



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 833**

51 Int. Cl.:
C12N 5/07 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08018057 .3**
96 Fecha de presentación : **11.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **2011862**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de un componente activo de un fármaco o agente de diagnóstico en cultivo en suspensión de células MDCK.**

30 Prioridad: **12.09.2001 DE 101 44 906**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

73 Titular/es:
Novartis Vaccines and Diagnostics GmbH
Emil-Von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

72 Inventor/es: **Gregersen, Jens-Peter;**
Vorlop, Jürgen;
Frech, Christian y
Lübben, Holger

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 833 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

Procedimiento para la preparación de un componente activo de un fármaco o agente de diagnóstico en cultivo en suspensión de células MDCK

5 La invención se refiere a procedimientos para la preparación de un componente activo de una vacuna, en los que se multiplican virus en células MDCK a escala industrial en cultivo en suspensión.

10 Las enfermedades infecciosas, especialmente las infecciones virales, tienen al igual que antes una gran importancia médica. Por tanto, sigue existiendo la necesidad invariable de poner a disposición mejores procedimientos mediante los cuales puedan multiplicarse virus en cultivo para hacer posible la investigación de virus y la preparación de vacunas. Especialmente la producción de vacunas contra infección viral requiere normalmente la multiplicación y el aislamiento de grandes cantidades del virus en cuestión.

15 En función del virus respectivo, en el estado de la técnica se usan diferentes sistemas huésped y condiciones de cultivo para la multiplicación de virus. Como sistemas huésped se usan animales huésped estándar, huevos de gallina embrionarios, cultivos primarios de células de tejido o líneas celulares establecidas permanentes (Rolle y Mayr [editores], Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 1978; Mahy [editor], Virology, A Practical Approach, 1985; Horzinek [editor] Kompendium der allgemeine Virologie, 1985).

20 La multiplicación de virus en huevos de gallina embrionarios está ligada a un alto consumo de tiempo y de costes. Los huevos deben incubarse antes de la infección y a continuación probarse para la viabilidad de los embriones. Sólo los embriones vivos pueden multiplicar virus. Después de realizarse la infección con el virus que va a multiplicarse y la posterior incubación, los embriones se matan finalmente. Los virus que pueden aislarse de los huevos se liberan de contaminantes y se concentran. Como la multiplicación de virus en huevos incubados no es posible bajo condiciones estrictamente estériles, los microorganismos patógenos contaminantes deben eliminarse de las cepas aisladas, siempre y cuando éstos deban estar disponibles para una aplicación médica o diagnóstica.

25 Las células huésped eucariotas de líneas celulares definidas ofrecen una alternativa a la multiplicación de virus en huevos de gallina (Gregersen, J.P., Pharmazeutische Biotechnologie, Kayser y Müller [editores], 2000, páginas 257-281). Sin embargo, debido a las persistentes contaminaciones por virus extraños o debido a la falta de pruebas de la ausencia de virus de origen e historia poco claros, numerosas líneas celulares no son adecuadas para la preparación de vacunas o preparados similares que puedan usarse médicamente.

30 Por el contrario, en el caso de las células Vero derivadas de células renales de monos se trata de un sistema huésped que ya se usa en la multiplicación de virus individuales (virus de la poliomielitis, virus de la rabia) para la preparación de vacunas. Estas células pueden obtenerse en diversos bancos de células (como, por ejemplo, de la Colección americana de cultivos tipo, ATCC) y además también están a disposición por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de un banco de células probado para investigación médica.

35 En el caso de estas células Vero se trata de líneas adherentes que para su crecimiento necesitan superficies de soporte como, por ejemplo, frascos de cristal, placas de cultivo de plástico o frascos de plástico. En un cultivo de células correspondientes, en el fermentador se realiza el crecimiento en los llamados microsoportes, es decir, esférulas de plástico generalmente pequeñas sobre cuya superficie pueden crecer las células.

40 Se sabe que, además de las células Vero anteriormente mencionadas, también pueden multiplicarse activamente, por ejemplo, células BHK adherentes ("Baby Hamster Kidney" de riñón de hámster bebé) y MDCK adherentes ("Madin Darby Canine Kidney" de riñón canino de Madin Darby) y otras células de varios tipos de virus y usarse para el uso como sustrato para la preparación de productos farmacéuticos o considerarse su uso. En la ATCC CRL34 (NBL-2) de la línea celular MDCK también se multiplicaron experimentalmente, además de virus de la gripe, el virus de la estomatitis vesicular, el virus Coxsackie B5 (pero no B3 ni B4), el tipo de reovirus 2 y 3, el tipo de adenovirus 4 y 5, así como el virus de la variolovacuna. Sin embargo, todas las publicaciones correspondientes se fijan exclusivamente en cultivos adherentes (véase la información de producto de ATCC). Sin embargo, para la multiplicación de mayores cantidades de células se prefiere el cultivo en suspensión, pudiendo multiplicarse hasta la fecha sólo las células linfoides y algunas transformadas en este sistema (Lindl [editor], Zell- und Gewebekultur, 2000, páginas 173 y siguientes). Una línea celular MDCK que puede crecer en medios de cultivo en suspensión libres de proteínas se da a conocer en el documento WO 97/37000. También se describe la multiplicación de virus de la gripe usando las células huésped correspondientes.

50 Además de la selección de un sistema de células o huésped adecuado, también son de gran importancia las condiciones de cultivo bajo las cuales se multiplica una cepa de virus para alcanzar un rendimiento alto aceptable. Por tanto, para maximizar el rendimiento de la cepa de virus deseada deben adaptarse específicamente tanto el sistema huésped como las condiciones de cultivo para alcanzar condiciones medioambientales favorables para la cepa de virus deseada. Por tanto, para conseguir un alto rendimiento de las distintas cepas de virus se necesita un sistema que logre condiciones de crecimiento óptimas. Muchos virus están limitados a sistemas huésped especiales de los que algunos son muy ineficaces en cuanto al rendimiento de virus. Además, los sistemas de producción eficientes se basan frecuentemente en adaptaciones de la población de virus al sistema de cultivo respectivo usando frecuentemente etapas intermedias usando otros sistemas huésped y usando aditivos de proteínas – la mayoría de las veces suero – de origen animal o humano.

Además, los expertos saben que casi todos los cultivos celulares después de la multiplicación inicial con adición de suero u otros factores de crecimiento pueden mantenerse al menos durante un cierto tiempo sin adiciones de suero o de proteínas. Así, por ejemplo, un cultivo celular discrecional puede transferirse en el momento de la infección con el virus o poco antes de la cosecha a un medio sin suero o aditivos de proteínas y mantenerse hasta la cosecha. Esto es desde hace años práctica habitual para obtener material de virus para vacunas o pruebas diagnósticas evitando o reduciendo las proteínas extrañas. Las vacunas de cultivos celulares que se mantuvieron sin esta práctica durante la fase de infección con adición de suero tendrán grandes problemas para que la aplicación sea aprobada en seres humanos o animales ya que los constituyentes del suero apenas pueden eliminarse suficientemente (véanse las recomendaciones de la OMS "Proposed requirements for Measles Vaccine" (Live), Requirements for Biological Substances, nº 12, revisión de 1978).

