



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 236 799**

⑤① Int. Cl.⁷: **C12N 5/06**
C12N 7/00
A61K 39/145

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **97915628 .8**

⑧⑥ Fecha de presentación: **01.04.1997**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0891420**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.1999**

⑤④ Título: **Procedimiento de replicación de virus de influenza en un cultivo celular y virus de influenza obtenibles por el procedimiento.**

③⑩ Prioridad: **01.04.1996 DE 196 12 967**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2005

⑦③ Titular/es: **Chiron Behring GmbH & Co.**
Postfach 1630
35006 Marburg, DE

⑦② Inventor/es: **Gröner, Albrecht**

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento de replicación de virus de influenza en un cultivo celular y virus de influenza obtenibles por el procedimiento.

La presente invención se refiere a procedimientos para la replicación de virus de influenza en cultivo de células a temperaturas reducidas, y a los virus de influenza obtenibles por el procedimiento descrito y a las vacunas que puedan contener virus de este tipo o constituyentes de los mismos.

Todas las vacunas para la influenza que han sido usadas desde los años 40 hasta el presente como vacunas permitidas para el tratamiento de seres humanos y animales están constituidas por una o más cepas del virus que han sido repicadas en huevos embrionados de gallina. Estos virus son aislados del fluido alantoideo de los huevos de las gallinas infectadas y sus antígenos son usados como vacuna, como partículas de virus intactas o como partículas de virus desintegradas por detergentes y/o solventes -así llamadas vacunas fraccionadas- o como proteínas definidas del virus aisladas -así llamadas vacunas de subunidad. En todas las vacunas permitidas, los virus son inactivados por procedimientos conocidos por las personas expertas en la técnica. Aún la replicación de virus vivos atenuados, los que son evaluados en vacunas experimentales, se lleva a cabo en huevos embrionados de gallina.

El uso de huevos embrionados de gallina, para la producción de vacunas demanda mucho tiempo, trabajo resulta costoso. Los huevos de gallineros de gallinas sanas, controladas por veterinarios, deben ser incubados antes de la infección, los huevos deben ser seleccionados en relación a los embriones vivos, dado que sólo estos huevos son adecuados para la replicación del virus. Tras la infección, los huevos son incubados nuevamente, habitualmente durante 2 a 3 días. Los embriones aún vivos en este momento, son matados con frío y se obtiene el fluido alantoideo de cada huevo individualmente por aspiración. Mediante procedimientos laboriosos de purificación se separan sustancias de los huevos de las gallinas que llevan a efectos indeseados de las vacunas, de los virus, y éstos son concentrados. Como los huevos no son estériles (libres de patógenos), es necesario también remover y/o inactivar pirógenos y todos los patógenos posiblemente presentes. Para aumentar el rendimiento de virus, la replicación de los virus de influenza en huevos de gallina, ésta es llevada a cabo por regla general a temperaturas reducidas (alrededor de 34°C). Aún los virus que pueden provocar enfermedades respiratorias pueden ser replicados en cultivo celular. También aquí, en algunos casos se usan temperaturas reducidas (alrededor de 33°C), las que sin embargo no afectan la calidad de la vacuna obtenida, sólo favorecen la replicación.

Los virus de otras vacunas, como por ejemplo el virus de la rabia, paperas, sarampión y rubéola, polio y meningoencefalitis (FSME) pueden ser replicados en cultivos celulares. Como los cultivos celulares originados de bancos de células evaluados están libres de patógenos, en contraste con los huevos de gallina, son un sistema definido de replicación que (teóricamente) está disponible en cantidades casi ilimitadas, hacen posible la replicación de virus de manera económica bajo ciertas circunstancias, aún en el caso de los virus de influenza. Es posible conseguir una producción económica de vacunas además por el hecho de que el aislamiento y purificación desde un medio estéril de un cultivo celular definido parece ser más simple que el realizado desde el fluido alantoideo, con su alto contenido proteico.

