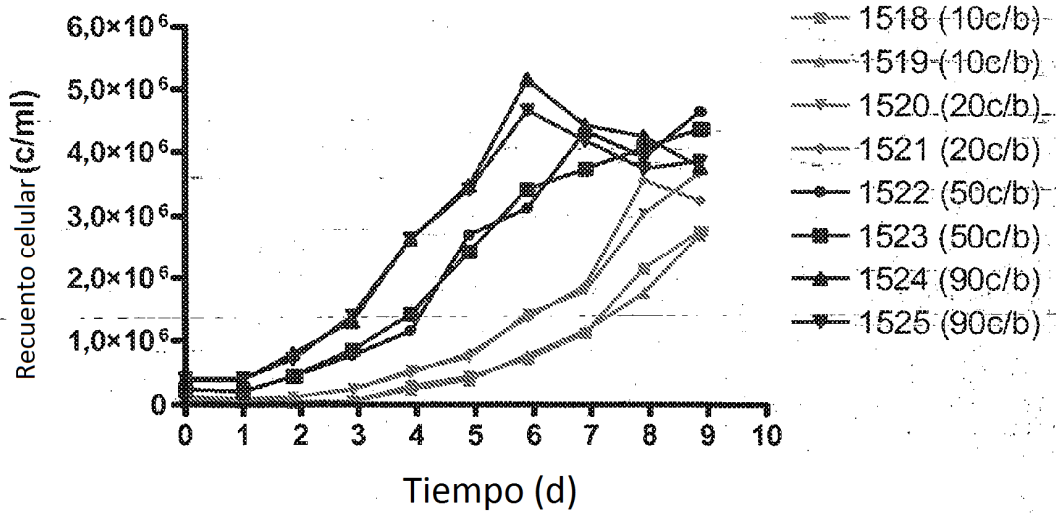
**Fig. 1**



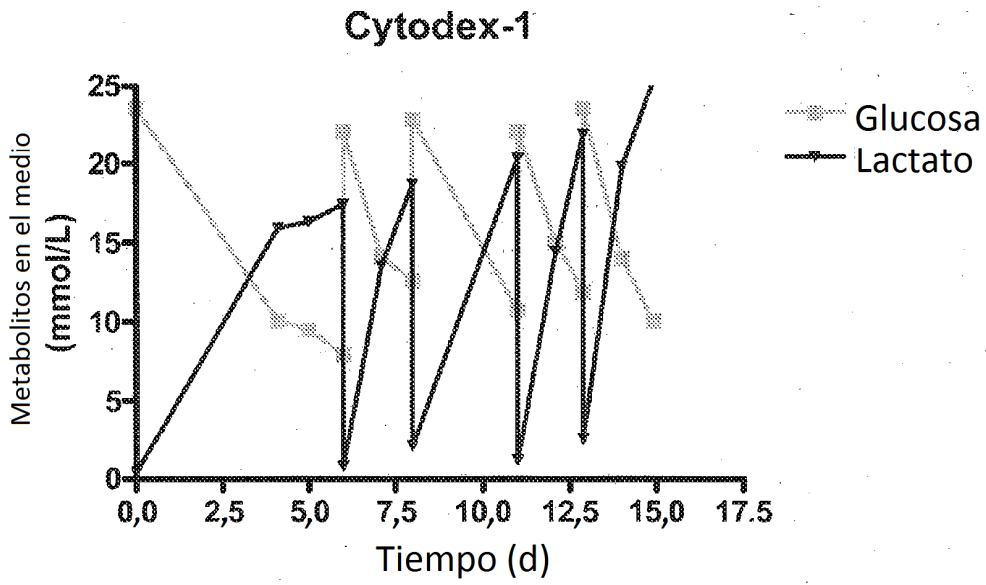
**Fig. 2**