También se sabe que algunos virus pueden multiplicarse sólo muy escasamente o incluso no pueden multiplicarse en medios que contienen proteínas. A este respecto se trata de aquellos virus que para su multiplicación en sistemas de cultivo dependen de la actividad de enzimas proteolíticas (proteasas). Como estas proteasas se inhiben competitivamente mediante las adiciones de proteínas al medio, lógicamente aquí queda descartada la adición de proteínas al menos desde el momento de la infección o la fase de producción. Ejemplos de virus que normalmente deben multiplicarse con la adición de proteasas y, por tanto, para conseguir buenos rendimientos a ser posible sin aditivos de proteínas al medio de infección son virus de la gripe y rotavirus. Otros tipos de virus como, por ejemplo, paramixovirus y reovirus también pueden beneficiarse durante la multiplicación de medios a ser posible pobres en proteínas (Ward y col. (1984) J.Clin.Microbiol. 748-753 "Efficiency of Human Rotavirus Propagation in Cell Culture"). El documento WO 96/15231 propone cultivar células Vero y otras células en cultivo celular debiendo usarse un medio que se las arregla sin los aditivos de proteínas habituales.

Otros virus pueden multiplicarse de manera notoriamente mala independientemente de la composición del medio y de las condiciones de cultivo, por ejemplo, virus de la rabia, rotavirus, pneumovirus o de la hepatitis A (Provost y Hillemann, Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 160:213-221 (1979); y Rolle y Mayr, en el lugar citado).

Finalmente, en el estado de la técnica se conocen numerosos procedimientos mediante los cuales virus, productos de expresión viral u otras proteínas pueden aislarse del medio y/o de las células después de la multiplicación (Gregersen, en el lugar citado; Mahy, en el lugar citado.; Reimer C. y col., Journal of Virology, diciembre de 1967, pág. 1207-1216; Navarro del Canizo, A. y col., Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 61, 1996, 399; Prior, C. y col., BioPharm, octubre de 1996, 22; Janson, Jan-C. y Rydén, L. [editores], Protein Purification, 1997; y Deutscher M. [editor], Methods in Enzymology, vol. 182, 1990).

Kessler y col. "Suitability of MDCK cells grown in a serum-free medium for influenza virus production", Development in Biological Standardization, Karger, Basel, CH, tomo 98, 1 de Enero de 1999, páginas 13-21, 73/74 describen el cultivo de células MDCK con ayuda de microportadores.

El documento WO 96/15231 da a conocer el cultivo adherido de células MDCK en forma de una monocapa.

El documento WO 01/64846 describe células MDCK, que se multiplican en medio sin suero en suspensión.

Sin embargo, en el estado de la técnica no se conoce ningún procedimiento con el que múltiples virus distintos puedan multiplicarse con alto rendimiento en un sistema de cultivo en suspensión fácil de manipular bajo las condiciones que son necesarias para un producto farmacéutico y a escala industrial. Por tanto, es objetivo de la presente invención proporcionar procedimientos y sistemas de cultivo celular para la multiplicación de virus a escala industrial que sean adecuados para el uso farmacéutico y diagnóstico.

Por tanto, la invención se refiere a procedimientos para la preparación de un componente activo de una vacuna, comprendiendo etapas en las que

(a) se infectan células MDCK con un virus, tratándose el virus de un virus de la gripe de un aislado primario, que se multiplicó previamente en cultivo celular para obtener un virus de siembra homogéneo para fines productivos,

(b) las células MDCK en cultivo en suspensión se cultivan a escala industrial en condiciones que hacen posible una multiplicación de los virus,

realizándose el cultivo en un volumen de al menos 30 l.

Ahora se ha comprobado sorprendentemente que determinadas líneas celulares MDCK, que presentan la capacidad de crecer en suspensión, son especialmente adecuadas para la multiplicación de múltiples virus distintos bajo condiciones industriales. En estas células pueden replicarse rápidamente los tipos de virus más distintos sin una fase de adaptación normalmente larga (duración de semanas o meses). El procedimiento según la invención puede realizarse sin la selección de condiciones de cultivo especiales como medios, aditivos de medios o temperaturas. Las células son adecuadas sin problemas para la replicación de los virus más distintos, también de virus notoriamente difíciles de multiplicar, como, por ejemplo, virus de la rabia, rotavirus, pneumovirus o de la hepatitis A.

La invención abre nuevas posibilidades y al mismo tiempo mejoradas de preparar virus en cultivo celular a escala

industrial. Los productos obtenidos a este respecto son especialmente adecuados para el uso en la preparación de vacunas. Pudo mostrarse sorprendentemente que el procedimiento según la invención puede usarse de forma casi invariable para distintos tipos de virus sin adaptarse específicamente a éstos. Esto tiene la ventaja que pueden multiplicarse diferentes productos (virus) en la misma unidad o en varias unidades de la misma alineación y especificación. Mediante esta manera de proceder pueden hacerse ahorros de costes considerables ya que el mismo proceso base para distintos productos hace innecesaria una costosa validación de un nuevo proceso o de una nueva variante de proceso. Al mismo tiempo, el procedimiento según la invención proporciona rendimientos que superan a los de los sistemas conocidos hasta la fecha costosamente optimizados. De las ventajas mencionadas del procedimiento según la invención resulta además un registro oficial simplificado de los productos resultantes del procedimiento ya que una gran parte de un dossier de registro preparado y aceptado para un producto puede usarse para otros productos y su registro.

La multiplicación de los virus se realiza en un cultivo en suspensión con un volumen de más de 30 l, prefiriéndose procedimientos que usan un volumen de más de 50 l y más de 100 l. El procedimiento según la invención presenta un límite superior en cuanto al volumen únicamente en la medida en que el tamaño absoluto de los recipientes de cultivo disponibles es limitado. En el estado de la técnica se conocen unidades, por ejemplo, fermentadores de acero inoxidable, con un tamaño de hasta 5.000 y 10.000 l. Unidades correspondientes pueden usarse para el procedimiento según la invención.

En el caso de las células que se usan en el procedimiento según la invención se trata de células MDCK que tienen la propiedad de crecer en cultivo en suspensión. Con esto se designan líneas celulares que también pueden crecer a escala industrial en ausencia de partículas de soporte en el fermentador, lo que en comparación con otras células presenta ventajas considerables en la manipulación de cultivos, en el aumento de la escala de los cultivos y en la multiplicación de virus. En el estado de la técnica se conocen procedimientos para la adaptación de células MDCK al cultivo en suspensión (documento WO 97/37000). Las células MDCK pueden proceder, por ejemplo, de la línea celular MDCK-33016.

Según otra forma de realización de la invención se usan células MDCK que pueden crecer tanto adherentemente como también en suspensión. Esta forma de realización presenta la ventaja especial que puede usarse un sistema de cultivo celular y, por tanto, también un medio para el desarrollo de las células de escala de laboratorio a producción industrial. Los sistemas correspondientes simplifican considerablemente el registro de fármacos ya que sólo debe comprobarse la seguridad de un único sistema de cultivo celular.

El virus puede presentar un genoma de ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNm), de ácido desoxirribonucleico bicatenario (ADNb), ácido ribonucleico bicatenario (ARNb) o ácido ribonucleico monocatenario. Las moléculas de ácido ribonucleico monocatenario pueden presentar a este respecto la polaridad de un ARN mensajero ("messenger-RNA), ARN(+), o ser de polaridad opuesta, ARN(-).

En el caso del virus puede tratarse de un virus discrecional conocido en el estado de la técnica. Los virus que se usan en el marco del procedimiento según la invención pueden obtenerse de distintas colecciones como, por ejemplo, la ATCC (American Type Culture Collection de Colección americana de cultivos tipo) o la ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures de Colección europea de cultivos de células animales). Generalmente, a este respecto se recurre a cepas de producción existentes o cepas de virus ya previamente multiplicadas en cultivo celular. Además, pueden establecerse cepas aisladas propias, siempre y cuando éstas sean más adecuadas para la aplicación respectiva. Según una forma de realización, el virus que se usa en el procedimiento se selecciona del grupo constituido por: adenovirus, orto y paramixovirus, reovirus, picornavirus, enterovirus, flavivirus, arnavirus, virus del herpes y poxvirus. Con especial preferencia se trata de un adenovirus, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis centroeuropea, así como las formas orientales relacionadas (rusa u otra), virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus de la hepatitis C, virus de la rubéola, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, virus de la variolovacuna, virus de la gripe, rotavirus, rabdovirus, pneumovirus, reovirus, virus del herpes simple 1 ó 2, citomegalovirus, virus de la varicela-zóster, adenovirus canino, virus de Epstein Barr, así como se usan virus del herpes bovino o porcino como VHB 1 o virus de la pseudorrabia para la infección de las células, prefiriéndose especialmente el uso de un virus de la rabia, rotavirus, pneumovirus o virus de la hepatitis A.