El aislamiento y replicación de virus de influenza en huevos lleva a una selección de ciertos fenotipos, la mayoría de los cuales difieren del aislamiento clínico. En contraste con esto, en el aislamiento y replicación de virus en cultivos celulares no ocurre ninguna selección dependiente de las etapas (Oxford, J.S. y col., J. Gen. Virology 72 (1.991), 185-189; Robertson, J.S. y col., J. Gen. Virology 74 (1.993) 2.047-2.051). Por lo tanto, la replicación de virus en cultivos celulares es también de preferencia frente a aquella en huevos en relación a este aspecto, para obtener vacunas efectivas. Es sabido que los virus de influenza pueden ser replicados en cultivos celulares. Frente a las células embrionadas de gallina y células de hámster (BHK21-F y HKCC), se ha descrito que las células MDBK, y en particular MDCK son apropiadas para la replicación *in vitro* de virus de la influenza (Kilbourne, E. D., en: Influenza, páginas 89-110, Plenum Medical Book Company - New York and London, 1.987). Un requisito previo para una infección exitosa es el agregado de proteasas al medio de infección, de preferencia tripsina o serino proteasas similares, ya que estas proteasas fraccionan extracelularmente al precursor de hemaglutinina [HA₀] dando lugar a hemaglutinina activa [HA₁ y HA₂]. Solamente la hemaglutinina fraccionada lleva a la adsorción de los virus de influenza en las células con la subsecuente asimilación del virus dentro de la célula (Tobita, K. y col., Med. Microbiol. Immunol., 162 (1.975), 9-14; Lazarowitz, S.G. & Choppin, P.W., Virology, 68 (1.975) 426-439) y de este modo a un posterior ciclo de replicación del virus en el cultivo celular.

La patente US 4.500.513 describe la replicación de virus de influenza en cultivos celulares de células de crecimiento adherente. Después de la proliferación celular, el medio nutritivo es eliminado y se añade medio nutritivo fresco a las células, y la infección de las células con virus de influenza tiene lugar simultáneamente o apenas después. A un tiempo determinado después de la infección se agrega proteasa (por ejemplo tripsina) con el objeto de obtener una replicación viral óptima. Los virus son recolectados, purificados y procesados para obtener vacunas inactivadas o atenuadas. La replicación de manera económica del virus de la influenza como un requisito previo para la producción de vacunas no puede ser cumplida, de cualquier manera, usando la metodología descrita en la mencionada patente, como el cambio de medio, la infección subsecuente, así como la adición de tripsina, la que es llevada a cabo más tarde, requiere que los recipientes de cultivo celular sean abiertos en varias oportunidades lo que resulta una tarea muy laboriosa. Además, el peligro de contaminación del cultivo celular por microorganismos y virus indeseables aumenta con cada manipulación de los recipientes de cultivo. Una alternativa más productiva en relación al costo es la proliferación celular en sistemas fermentadores conocidos por las personas expertas en la técnica, las células de crecimiento adherente en microporta-

dores. El suero necesario para el crecimiento de las células en los microportadores (usualmente suero fetal de bovino), de cualquier manera, contiene inhibidores de tripsina, de manera tal que aún con este método de producción es necesario un cambio del medio por medio libre de suero para lograr el fraccionamiento de la hemaglutinina de influenza por la tripsina y de esta manera una replicación de virus adecuadamente alta. De este modo esta metodología también requiere la apertura de los recipientes de cultivo varias veces y así trae consigo el peligro aumentado de contaminación. En la patente US 4.500.513, la replicación viral se lleva a cabo a 34-37°C. De manera similar, Mancini & Yano [Rev. Farm. Bioquím. Univ. S.Paulo (1.993) 29: 89-95] describen un procedimiento de cultivo celular para influenza en el que el virus es replicado a 35°C. Estos autores usaron células MDCK cultivadas en un medio Eagle suplementado con suero fetal de bovino y neomicina. La tripsina fue agregada a las células cultivadas después de la infección con el virus de influenza.

El objetivo de la presente invención es crear procedimientos disponibles que hagan posible la replicación del virus de influenza en cultivo celular simple y económica y que permita obtener vacunas altamente eficaces.

Este objetivo se logra con la provisión de las formas de realización indicadas en las reivindicaciones de patente.

La invención de esta manera, se refiere a un procedimiento para la replicación de virus de influenza en cultivo celular, cuyas células, las que pueden ser infectadas por el virus de influenza son cultivadas en cultivo celular, las células son infectadas con virus de influenza y luego de la infección cultivadas a temperatura en el intervalo de 30 a 36°C para la replicación viral. Antes o durante la infección con el virus de influenza, se agrega una proteasa al cultivo celular. Mayores detalles del tratamiento con proteasa se exponen a continuación.