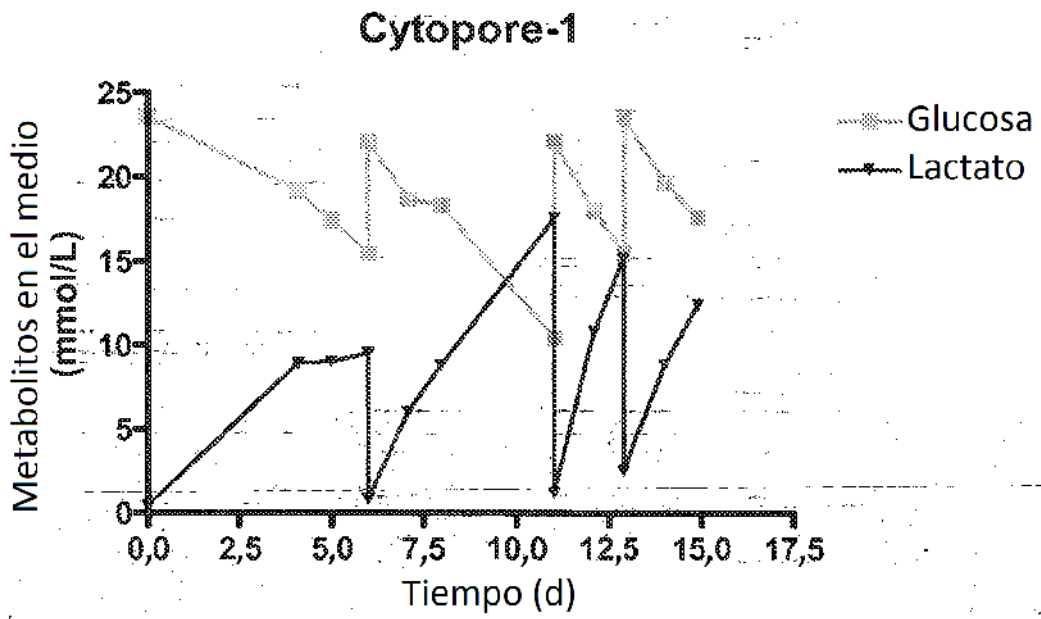
**Fig. 3**



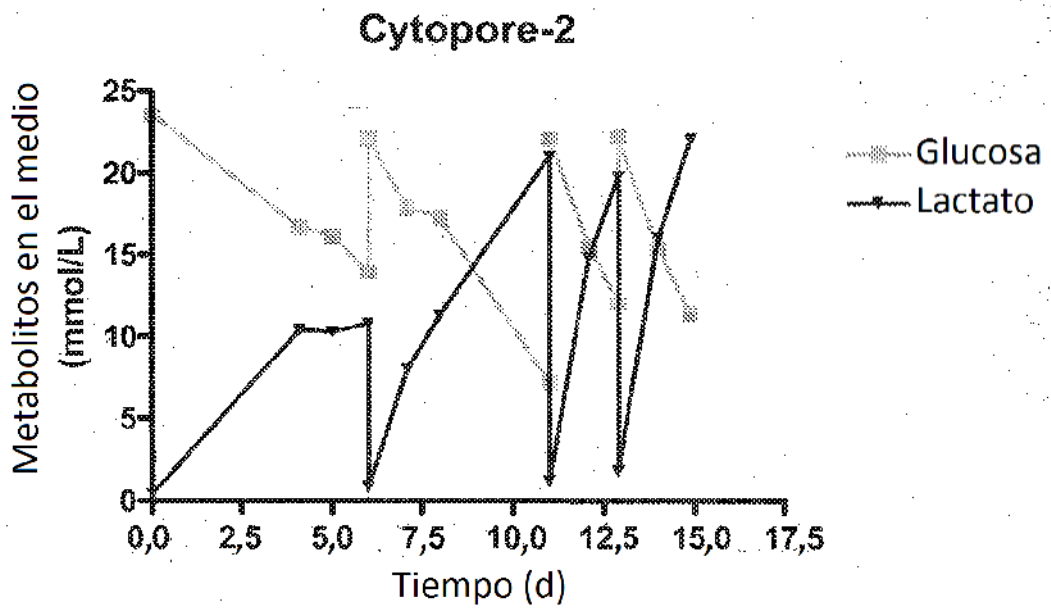
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**