Según otra forma de realización de la presente invención, el genoma del virus puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína funcional heteróloga con un tamaño de al menos 10 kDa. En el estado de la técnica se conocen numerosos vectores para la expresión de proteínas heterólogas que se basan en un genoma viral, por ejemplo, en un genoma de herpes, variolovacuna o adenovirus (Galler R. y col., Braz. J. Med. Biol. Res., febrero de 1997, 30(2): 157-68; Willemse M.J. y col., Vaccine, noviembre de 1996, 14(16): 1511-6; Efstatiou S.; Minson AC., Br. Med. Bull., enero de 1995, 51(1): 45-55; Hammerschmidt W., Curr. Opin. Mol. Ther., octubre de 2000, 2(5):532-9; Graham Fl.; Prevec, L., Mol. Biotechnol., junio de 1995; 3(3):207-20; Carroll MW., Moss B.; Curr. Opin. Biotechnol., octubre de 1997; 8(5):573-7; Wojcik J., Acta. Microbiol. Pol., 1995, 44(2):191-6; Ramirez JC. y col., J. Virol., agosto de 2000; 74(16): 7651-5; Hagen, Anna y col., Biotechnol. Prog., 1996, 12, 406-408; Huyghe, Bernard y col., Human Gene Therapy, noviembre de 1995, 6:1403-1416).

En el marco de la presente invención también están comprendidos procedimientos para la multiplicación de tales virus en los que el genoma viral se cambió mediante la adición o sustitución de secuencias de forma que el genoma codificara

una proteína funcional heteróloga, es decir, que originariamente no pertenecía al virus, con un tamaño de al menos 10 kDa. Según la invención, a este respecto se designa una proteína como una proteína funcional cuando la proteína puede desencadenar al menos una reacción inmunitaria contra esta proteína. Evidentemente, la proteína puede presentar, además de la actividad inmunológica, otras actividades biológicas, por ejemplo, actuar de enzima o de citocina.

5 Los virus que se usan en el procedimiento según la invención pueden presentar además deleciones de genes individuales en el genoma viral. Así pueden deleccionarse específicamente, por ejemplo, genes de un virus que se usará como vacuna que codifican factores de patogenia. Deleciones correspondientes comprenden preferiblemente no más de 500 ó 1000 nucleótidos.

10 Evidentemente, el virus usado para el procedimiento según la invención también puede comprender un genoma completamente viral.

15 La multiplicación de los virus en el cultivo en suspensión puede realizarse según el procedimiento según la invención en presencia o ausencia de suero en el medio. Resultan ventajas especiales de la ausencia de suero ya que estas condiciones de cultivo celular simplifican notablemente el registro del uso médico de productos así producidos. Renunciando a adiciones de suero al medio de cultivo se evitan además costosas etapas de purificación para eliminar las contaminaciones del medio. Por tanto, de esta manera también pueden conseguirse mejoras en cuanto a la calidad del producto y también evitar costes.

Como "medio libre de suero" se designa en el marco de la presente invención un medio que no presenta adiciones de suero de tipo humano o animal.

20 A cultivos correspondientes pueden añadirse cantidades definidas de determinadas proteínas que no repercuten de forma interferente en el cultivo y el uso posterior. Un medio de cultivo tal se designa medio químicamente definido. A este medio se añaden proteínas seleccionadas como péptidos mitógenos, insulina, transferrina o lipoproteínas que pueden obtenerse de distintos fabricantes conocidos para el experto. Por péptidos mitógenos se entiende en el marco de la presente invención preferiblemente hidrolizados vegetales, por ejemplo, hidrolizados de proteína de soja o lisados de proteínas de otras plantas útiles.

25 Sin embargo, según una forma de realización especialmente preferida, los medios están completamente "libres de proteínas". Por "libre de proteínas" se entiende cultivos en los que la multiplicación de las células se realiza con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas de no suero. Evidentemente, las células que crecen en tales cultivos contienen las propias proteínas.

30 Medios libres de suero conocidos son, por ejemplo, medio de Iscove, medio Ultra-CHO (BioWhittaker) o EX-CELL (JHR Bioscience). Medios que contienen suero habituales son, por ejemplo, medio basal de Eagle (BME) o en medio esencial mínimo (MEM) (Eagle, Science 130, 432, (1959)) o medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM o EDM) que normalmente se usan con hasta el 10 % de suero bovino fetal o aditivos similares. También son suficientemente conocidos en el estado de la técnica medios libres de proteínas como, por ejemplo, PF-CHO (JHR-Bioscience), medios químicamente definidos como ProCHO 4CDM (Bio Whittaker) o SMIF 7 (Gibco/BRL-Life Technologies) y péptidos mitógenos como, por ejemplo, Primactone, Peptidase o HyPep™ (todos de Quest International) o hidrolizado de lactoalbúmina (Gibco, entre otros fabricantes). Los aditivos de medios basados en hidrolizados vegetales presentan especialmente la ventaja especial que puede excluirse una contaminación con virus, micoplasmas o agentes infecciosos desconocidos.

40 Según una forma de realización preferida de la presente invención, durante el cultivo de las células MDCK infectadas se añade medio fresco, concentrado de medio o constituyentes de medio como, por ejemplo, aminoácidos, vitaminas, fracciones de lípidos o fosfatos.

45 El procedimiento según la invención puede realizarse a este respecto en un sistema de perfusión o en un sistema por lotes. Como "sistemas de perfusión" se designan sistemas de cultivo en los que continuamente se introduce y se saca medio. Alternativamente a éstos, las células también pueden cultivarse en un "sistema por lotes" en el que el sistema trabaja como sistema en gran parte cerrado sin suministro de medio desde la inoculación hasta la cosecha.

Las condiciones de cultivo celular que van a usarse para la aplicación deseada (temperatura, densidad celular, valor de pH, etc.) pueden variarse en un intervalo muy amplio debido a la idoneidad de la línea celular usada según la invención y pueden adaptarse a las necesidades de la aplicación. Por tanto, los siguientes datos sólo representan valores orientativos.

50 La multiplicación de las células MDCK antes de la infección se puede realizar partiendo de cultivos de siembra o pequeños recipientes de cultivo en un sistema de perfusión con uso de procedimiento de apoyo convencional como, por ejemplo, centrifugación o filtración. Se ha demostrado ventajoso cambiar el medio de cultivo en el crecimiento de células en un sistema tal con una tasa de hasta 3 rellenos de fermentador por día. Las células MDCK se pueden multiplicar en estas condiciones hasta la densidad celular, por ejemplo, de 2×10^7 . El control de la tasa de perfusión se realiza durante el cultivo preferiblemente en función de los parámetros conocidos por el especialista en la técnica como, por ejemplo, número de células, contenido en glutamina, contenido en glucosa o contenido en lactato.

En la multiplicación de un sistema por lotes se pueden conseguir por ejemplo a una temperatura de 37° C y un tiempo de generación de 20 a 30 horas densidades celulares de hasta aproximadamente $8-25 \times 10^5$ células/ml.