En una forma de realización de preferencia del procedimiento de acuerdo a la invención, el cultivo de las células infectadas para replicación viral se lleva a cabo de 32 a 34°C y particularmente de preferencia a 33°C.

Se ha encontrado sorprendentemente que replicando los virus de influenza en células infectadas a temperaturas reducidas, los virus obtenidos tienen una eficacia apreciablemente mayor como vacuna que aquellos virus que se obtienen por replicación a 37°C. La replicación a 37°C, la temperatura clásicamente usada para replicación de influenza en cultivo celular, lleva a rendimientos de virus comparativamente altos en un tiempo corto. De cualquier manera, los virus producidos de este modo tienen una eficacia baja como vacuna en comparación con los virus preparados por el procedimiento de acuerdo a la invención.

Las células que son usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención para la replicación de virus de influenza pueden en principio ser de cualquier tipo celular deseado que pueda ser cultivado en cultivo celular y que pueda ser infectado por virus de influenza. Pueden ser tanto células de crecimiento adherente o células de crecimiento en suspensión.

En una forma de realización de preferencia, las células son células de vertebrado, en particular, células de ave y en este contexto de preferencia células de gallina, por ejemplo, células embrionadas de gallina (células CEF).

En una posterior forma de realización de preferencia, las células son células de mamífero, por ejemplo, hámster, ganado vacuno, mono o células de perro. Se usan de preferencia células de riñón o líneas celulares derivadas de éstas. Ejemplos de células de hámster apropiadas son las líneas celulares con los nombres BHK21-F o HKCC. Las células de mono posibles son, por ejemplo, células VERO, y las células de ganado vacuno posibles son las de línea celular MDBK. Un ejemplo de una línea celular de riñón adecuada es la línea celular MDCK (ATCC CCL34 MDCK (NBL-2)) de riñones de perro. En el contexto de la presente invención se estableció una línea celular de la línea celular MDCK de riñón mencionada anteriormente, la que está adaptada al crecimiento en suspensión en un medio libre de suero y por ello hace posible un cultivo y una replicación viral particularmente simples y eficientes. Esta línea celular, MDCK 33016, es usada particularmente de preferencia en el procedimiento de acuerdo con la invención. Fue depositada bajo el número de depósito DSM ACC 2219 el 7 de junio de 1.995 de acuerdo a los requerimientos de la convención de Budapest de reconocimiento de depósito de microorganismos para los propósitos de patentamiento en la colección alemana de microorganismos (DSM) en Brunswick (República Federal Alemana), la que es reconocida como un sitio de depósito internacional.

Para cultivar las células en el procedimiento con la invención, pueden ser usados para el cultivo celular los métodos habituales conocidos por las personas expertas en el tema, en particular aquellos que ya son conocidos para la replicación de virus de influenza en cultivos celulares. El llevar a cabo los procedimientos de acuerdo con la invención usando células que crecen en suspensión, en particular aquellas que pueden ser cultivadas en medios libres de suero, hace posible una replicación de virus particularmente simple y eficiente. El cultivo de células en suspensión puede ser llevado a cabo en este caso en un procedimiento en lote o en un sistema de perfusión, por ejemplo en un recipiente fermentador agitado, usando los sistemas de retención celular conocidos por la persona experta en la técnica, como por ejemplo centrifugación, filtración, filtros spin y similares.

El cultivo de las células se lleva a cabo por regla general a un pH regulado de preferencia en el intervalo desde pH 6,6 hasta pH 7,8, en particular en el intervalo de pH 6,8 a pH 7,3.

Además, el valor de pO₂ puede ventajosamente ser regulado y es luego por regla general entre 25% y 95%, en particular entre 35% y 60% (basado en la saturación del aire).

ES 2 236 799 T3

La infección de las células cultivadas en suspensión es llevada a cabo, de preferencia, cuando las células en el procedimiento de lote han alcanzado una densidad celular de alrededor de $8 \text{ a } 25 \times 10^5$ células/ml o alrededor de $5 \text{ a } 20 \times 10^6$ células/ml en el sistema de perfusión. Si se usan células de crecimiento adherente, la densidad celular óptima para la infección depende de la línea celular en particular.