Adicionalmente las células se pueden multiplicar según la invención antes de la infección también en un sistema por lotes alimentados. Como "sistema por lotes alimentados" se designa en el marco de la presente invención un sistema de cultivo en el que las células se cultivan inicialmente en un sistema por lotes y el agotamiento de los nutrientes (o una parte de los nutrientes) se compensa en el medio mediante una alimentación controlada de nutrientes concentrados. En un sistema por lotes alimentados, las células MDCK pueden multiplicarse, por ejemplo, hasta una densidad celular de aproximadamente $1-10 \times 10^6$.

Además, ha demostrado ser ventajoso ajustar el valor de pH del medio durante la multiplicación de las células MDCK antes de la infección a un valor entre pH 6,6 y pH 7,8, y con especial preferencia a un valor entre pH 7,2 y pH 7,3.

El cultivo de las células MDCK antes de la infección se realiza preferiblemente a una temperatura entre 30 ° y 40 °C, y con especial preferencia a una temperatura entre 33 ° y 37 °C. La presión parcial del oxígeno se ajusta durante el cultivo antes de la infección preferiblemente a un valor entre el 25 % y el 95 %, y con especial preferencia a un valor entre el 35 % y el 60 %. Los valores de presión parcial de oxígeno especificados en el marco de la invención se basan en la saturación del aire.

Para el procedimiento según la invención ha demostrado ser ventajoso que la infección de las células MDCK se realice a una densidad celular de preferiblemente aproximadamente $8-25 \times 10^5$ células/ml en el sistema por lotes o preferiblemente aproximadamente $5-20 \times 10^6$ células/ml en el sistema de perfusión. Las células pueden infectarse en el procedimiento según la invención con una dosis viral (valor de m.o.i., "multiplicity of infection" multiplicidad de infección; se corresponde con el número de unidades virales por célula en el momento de la infección) entre 10^8 y 10, preferiblemente entre 0,0001 y 0,5.

El cultivo de las células MDCK después de la infección puede realizarse igualmente en el sistema de perfusión, por lotes o por lotes alimentados. A este respecto pueden usarse las mismas condiciones de cultivo que antes (temperatura entre 30 ° y 40 °C, presión parcial de oxígeno entre el 5 % y el 100 %, valor de pH del medio entre pH 6,6 y pH 7,8).

Según otra forma de realización preferida de la presente invención, durante el cultivo de las células MDCK infectadas el medio de cultivo se cambia por medio de cultivo fresco o el volumen de cultivo se aumenta mediante la adición de medio de cultivo fresco. El cambio o el aporte complementario del medio de cultivo también puede realizarse mediante concentrado de medio o constituyentes de medio como, por ejemplo, aminoácidos, vitaminas, fracción de lípidos, fosfatos o sustancias similares. Estas etapas también pueden realizarse varias veces durante el cultivo de las células MDCK.

Sorprendentemente, el crecimiento de las células MDCK no se inhibe significativamente por la multiplicación en muchos sistemas de virus. Especialmente durante la multiplicación de virus de la hepatitis A, rhabdovirus y flavivirus (FSME) se observó un fuerte crecimiento de las células MDCK y de los virus durante el cultivo.

Esto hace posible el aumento del rendimiento de virus mediante múltiples cosechas de virus de sobrenadantes de cultivo, así como especialmente mediante el aumento del volumen de cultivo completo y a este respecto también el recuento de células mediante la adición de medio fresco. Múltiples cosechas correspondientes representan una ventaja significativa del procedimiento según la invención ya que el rendimiento del sistema mejora esencialmente.

Por tanto, los procedimientos según la invención hacen posible por primera vez la multiplicación de virus y células en un sistema de cultivo durante un espacio de tiempo más largo. Así, en algunos ejemplos pudo mostrarse que las células todavía eran viables incluso 28 días después de la infección. Por tanto, la duración de la multiplicación de virus y de células puede elegirse durante un amplio intervalo mediante las condiciones del cultivo celular (adición de medio).

Según la invención se facilitan además procedimientos que comprenden una cosecha y un aislamiento de virus o de las proteínas generadas por éstos. En el caso del aislamiento de los virus o de las proteínas, las células se separan del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales como, por ejemplo, mediante separación, filtración o ultrafiltración. A continuación, los virus o las proteínas se concentran según procedimientos suficientemente conocidos para el experto como, por ejemplo, centrifugación en gradiente, filtración, precipitación, cromatografía, entre otros, y a continuación se purifican. Según la invención se prefiere además que los virus se inactiven durante o después de la purificación. Una inactivación del virus puede realizarse, por ejemplo, mediante β -propiolactona o formaldehído en un punto discrecional dentro del proceso de purificación.

Los procedimientos de acuerdo con la invención proporcionan el componente activo de un fármaco o agente de diagnóstico y son adecuados por tanto de forma especial para la preparación de fármacos, de forma particular para la preparación de vacunas y agentes de diagnóstico.

La preparación del fármaco puede comprender a este respecto la multiplicación y el aislamiento de un virus o de proteína producida por éste y el mezclado con un adyuvante, coadyuvante, tampón, diluyente y/o excipiente de fármaco adecuado. Por adyuvantes se entiende en el marco de la presente invención sustancias que elevan la respuesta inmunitaria. A éstos pertenecen, por ejemplo, hidróxidos de distintos metales como hidróxido de aluminio, constituyentes de la pared celular bacteriana, aceites o saponinas. Las vacunas son especialmente adecuadas para tratamientos

profilácticos o terapéuticos de infecciones virales.

La inmunogenicidad y/o la eficacia de las vacunas correspondientes pueden comprobarse mediante procedimientos conocidos para el experto como, por ejemplo, experimentos protectores con infección de carga o determinación del título de anticuerpos necesario para la neutralización. La determinación de la cantidad de virus o de la cantidad de anticuerpos producidos puede realizarse, por ejemplo, mediante la determinación del título o de la cantidad de antígeno según procedimientos convencionales suficientemente conocidos para el experto como, por ejemplo, valoración de virus, prueba de hemaglutinación, determinación de antígeno o determinación de proteínas del tipo más distinto.

Los procedimientos de acuerdo con la invención son adecuados además para la preparación de una composición diagnóstica. Las composiciones pueden comprender un virus que se obtiene con el procedimiento o una proteína generada por el mismo. En combinación con aditivos y reactivos de detección habituales en el estado de la técnica pueden usarse estas composiciones como ensayo diagnóstico, que es adecuado para la detección de anticuerpo de virus o de anti-virus.

En los siguientes ejemplos, todos los títulos de virus se determinaron según el procedimiento de dilución final conocido para el experto y la determinación del punto final estadístico al 50 % según Spearman-Kaerber (véase Horzinek, Kompendium der allgemeinen Virologie, 2ª edición, 1985, Parey Verlag, páginas 22-33). Se infectaron respectivamente 8 cultivos de prueba en placas de microtitulación con cantidades de 100 µl de una dilución de virus usándose diluciones del material de virus de 10^{-1} a 10^{-8} . La evaluación de las valoraciones de virus se realizó o bien microscópicamente mediante el efecto citopático de los cultivos de prueba o bien con ayuda de procedimientos de detección inmunológicos usando anticuerpos específicos de virus. La unión de los anticuerpos específicos de virus se hizo visible como inmunofluorescencia con anticuerpos marcados con fluoresceína o usando anticuerpos secundarios marcados con biotina y un complejo amplificador de estreptavidina/biotina/peroxidasa, así como un colorante precipitable (Gregersen y col., Med. Microbiol. Immunol., 177: 91-100). La unidad de los títulos de virus es dosis infecciosa de cultivo al 50 % (DIC_{50}). Las células de detección específicas de virus usadas respectivamente para los distintos tipos de virus y, si procede, los procedimientos de detección inmunológica se mencionan en los ejemplos específicos de virus.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Manipulación del sistema de cultivo celular como cultivo en suspensión en etapas de trabajo iniciales y a escala de laboratorio