La infección de las células con virus de influenza es llevada a cabo de preferencia a m.d.i. (multiplicidad de infección) de alrededor de 0,0001 a 10, de preferencia de 0,002 a 0,5.

El agregado de una proteasa para lograr dar el fraccionamiento de la proteína precursora de hemaglutinina [HA₀] y de esta manera permitir la adsorción de los virus a las células, puede ser llevado a cabo de acuerdo a la invención apenas antes o simultáneamente con la infección de las células con los virus de influenza. Si ese agregado es llevado a cabo simultáneamente con la infección, la proteasa puede ser agregada bien directamente al cultivo celular a infectar o, por ejemplo, como un concentrado junto con el inóculo de virus. Si se usa un medio conteniendo suero para el cultivo, éste debe ser extraído antes del agregado de la proteasa. La proteasa es de preferencia una serino proteasa, y particularmente de preferencia tripsina.

Si se usa tripsina, la concentración final agregada en el medio de cultivo es ventajosamente 1 a 200 $\mu\text{g/ml}$, de preferencia 5 a 50 $\mu\text{g/ml}$ y particularmente de preferencia 5 a 30 $\mu\text{g/ml}$.

Tras la infección, el cultivo celular infectado es cultivado para la replicación de los virus, en particular hasta que puede ser detectada una cantidad máxima o un efecto citopático máximo de antígeno viral.

En una forma de realización de preferencia del procedimiento, la recolección y el aislamiento de los virus de influenza replicados se lleva a cabo 2 a 10 días, de preferencia 3 a 7 días después de la infección. Para hacer esto, por ejemplo, las células o residuos celulares son separados del medio de cultivo por métodos conocidos por la persona experta en la técnica, por ejemplo, con separadores o filtros. Siguiendo a esto se lleva a cabo la concentración de los virus de influenza presentes en el medio de cultivo por métodos conocidos por la persona experta en la técnica, tales como, por ejemplo centrifugación en gradiente, filtración, precipitación y similares.

La invención además se refiere a virus de influenza que son obtenibles por un procedimiento con la invención. Éstos pueden ser formulados por técnicas conocidas para dar una vacuna para administración a seres humanos o animales. Como ya se ha explicado con anterioridad, los virus de influenza de éste tipo tienen una eficacia mayor como vacuna que los virus de influenza obtenidos por replicación en cultivo celular a 37°C.

La inmunogenicidad o eficacia de los virus de influenza obtenidos como vacuna puede ser determinada por métodos conocidos por personas expertas en la técnica, por ejemplo, por medio de la protección impartida en el experimento de exposición o como títulos de anticuerpo de anticuerpos neutralizantes del virus.

La determinación de la cantidad de virus o antígenos producido puede llevarse a cabo, por ejemplo, por la determinación de la cantidad de hemaglutinina por métodos conocidos por las personas expertas en el tema. Es sabido, por ejemplo, que la hemaglutinina fraccionada se une a los eritrocitos de varias especies, por ejemplo a los eritrocitos de gallina. Esto permite una cuantificación rápida y simple de los virus producidos o de los anticuerpos formados por métodos apropiados de detección.

Mediante la comparación de experimentos en modelos animales, se ha demostrado que los virus de influenza de acuerdo con la invención producen un título de anticuerpos neutralizantes apreciablemente mayor que los virus replicados a 37°C y por ello imparten una protección apreciablemente mejor contra la infección del virus de influenza. En experimentos con ratones como un modelo animal, el título de anticuerpos neutralizantes fue, por ejemplo, mayor por al menos un factor de 42 semanas después de la vacunación que el título de anticuerpos neutralizantes después de la inoculación con virus de influenza que habían sido replicados a 37°C. Cuatro semanas después de la inoculación, el título de anticuerpos neutralizantes fue mayor por al menos un factor de 17 y en algunos casos hasta 27 veces mayor. Si se llevaba a cabo una re vacunación, el título de anticuerpos neutralizantes podía ser mayor por un factor de más de 60 cuando se usaba virus de influenza de acuerdo con la invención en comparación con los virus de influenza que habían sido replicados a 37°C. En consecuencia, la tasa de supervivencia de animales en un experimento de exposición usando una administración de 1.000 DL₅₀ (dosis letal 50%) puede incrementarse de 1/10 a hasta al menos 8/10, de preferencia de 9/10 y particularmente de preferencia a 10/10 (100%).

La invención se refiere además a vacunas que contienen virus de influenza obtenible por el procedimiento de acuerdo con la invención. Las vacunas de este tipo pueden contener opcionalmente los aditivos usuales para vacunas, en particular sustancias que incrementan la respuesta inmune, por ejemplo, los llamados adyuvantes, por ej. hidróxidos de varios metales, constituyentes de paredes celulares bacterianas, aceites o saponinas, y además los excipientes farmacéuticamente tolerables usuales.

Los virus pueden estar presentes en las vacunas como partículas virales intactas, en particular como virus vivo atenuado. Para este propósito, los concentrados virales son ajustados al título deseado y liofilizados o estabilizados en forma líquida.

En otra forma de realización de preferencia, las vacunas de acuerdo con la invención pueden contener virus desintegrados, es decir inactivados, o virus intactos pero inactivados. Para este propósito, la infectividad del virus es destruida por medio de métodos químicos o físicos (por ej. con detergentes o formaldehído). La vacuna es luego ajustada a la cantidad deseada de antígeno y después de la posible mezcla con adyuvantes o después de la formulación de la vacuna, dispensada, por ej. como liposomas, microesferas o formulaciones de liberación lenta.

En otra forma de realización de preferencia, las vacunas de acuerdo con la invención pueden finalmente presentarse como vacunas de subunidad, por ej. puede contener constituyentes virales definidos, aislados, de preferencia proteínas aisladas del virus de influenza. Estos constituyentes pueden ser aislados de los virus de influenza por métodos conocidos por la persona experta en la técnica.

La diferencia en la mayor antigenicidad de los virus de influenza preparados de acuerdo con la invención, los que son preparados a temperaturas más bajas, puede ser usada para fines diagnósticos. Por ello la presente invención también se refiere a composiciones para diagnóstico que contienen virus de influenza de acuerdo con la invención o constituyentes de tales virus, si es apropiado, en combinación con aditivos usuales en este campo y apropiados agentes para la detección.

Los ejemplos ilustran la invención

Ejemplo 1

Replicación de virus de influenza en células MDCK a 33°C

Se replicaron células MDCK (ATCC CCL 34) en botellas de cultivo (Eagle's MEM [EMEM] usando FCS 2%, incubación a 37°C durante 4 días). La monocapa celular resultante fue extraída de la pared del recipiente usando una solución de tripsina, las células fueron aisladas y el concentrado celular resuspendido en un medio conteniendo suero. Las células fueron inoculadas en botellas rotatorias de 200 ml (botellas roller) a una densidad celular de 5×10^5 células/ml e incubadas a 37°C a 4 rpm. Luego de 2 días, las células fueron infectadas con virus de influenza. Para hacer esto, se descartó el medio sobrenadante de monocapa celular y se lo reemplazó por EMEM libre de suero. Se agregó al medio el virus de influenza A/PR/8/34 con una m.d.i. (multiplicidad de infección) de 0,1 y tripsina en una concentración final de 25 µg/ml. Se incubaron en cada caso dos botellas roller, a 37°C o a 33°C. La replicación viral fue determinada como cantidad de antígeno (medido como unidades de hemaglutinina) y como infectividad (medida con la prueba CC DI₅₀) y es mostrada en la Tabla 1.

TABLA 1

Replicación de virus de influenza A/PR/8/34 en botellas roller (línea celular MDCK) luego de incubación a 37°C y 33°C, medida como contenido de antígeno (unidades de HA e infectividad (CC DI₅₀))

	contenido de HA			CC DI ₅₀ /ml
	2 ddi	3 ddi	4 ddi	[log ₁₀] 4 ddi
37 °C	1:128	1:512	1:1.024	6,4
33 °C	1:64	1:256	1:1.024	5,7

ddi = días después de la infección

Las razones indicadas significan que una dilución 1:X del virus obtenido aún tiene propiedades hemaglutinantes. Las propiedades hemaglutinantes pueden ser determinadas, por ej., como se describe en Mayer y col., *Virologische Arbeitsmethoden*, Volumen 1 (1.974), páginas 260-261 o en Grist, *Diagnostic Methods in Clinical Virology*, páginas 72-75.