Células MDCK de viales de células de siembra que estaban guardadas en nitrógeno líquido se descongelaron rápidamente mediante inmersión en un baño de agua e inmediatamente se diluyeron generalmente a aproximadamente 1:100 en medio de cultivo (Ultra CHO con complemento, BioWhittaker, "medio patrón") a un recuento de células de aproximadamente 1×10^5 células/ml. Las células se separaron luego del medio mediante centrifugación (10 minutos a 800 x g), de nuevo se recogieron en medio fresco y se llenaron en frascos de cultivo de centrífuga (100 ml de volumen de trabajo, Bellco o Techne). Estos lotes de cultivo se incubaron a 37 °C en un agitador magnético con 50-60 rpm. El crecimiento de células se comprobó mediante el control del recuento de células. Al alcanzarse recuentos de células de 8×10^5 a como máximo $1,6 \times 10^6$ células/ml, los cultivos se transfirieron mediante dilución de las células en medio patrón y siembra en nuevos frascos de cultivo de centrífuga de 100 a 1000 ml de volumen de trabajo y se incubaron con agitación hasta alcanzar las densidades celulares máximas o deseadas como se ha descrito anteriormente. En estos pases de células, la dilución del cultivo respectivo en el intervalo entre 1:4 y 1:10 se adaptó al crecimiento de células de tal forma que el recuento de células máximo se alcanzara dependiendo de la necesidad en el plazo de 3 a 5 días. Alternativamente se probó el mismo tipo de cultivo sin adición de los complementos al medio y pudo mantenerse sin problemas durante al menos 10 pases.

Ejemplo 2: Manipulación del sistema de cultivo celular como cultivo adherente

Se diluyeron cultivos en suspensión establecidos (véase el Ejemplo 1) en distintos medios de manera que el recuento de células ascendiera aproximadamente a 1×10^5 células/ml, y a continuación se llenaron en una variedad de recipientes de cultivo celular (véase la Tabla 1). El volumen de cultivo celular se correspondió a este respecto con las cantidades habituales para los recipientes de cultivo respectivos, es decir, aproximadamente 4 mm de medio de cultivo por encima de la superficie de siembra o aproximadamente 1 ml de medio por 2,5 cm² de superficie de cultivo. Los cultivos se incubaron generalmente a la temperatura de 37 °C habitual para la mayoría de los cultivos celulares, sin embargo, también fueron posibles desviaciones considerables de la temperatura de incubación sin pérdida significativa (véase la Tabla 1). Los sistemas de cultivo probados, así como los resultados del crecimiento celular alcanzados con ellos, se representan en la Tabla 1 y muestran que este sistema de células se comporta aproximadamente igual y sólidamente en distintos medios y sistemas de cultivo.

Los cultivos de monocapa preparados de esta forma se usaron para la valoración de cosechas de virus en placas de microtitulación, así como para el cultivo de virus bajo el control microscópico o para investigaciones de inmunofluorescencia, pruebas de hemoadsorción y otros procedimientos convencionales virológicos o inmunológicos que pueden realizarse mejor en cultivos de una capa adherentes que en cultivos en suspensión. Además, tales cultivos eran especialmente adecuados para obtener cepas de virus puras mediante purificación en placas o dilución. Finalmente, los cultivos adherentes también se usaron para la multiplicación de virus a pequeña y grande escala; cantidades mayores a

este respecto preferiblemente en frascos rotatorios.

Tabla 1: Crecimiento de células en distintos sistemas de cultivo adherentes

Sistema de cultivo celular	Siembra de células ($\times 10^5$ células/ml)	Medios usados	Aditivos usados	Incubación #	Cultivo confluyente después de .. días ($8-20 \times 10^5$ células/ml)
Frascos de cultivo de plástico	0,8-1,0	MEM, EDM, Opti-MEM*, Ultra CHO*,	1-5 % de SBF o compl.*	33 ó 37 °C	4-5
Frascos de cultivo de plástico	2,0	MEM, EDM, Opti-MEM*, Ultra CHO*,	1-5 % de SBF o compl.*	33 ó 37 °C	2-3
Placas de microtitulación	2,0-4,0	MEM, EDM, Opti-MEM*, Ultra CHO*	0,5-3 % de SBF o compl.*	33 ó 37 °C	1-2
Placas de microtitulación	2,0-4,0	MEM, EDM, Opti-MEM*, Ultra CHO*,	1 % de SBF durante 1 día, luego sin aditivos	37 °C	1
Frascos rotatorios	1,0	EDM, Opti-MEM*, Ultra CHO*,	0,5-3 % de SBF o compl.*	33 ó 37 °C	4-5
Frascos rotatorios	1,0	EDM, Opti-MEM*, Ultra CHO*,	1 % de SBF o compl.* durante 3 días, luego sin aditivos	33 ó 37 °C	5-7
Centrífuga + microsoporte	2,0	BME, MEM, EDM	0,5-3 % de SBF o compl.*	33 ó 37 °C	5-7

BME: medio basal de Eagle; aporte complementario de bicarbonato (2-2,5 % de una solución madre al 5 %)

MEM: medio esencial mínimo; aporte complementario de bicarbonato (2-2,5 % de una solución madre al 5 %)

EDM: medio de Eagle modificado por Dulbecco; aporte complementario de bicarbonato (2-2,5 % de una solución madre al 5 %)

SBF: suero bovino fetal

Compl.: complemento de Ultra CHO

#): Valores ajustados; valores realmente medidos con desviaciones de +2 °C y -3 °C

*): Fabricante: Bio-Whittaker

Ejemplo 3: Aislamiento de virus, obtención y preparación de preparaciones de virus semilla

- 5 Cepas aisladas primarias como, por ejemplo, muestras de órganos, tejidos o de líquidos tisulares que contienen virus, exudados faríngeos o muestras de heces se suspendieron en baño con hielo en medio patrón (son igualmente posibles otros medios discrecionales o tampón fosfato) con adición de antibiótico (PSN: 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de neomicina) y dado el caso se homogeneizaron (finamente trituradas con morteros, cuchillas de escalpelo o un llamado homogeneizador "Douncer" o "Potter"). La suspensión obtenida se filtró con ayuda de
- 10 un filtro adaptador de jeringa habitual de laboratorio con un tamaño de poro de 0,45 µm (para el aislamiento de virus sin cubierta más pequeños también 0,2 µm). El filtrado se inoculó en un pequeño frasco de cultivo (25 cm², véase el Ejemplo 2) con medio de cultivo fresco y adición de antibiótico. Para elevar el rendimiento, varios cultivos se proveyeron de un inóculo de, por ejemplo, 100 µl a 1 ml y a continuación se incubaron a 37 °C. Para las cepas aisladas de virus a partir de las vías respiratorias superiores se recomendó añadir adicionalmente cultivos a una temperatura de incubación más baja de 33 °C.

Ya en cultivo se usaron cepas aisladas de virus puras multiplicadas para la infección directamente en el sistema de cultivo según la invención según el Ejemplo 1 ó 2. Sin embargo, como a este respecto generalmente podía suponerse un alto contenido de virus de la preparación de virus, se usaron cantidades de inóculo más pequeñas de 100 µl o menos. Para las primeras infecciones de este tipo en el sistema de cultivo según la invención se prefirió una MOI (multiplicity of infection, multiplicidad de infección) de 0,1 y 0,01; en caso de resultado no satisfactorio, la infección se repitió con MOI en

20

etapas disminuyendo un factor de 10 de 10 a 0,0001.