La determinación del valor de CC DI₅₀ puede llevarse a cabo, por ej., de acuerdo con el método que es descrito en Paul, Zell- und Gewebekultur [Cultivo celular y tisular] (1.980), pág. 395.

Ejemplo 2

Preparación de una línea celular adaptada al crecimiento en suspensión y que puede ser infectada por virus de influenza

Se seleccionó una línea celular, la cual es adecuada para el crecimiento en suspensión y que puede ser infectada por virus de influenza, partiendo de células MDCK (ATCC CCL34 MDCK NBL-2), las que han sido proliferadas

ES 2 236 799 T3

por medio de unos pocos pasajes o a través de varios meses en el laboratorio. Esta selección se llevó a cabo por proliferación de las células en botellas roller, las que fueron rotadas a 16 rpm (en lugar de alrededor de 3 rpm como es habitual para botellas en las que se cultivan células en crecimiento adherente). Luego de varios pasajes de las células en suspensión en el medio, se obtuvieron las cepas celulares de crecimiento en suspensión. Estas cepas celulares fueron infectadas con virus de influenza y se seleccionaron las cepas que produjeron un mayor rendimiento de virus. Se alcanzó un incremento en la tasa de células de crecimiento en suspensión durante los primeros pasajes a 16 rpm a través de 1 a 3 pasajes por la adición de sistemas de selección conocidos por la persona experta en la técnica, tales como hipoxantina, aminopterina y timidina, o alanosina y adenina, individualmente o en combinación. La selección de células de crecimiento en suspensión también es posible en otros sistemas de cultivo celular con agitación conocidos por la persona experta en la técnica, tal como frascos en agitación. Un ejemplo de células que están adaptadas a crecimiento en suspensión y pueden ser infectadas por virus de influenza es la línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219).

Ejemplo 3

Replicación de virus de influenza en células MDCK 33016 a 33°C

La línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219) con crecimiento en suspensión fue replicada a 37°C en medio Iscove con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces a la semana en una botella rotatoria con rotación a 16 rpm 4 días después de la transferencia, se obtuvo un recuento celular de aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml. Simultáneamente con la infección del cultivo celular, el cual ahora lleva 4 días de cultivo, con la cepa del virus de influenza A/PR/8/34 (m.d.i. = 0,1), el cultivo celular fue tratado con tripsina (concentración final 25 µg/ml), incubado a 37°C o a 33°C y la replicación viral fue determinada a lo largo de 3 días (tabla II).

TABLA II

Replicación del virus A/PR/8/64, medido como contenido de antígeno (unidades HA) en botellas roller (línea celular MDCK 33016) tras la infección del cultivo celular sin cambio de medio a una temperatura de incubación de 37°C o 33°C

Contenido de HA luego de los días después de la infección (ddi)				
	1 ddi	2 ddi	3 ddi	
37°C	1:64	1:512	1:1.024	
33°C	1:16	1:128	1:1.024	

Ejemplo 4

Replicación de varias cepas de virus de influenza en células MDCK 33016 (DSM ACC2219) a 33°C

La línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219) fue proliferada a 33°C en medio Iscove con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces a la semana en una botella rotatoria con rotación a 16 rpm 4 días después de la transferencia, se obtuvo un recuento celular de aproximadamente $7,0 \times 10^5$ a 10×10^5 células/ml. Simultáneamente con la infección del cultivo celular. Simultáneamente con la infección del cultivo celular, el cual ahora lleva 4 días de cultivo, con varias cepas de influenza (m.d.i. $\approx$ 0,1) el cultivo celular fue tratado con tripsina (concentración final 25 µg/ml), incubado a 33°C, y la replicación viral fue determinada en el 5° día después de la infección (Tabla III).

TABLA III

La replicación de las cepas de influenza en botellas roller (línea celular MDCK 33016) después de la infección de un cultivo celular sin cambio de medio, medido como contenido de antígeno (unidades HA)

Contenido de HA 5 días después de la infección	
Cepa de Influenza	
A/Singapore	1: 1.024
A/Sichuan	1: 256
A/Shanghai	1: 256
A/Guizhou	1: 128
A/Beijing	1: 512
B/Beijing	1: 256
B/Yamagata	1: 512

ES 2 236 799 T3

TABLA III (continuación)

	Cepa de Influenza	Contenido de HA 5 días después de la infección
5	A/PR/8/34	1: 1.024
10	A/Equi 1/Prague	1: 512
	A/Equi 2/Miami	1: 256
	A/Equi 2/Fontainebleau	1: 128
	A/Swine/Ghent	1: 512
15	A/Swine/Iowa	1: 1.024
	A/Swine/Arnsberg	1: 512

Ejemplo 5

Preparación de una vacuna experimental para influenza

Tras la inoculación en ratones, los virus de influenza patogénicos para el ser humano usualmente no conducen a procesos patológicos con su infección, de manera que los experimentos de protección con ratones son muy difíciles de construir experimentalmente. La cepa de virus de influenza A/PR/8/34, de cualquier manera, está adaptada a ratones y luego de la administración intranasal causa mortalidad dosis dependiente en ratones.

Se preparó una vacuna experimental del virus de influenza A/PR/8/34 del Ejemplo 3 (A/PR/8 replicado a 37°C o 33°C). Los virus de influenza en medio de cultivo celular fueron separados de las células y los fragmentos celulares por centrifugación a baja velocidad (2.000 g, 20 minutos, 4°C) y purificados con una centrifugación en gradiente de sucrosa (10 a 50%) (peso/peso) de gradiente de sucrosa lineal, 30.000 g, 2 hs, 4°C). Se obtuvo la capa que contiene al virus de influenza, se diluyó 1:10 con solución tampón fosfato (PBS) a pH 7,2, y se sedimentó a 20.000 rpm, y el precipitado fue resuspendido en PBS (volumen: 50% del medio de cultivo celular original). Los virus de influenza fueron inactivados con formaldehído (se adicionó dos veces solución de formaldehído al 0,025% de una solución al 35% en un intervalo de 24 hs, incubación a 20°C con agitación).

Se inocularon 10 ratones NMRI, cada uno con un peso entre 18 y 20 g, con 0,3 ml de cada una de las vacunas experimentales inactivadas en el día 0 y el día 28 por inyección subcutánea. Se extrajo sangre de los animales para determinar el título de los anticuerpos neutralizantes contra A/PR/8/34 2 y 4 semanas después de la inoculación y también 1 y 2 semanas después de la revacunación. Para determinar la tasa de protección, los ratones fueron expuestos dos semanas después de la revacunación (6 semanas después del inicio del experimento) por administración intranasal de 1.000 DL₅₀ (dosis letal 50%). Los resultados del experimento se muestran en la Tabla IV.

TABLA IV

Eficacia de las vacunas experimentales: para la vacuna A el virus de influenza A/PR/8/34 fue replicado a 37°C y para la vacuna B a 33°C. Los títulos de anticuerpos neutralizantes contra A/PR/8 y también fue investigada la tasa de protección de los ratones tras la exposición

Título de anticuerpos neutralizantes / ml*					Tasa de protección Número de sobrevivientes / total
	2 s dvac	4 s dvac	1 s drevac	2 s drevac	
37 °C	< 28	56	676	1.620	1/10
33 °C	112	1.549	44.670	112.200	9/10

* Semanas después de la vacunación (s dvac) y semanas después de la revacunación (s drevac).

ES 2 236 799 T3

Los experimentos confirman que los virus de influenza que han sido replicados a 37°C en cultivo celular con un rendimiento de antígeno alto (título HA) sólo indujeron a bajos títulos de anticuerpos neutralizantes en el ratón y apenas proporcionaron protección, mientras que los virus de influenza que han sido replicados a 33°C en cultivo celular también con un rendimiento alto de antígeno (título HA) indujeron muy altos títulos de anticuerpos neutralizantes en el ratón y brindaron una protección muy buena.