Los cultivos infectados se inspeccionaron a continuación diariamente al microscopio en busca de lesiones celulares debidas a virus (CPE, efecto citopático) y se compararon con cultivos de control. Alternativamente, así como en el caso de virus que no producen CPE, el cultivo se investigó para la presencia de determinados antígenos de virus o sus genes (por ejemplo, dependiendo de las pruebas de HA específicas del tipo de virus; ELISA, PCR). Después de 3 a 4 días o un hallazgo positivo (encogimiento de las células, muerte celular, redondeo y solución del césped celular en cultivos adherentes, formación de placas), los sobrenadantes de cultivo centrifugados libres de células se congelaron como muestra, por el contrario, en caso de hallazgo negativo o dudoso, el cultivo completo se ajustó con medio fresco a un recuento de células de 1×10^5 células (dilución de los cultivos en suspensión o tratamiento con tripsina de los cultivos adherentes con posterior dilución de las células individuales) y se incubaron más adelante distribuidas sobre nuevos cultivos. Como esto se correspondió en la mayoría de los medios con una dilución de los cultivos de 1:4 a 1:20, para evitar una multiplicación logarítmica del número de cultivos, a más tardar después del segundo pase de cultivo de este tipo sólo se mantuvo más adelante una parte de los cultivos posibles. Después de 3-4 pases generalmente pudieron aislarse satisfactoriamente cepas aisladas de virus a partir de material de partida adecuado que contenía virus y detectarse.

Para la mayoría de los tipos de virus, dependiendo del contenido de virus y la calidad del material de partida, después de 2-7 días de incubación se estableció un CPE debido a virus (véanse también los ejemplos específicos de virus). Sin embargo, algunos tipos de virus se multiplican muy lentamente o no muestran CPE y, por tanto, deben detectarse mediante pases y duraciones de incubación prolongados o pruebas específicas (los procedimientos respectivamente necesarios se citan en los ejemplos de virus específicos). Como ejemplo de un virus sin CPE con multiplicación lenta que además requiere un sistema de detección especial se remite al ejemplo especial del virus de la hepatitis A. La prueba de detección descrita a este respecto también es adecuada en el uso de antisueros correspondientes para la detección de otros virus, especialmente aquellos sin CPE específico.

Un virus recientemente aislado se usará más adelante apropiadamente sólo después de la triple purificación en placa o la preparación de una cepa aislada pura mediante la llamada técnica de "limited dilution" (dilución limitada). Los procedimientos necesarios para esto correspondientemente al estado de la técnica deben extraerse de libros de texto especializados (véase por ejemplo, B.W. Mahy: Virology-a practical approach; IRL Press, Oxford, 1985).

Si sólo están presentes preparaciones de virus adecuadas de una cepa aislada primaria o como cepa establecida, entonces éstas se usan a continuación para la infección de cultivos de centrifuga para obtener virus semilla homogéneos para los fines de producción. Sin limitarse al objeto de la invención se recomienda realizar inicialmente una primera infección en pequeños cultivos de centrifuga con 100 ml de medio de cultivo con MOI de 10 a 0,00001, preferiblemente 0,1 a 0,0001. Las condiciones más favorables (especialmente en lo referente a MOI y tiempos de cosecha) para conseguir títulos de virus o rendimientos más rápidos y altos se seleccionaron para producir virus semilla en un sistema de cultivo del tamaño necesario – dependiendo de la escala de producción prevista y del número de pasadas de producción – en otro pase de virus. Dependiendo de los rendimientos de virus logrados y del tamaño de producción previsto, la escala para este pase de virus semilla pudo ascender de algunos cultivos de centrifuga en la escala de hasta 1000 ml hasta fermentadores más pequeños hasta aproximadamente 10 litros de volumen o más. El virus cosechado se liberó de restos celulares eventuales mediante filtración o centrifugación y se guardó en alícuotas de pequeñas cantidades adecuadas para la producción a temperaturas a ser posible inferiores a -70°C .

40 **Ejemplo 4: Manipulación del sistema como cultivo de microsoporte adherente para fines de producción**

El cultivo de las células MDCK adherentes se realizó en frascos rotatorios según el Ejemplo 2, Tabla 1, con BME más el 3 % de suero bovino fetal (SBF). Después del cultivo en este sistema, las células se desprendieron de la superficie de los frascos rotatorios. Esto se produjo enzimáticamente con ayuda de una solución de tripsina adecuada con procedimientos habituales conocidos para el experto. Alternativamente, según el Ejemplo 1 se cultivaron células en suspensión en cultivos de centrifuga y se usaron directamente para cubrir el microsoporte.

El fermentador de producción se llenó de microsoportes del tipo Cytodex 3 (Farmacia). Los microsoportes (pesada específica de 5 g/l) se esterilizaron en autoclave y se acondicionaron con medio nutritivo. El procedimiento garantizó una adhesión de las células a la superficie del microsoporte. Las células obtenidas del modo anteriormente descrito se transfirieron al sistema de producción de manera que la densidad celular ascendió a 1×10^5 células/ml. Las células se adhirió a los microsoportes y se cultivaron hasta confluencia o hasta alcanzar una densidad celular de 3×10^6 células/ml.

Después de la fase de cultivo de células, el medio nutritivo existente se cambió por medio nutritivo fresco. Para esto se usó medio nutritivo libre de proteínas. Se realizaron 2 ciclos de lavado.

Un ciclo de lavado estuvo constituido por la desconexión del agitador, la decantación del microsoporte, la extracción del medio nutritivo consumido, la adición de medio nutritivo fresco y la resuspensión del microsoporte. Después de la etapa de lavado, el cultivo celular se mezcló con tripsina (2,5 mg/l).

A continuación se realizó la infección del cultivo celular con virus semilla. Este virus semilla se obtuvo y se usó según el Ejemplo 3. La MOI era a este respecto específica del virus y ascendió a entre 0,1 y 0,000001, preferiblemente entre 0,01

5 y 0,0001. Después de terminar la fase de infección cuya duración se determina, por una parte, mediante el virus específico (véanse los ejemplos específicos), por otra parte, también por la MOI elegida, el agitador se paró y los microspores sedimentaron. El sobrenadante que contenía el virus se extrajo y se purificó de los restos celulares mediante procedimientos de separación adecuados. Para la separación de las células se usaron centrifugas o separadores, filtros y unidades de filtración en contracorriente habituales conocidos para el experto.

Ejemplo 5: Manipulación del sistema como cultivo en suspensión hasta el volumen de producción a la escala de 1000 l usando medio libre de suero

10 El cultivo de cultivos en suspensión para un volumen de producción de 1000 l se realizó con ayuda de frascos de centrífuga (empresa Techne) a pequeña escala de hasta 1000 ml de volumen de cultivo (véase el Ejemplo 1). La densidad celular durante la aplicación de la centrifuga ascendió a 1×10^5 células/ml. Las células se cultivaron en el procedimiento por lotes y se transfirieron a una densidad celular de 1×10^6 células/ml mediante una sencilla dilución en medio fresco en la relación 1:10. Como medio, para el cultivo de células se usó medio libre de suero (UltraCHO, Biowhittaker). A partir de un volumen de 10 l se usaron fermentadores con agitación (30 revoluciones de agitación por minuto) con aireación permanente y control de la temperatura (temperatura de control 37 °C para el cultivo de células), valor de pH (intervalo de control 7,1 a 7,3) y presión parcial de oxígeno (45 al 55 % de pO_2) (detalles técnicos como en la Tabla 2). Correspondientemente a una relación de reacción de 1:10, los volúmenes de ampliación ascendieron a 10 l, 100 l, 1000 l. Los fermentadores alcanzaron a una densidad celular inicial de 1×10^5 células/ml la densidad celular final de 1×10^6 células/ml en un tiempo de 3-4 días. A la escala de 1000 l se realizó adicionalmente un lote alimentado con solución de glucosa (100-200 g/l) para aumentar la densidad celular a 3×10^6 células/ml. Los rendimientos de células logrados se representan comparativamente en la Tabla 2.