Ejemplo 6

Replicación de virus de influenza en células MDCK a 33°C y eficacia de la vacuna obtenida

La línea celular MDCK (ATCC CL34) fue replicada a 33°C en botellas de cultivo celular en medio MEM de Eagle (EMEM) con FCS 2% con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces a la semana. El resultado 4 días después de la transformación fue una densa capa celular. Luego de cambiar el medio por un EMEM libre de suero, el cultivo celular fue infectado con influenza B/Beijing (m.d.i. = 0,1), se agregó tripsina al medio en una concentración final de 25 µg/ml y las botellas con el cultivo celular infectado fueron incubadas, bien a 37°C o a 33°C. El contenido de HA, 4 días después de la infección, fue en ambos lotes experimentales de 256 unidades HA. Después de una centrifugación a baja velocidad para remover células/residuos celulares, los virus en el sobrenadante fueron inactivados con formaldehído (se adicionó dos veces solución de formaldehído al 0,025% de una solución al 35% en un intervalo de 24 hs, incubación a 20°C con agitación). En cada sección experimental, el adyuvante agregado fue hidróxido de aluminio (concentración final 10%, de una solución al 2% de Al(OH)₃). Usando estas vacunas experimentales, en cada caso por cada sección experimental, 3 cobayos fueron vacunados por vía intraplantar con 0,2 ml y se los revacunó 4 semanas después con la misma vacuna. Para investigar la eficacia de la vacuna, se tomaron muestras de sangre 2, 4 y 6 semanas después de la inoculación y se realizó la prueba de inhibición de hemaglutinación y la prueba de neutralización de suero (cfr. Tabla V).

TABLA V

Eficacia de las vacunas experimentales obtenidas con influenza B/Beijing luego de la replicación del virus a 37°C y a 33°C en cultivo celular: se investigaron los parámetros serológicos inhibición de hemaglutinación y anticuerpos neutralizantes (valores promedio de 3 cobayos)

	Inhibición de hemaglutinación			Anticuerpos neutralizantes		
	Título			Título		
	2 s dvac*	4 s dvac*	6 s dvac	2 s dvac	4 s dvac	6 s dvac
37 °C	85	341	1.024	851	1.290	6.760
33 °C	85	341	853	3.890	22.400	117.490

* s dvac = semanas después de la inoculación (6 s dvac = 2 semanas después de la revacunación).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la replicación de virus de influenza en cultivo celular, en el que las células que puedan ser infectadas por los virus de influenza son cultivadas en cultivo celular, las células son infectadas con virus de influenza y luego de la infección son cultivadas a una temperatura en el intervalo de 30°C a 36°C para la replicación viral, **caracterizado** porque se agrega una proteasa a las células cultivadas antes o durante la infección con los virus de influenza.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células son cultivadas con virus de influenza a una temperatura en el intervalo de 32°C a 34°C después de la infección para la replicación viral.

3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que las células son cultivadas con virus de influenza a 33°C después de la infección para la replicación viral.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células son células de vertebrado.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que las células de vertebrado son células de ave.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que las células de ave son células embrionadas de gallina.

7. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que las células de vertebrado son células de mamífero.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que las células de mamífero son células de hámster, bovino, mono o perro.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que las células de mamífero son células BHK21-F, células HKCC, células VERO, o células MDCK.

10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células que pueden ser infectadas por virus de influenza crecen de manera adherente o en suspensión.

11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que las células son cultivadas en un medio libre de suero.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteasa es una serino proteasa.

13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que la serino proteasa es tripsina.

14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la recolección y el aislamiento de los virus de influenza tiene lugar 2 a 10 días después de la infección.

15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que la recolección y el aislamiento de los virus de influenza tiene lugar 2 a 7 días después de la infección.

16. Un virus de influenza obtenible por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. Una vacuna que contiene virus de influenza según la reivindicación 16.

18. Una vacuna según la reivindicación 17, en combinación con sustancias que incrementen la respuesta inmune.

19. Una vacuna según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en la que el virus de influenza esté presente como partículas virales intactas, como virus atenuado o como partículas virales desintegradas.

20. Una vacuna que contiene constituyentes de un virus de influenza según la reivindicación 16.

21. Una vacuna según la reivindicación 20, en combinación con sustancias que incrementen la respuesta inmune.

22. Una vacuna según la reivindicación 20 o la reivindicación 21, que contiene proteínas aisladas del virus de influenza.

23. Una composición diagnóstica, que contiene virus de influenza según la reivindicación 16 o constituyentes de dichos virus de influenza.