Ejemplo 6: Manipulación del sistema como cultivo en suspensión hasta el volumen de producción hasta un volumen de 1000 l usando medio químicamente definido.

25 El cultivo de cultivos en suspensión para un volumen de producción de 1000 l se realizó análogamente a como se describe en el Ejemplo 5. Por el contrario, como medio se usó alternativamente medio químicamente definido (ProCHO4CDM) para el cultivo de células. Demostró ser ventajoso realizar 3 a 5 pases previos para la adaptación en este medio. Los rendimientos de células logrados se representan comparativamente en la Tabla 2.

Ejemplo 7: Manipulación del sistema como cultivo en suspensión hasta el volumen de producción a escala de 1000 l usando medio libre de proteínas

30 El cultivo de cultivos en suspensión para un volumen de producción de 1000 l se realizó análogamente a como se describe en el Ejemplo 5. Como medio se usó medio libre de proteínas (SMIF7, LifeTechnologies) para el cultivo de células. Demostró ser ventajoso realizar 5-10 pases previos para la adaptación en este medio.

Los rendimientos de células logrados se representan comparativamente en la Tabla 2.

Tabla 2: Cultivo de células (MDCK 33016) a escala de producción en fermentador bajo la aplicación de distintos procedimiento y medios

Nº	Procedimiento	Medio	N/T/pO ₂ /pH	X ₀	x
1	Lotes	UltraCHO	30 min ⁻¹ 37 °C 45-55 % 7,1-7,3	1×10^5 ml ⁻¹	1×10^6 ml ⁻¹
2	Lotes alimentados	UltraCHO	30 min ⁻¹ 37 °C 45-55 % 7,1-7,3	1×10^5 ml ⁻¹	$3,1 \times 10^6$ ml ⁻¹
3	Lotes	ProCHO4CDM	30 min ⁻¹ 37 °C 45-55 % 7,1-7,3	1×10^5 ml ⁻¹	1×10^6 ml ⁻¹

Nº	Procedimiento	Medio	N/T/pO ₂ /pH	X ₀	x
4	Lotes alimentados	ProCHO4CDM	30 min ⁻¹ 37 °C 45-55 % 7,1-7,3	1 × 10 ⁵ ml ⁻¹	3,3 × 10 ⁶ ml ⁻¹
5	Lotes	SMIF7	30 min ⁻¹ 37 °C 45-55 % 7,1-7,3	1 × 10 ⁵ ml ⁻¹	1 × 10 ⁶ ml ⁻¹
6	Lotes alimentados	SMIF7	30 min ⁻¹ 37 °C 45-55 % 7,1-7,3	1 × 10 ⁵ ml ⁻¹	3,0 × 10 ⁶ ml ⁻¹
<p>X₀: Densidad celular inicial</p> <p>X: Densidad celular final</p> <p>N/T/pO₂/pH: revoluciones del agitador, temperatura, presión parcial de oxígeno, valor de pH</p>					

Ejemplo 8: Manipulación del sistema en la fase de producción con medio libre de suero

Después del cultivo de cultivos en suspensión hasta la escala de producción según el Ejemplo 5, las células se repartieron en tres fermentadores del mismo volumen 3x1000 l y se llenaron con medio fresco. Con esto cada fermentador contuvo 1/3 de volumen de precultivo y 2/3 de volumen de medio fresco. Se usó el mismo medio que en la fase de cultivo (UltraCHO, BioWhittaker). Después del llenado, el cultivo celular se mezcló con tripsina 10 mg/l.

A continuación se realizó la infección del cultivo celular con un virus semilla (gripe B/Harbin/7/94) a una MOI de 0,001 y otra incubación bajo las mismas condiciones de fermentación que en el cultivo de células, sin embargo a 33 °C durante 96 horas. El sobrenadante que contenía las células se extrajo a continuación y las células se separaron a este respecto mediante un separador. Se realizó otra etapa de filtración mediante filtración en cartucho con un tamaño de poro de 0,45 µm para separar partículas finas adicionales.

Las cosechas de virus se probaron para su contenido de virus con ayuda de procedimientos convencionales en la prueba de HA con el 0,5 % de eritrocitos de pollo y mediante valoración de virus en células MDCK adherentes: el contenido de HA medido ascendió a 1024 unidades, el título de virus se encontró en 10^{8,2} DIC₅₀/ml.

15 Ejemplo 9: Manipulación del sistema en la fase de producción con medios químicamente definidos

La preparación de las células de producción se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 8. Sin embargo, como medio fresco se usó medio químicamente definido (ProCHO4CDM, BioWhittaker). Después del llenado, el cultivo celular se mezcló con tripsina 2,5 mg/l. La posterior infección se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 8.

El contenido de HA medido ascendió a 1024 unidades, el título de virus se encontró en 10^{7,5} DIC₅₀/ml.

20 Ejemplo 10: Manipulación del sistema en la fase de producción con medio libre de proteínas

La preparación de las células de producción se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 8. Sin embargo, como medio fresco se usó medio libre de proteínas (SMIF7, Life Technologies). Después del llenado, el cultivo celular se mezcló con tripsina 2,5 mg/l.

La posterior infección se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 8. El contenido de HA medido ascendió a 1024 unidades, el título de virus se encontró en 10^{7,9} DIC₅₀/ml.

Ejemplo 11: Cultivo e infección con medio químicamente definido

El cultivo de las células se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 6, la infección como se ha descrito en el Ejemplo 9.

Por tanto, el cultivo celular completo del cultivo se realizó hasta la cosecha de la infección en medio químicamente definido.

Ejemplo 12: Cultivo con medio químicamente definido e infección en medio libre de proteínas

5 El cultivo de las células se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 6 en medio químicamente definido, la infección como se ha descrito en el Ejemplo 10 en medio libre de proteínas.

Ejemplo 13: Cultivo e infección en medio libre de proteínas

El cultivo de las células se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 7. La infección como se ha descrito en el Ejemplo 10. Por tanto, el cultivo celular completo del cultivo se realizó hasta la cosecha de la infección en medio libre de proteínas.

10 Ejemplo 14: Descripción general de la purificación de virus

Después de terminar la fase de multiplicación de virus, la cosecha del cultivo celular se filtró mediante un filtro de lecho profundo con un tamaño de poro de 0,45 ó 0,5 µm para separar células y fragmentos de células. Alternativamente, esta separación se realizó con ayuda de un separador. Los virus contenidos en la cosecha clarificada se concentraron y se purificaron en caso de necesidad mediante ultrafiltración, usándose una membrana con un límite de exclusión entre 15 50.000 y 1.000.000, preferiblemente 100.000 a 500.000. El concentrado de virus obtenido se cargó en una columna de cromatografía que estaba empaquetada con CS (sulfatos de celulosa, Millipore). Después de eliminarse los contaminantes mediante lavado con tampón, los virus se eluyeron con una solución de cloruro sódico 0,3 a 3 M. El eluato se desaló mediante ultrafiltración y se concentró más adelante. Alternativamente o en combinación con una purificación cromatográfica puede lograrse un efecto de purificación adicional mediante ultrafiltración. La mayoría de los tipos de virus 20 pueden purificarse además correspondientemente a su densidad de flotación mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa con posterior fraccionamiento del gradiente. Una inactivación del virus con formaldehído o β-propiolactona puede introducirse en un punto discrecional dentro del proceso de purificación, sin embargo se usa preferiblemente después de la concentración o después de la purificación ya que el volumen que va a inactivarse ya está entonces considerablemente reducido.

25 Ejemplo 15: Obtención de preparaciones de virus puras inactivadas para la formulación de vacunas

Se cultivaron flavivirus (virus de la encefalitis centroeuropea, cepa K 23) según el Ejemplo 5, 6 y 7 en distintos medios a una dosis de inoculación de 0,2 MOI (para más detalles véase el Ejemplo 22).

El medio de cultivo que contenía virus cosechado se liberó de restos celulares eventualmente contenidos mediante centrifugación y filtración a través de filtros con un tamaño de poro de 0,45 µm. Por motivos de seguridad, este material ya se inactivo después de la filtración mediante la adición de β-propiolactona en una dilución de 1:2000 ó 1:2500 e incubación a 2-8 °C durante 24 horas. Una prueba de cultivo celular de las preparaciones inactivadas después de 2 horas de hidrólisis del medio de inactivación a 37 °C mostró que hasta un límite de detección de menos de 0,03 unidades infecciosas /ml ya no estaba contenido ningún virus activo.

Para el análisis de las etapas de purificación descritas a continuación se usó un ensayo de BCA (Pierce) para la determinación del contenido de proteína total. El contenido de antígeno específico se determinó con ayuda de un ELISA de tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales específicos contra la E-glicoproteína (Niedrig y col., 1994, Acta Virologica 38: 141-149) y un antisuero policlonal producido por nosotros mismos contra el virus purificado de conejo. Los valores para el material de partida inactivado se usaron a este respecto como valor de referencia (correspondientemente al 100 %).

40 Purificación mediante centrifugación en gradiente:

Las preparaciones de virus inactivadas se purificaron según procedimientos conocidos mediante una ultracentrifugación en gradiente de densidad (15-60 % de sacarosa) a 80.000 x g. A continuación, el gradiente se fraccionó y en muestras de las fracciones se determinó la extinción a 280 nm para la identificación del pico de virus. Se comprobó un fuerte aumento de la extinción respectivamente en el intervalo de una concentración de sacarosa entre el 30 y el 40 %, el máximo se encontró en el 34 y el 35 %. En este intervalo también se midió el mayor contenido de proteína viral específica y la mayor pureza (determinada como relación de la proteína viral con respecto a la proteína total). En total, en estas fracciones de pico se encontró más del 50 % del contenido de antígeno específico comprobado en el material de partida.

Purificación cromatográfica:

50 La preparaciones de virus inactivadas (véase anteriormente) se llevaron a una columna de CS que previamente había sido equilibrada con 5 volúmenes de columna de tampón fosfato 50 mM a pH 7,5. A continuación se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón fosfato para eliminar el material sin unir. El material unido se eluyó a continuación con el mismo tampón fosfato con mezclado escalonado de cantidades crecientes del mismo tampón con adición de NaCl 3 M. En el flujo durante la aplicación del material de virus se encontró analíticamente entre el 3,2 y el 3,9 % del antígeno

específico y el 79 al 83 % de la proteína total. En el tampón de lavado se encontró el 6-11 % de la proteína total y el 0-2,3 % del antígeno. Por tanto, más del 95 % del antígeno se unió al material de la columna. En la elución con NaCl 0,6 a 1,8 M se encontró aproximadamente el 60,0 % del antígeno, la mayor pureza se consiguió a una elución con NaCl 1,2 M. Mayores concentraciones de sal de hasta NaCl 3 M eluyeron pequeñas cantidades adicionales (< 15 %) de antígeno con menor pureza específica.

Purificación mediante combinación de cromatografía y ultracentrifugación

Los eluidos reunidos después de la elución con NaCl 0,6 y 1,2 M de una purificación cromatográfica como se ha descrito anteriormente se sometieron a una ultracentrifugación durante 2,5 horas a 80.000 x g. El sedimento de virus se resuspendió y se analizó en tampón fosfato 50 mM a pH 7,5. La concentración de proteína total de esta preparación se redujo al 0,7 % del contenido inicial, el grado de pureza aumentó diez veces mediante esta etapa.

Esta preparación de virus se sometió a una purificación en gradiente como se ha descrito anteriormente. Después del fraccionamiento se encontró un perfil en gradiente muy similar al que se consiguió después de la purificación en gradiente directa. No obstante, la punta del pico de virus se había desplazado insignificadamente y ahora se encontraba en el 37 % de sacarosa.

15 **Ejemplo 16: Obtención de una cepa aislada de virus y multiplicación de virus de un virus del herpes humano**

Mediante la punción estéril de una eflorescencia de herpes reciente en el estadio de ampolla (ampollas de herpes labial) con una inyección de tuberculina se obtuvo una cantidad mínima de líquido tisular y se suspendió según el Ejemplo 3 en medio patrón con adición de antibiótico y usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm. El filtrado se inoculó en una botella de cultivo con 25 cm² de superficie de cultivo con células MDCK 33016 adherentes en medio patrón y se incubó a 37 °C. Después de 4 días se tomaron muestras de los sobrenadantes y después de 7 días se tomó el sobrenadante completo de los cultivos y se congelaron a < -70 °C. Una muestra tomada después de 4 días era 1:10 y se diluyó más adelante en etapas de diez en medio patrón que contenía 10 µg/ml de tripsina; 100 µl de cada una de estas diluciones se añadieron a células MDCK 33016 células en medio patrón. Después de 13 días de incubación a 37 °C se mostró un CPE en algunos cultivos de la primera etapa de dilución. Los sobrenadantes de estos cultivos se cosecharon y se inocularon de nuevo de forma diluida creciente en nuevos cultivos. Después de 6-9 días, en varias etapas de dilución de estos 3 pases de virus se mostró un CPE crecientemente más claro como placas típicas del virus del herpes. Un cultivo directamente infectado en paralelo con el mismo material de partida con 175 cm² de superficie de cultivo también mostró exclusivamente las mismas placas típicas. Para la posterior clonación del virus se repitió de nuevo este proceso de dilución usándose respectivamente sobrenadantes de cultivos celulares de la última dilución positiva. Además de una cosecha de los sobrenadantes de cultivo, las células restantes se fijaron con el 3 % de solución de formaldehído durante 16 horas, luego se incubaron con el 1 % de Triton X-100 durante 30 minutos y después de los procedimientos convencionales se sometieron a una investigación de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales marcados con FITC específicos contra VHH 1 (nº de producto de Biosoft 17-088). Se mostró que sólo las células en el entorno de la placa presentaban una inmunofluorescencia. Mediante esta detección, así como mediante una detección por PCR específica, la cepa aislada se identificó claramente como el virus del herpes simple 1.

El virus clonado se multiplicó más adelante en cultivos en suspensión en medio patrón y se cultivó a un título de virus suficiente (>10⁶ unidades infecciosas/ml) como se ha descrito en el Ejemplo 3 para dar virus semilla de producción. Las preparaciones de virus semilla contuvieron regularmente títulos de virus entre 10⁷ y 10⁸ DIC₅₀/ml. La determinación de los títulos de virus se realizó según procedimientos convencionales conocidos para el experto en HEP-2 o células Vero, pero también puede realizarse en células MDCK adherentes, realizándose la evaluación de las valoraciones mediante placas típicas. Las preparaciones de virus semilla se tomaron en alícuotas a -70 °C o congeladas por debajo y se usaron para la infección de células de producción. La posibilidad de usar las mismas células MDCK y las mismas condiciones de cultivo en lo referente a los medios y aditivos como para la posterior producción es a este respecto una ventaja considerable ya que los requisitos de documentación en el registro del producto correspondiente se reducen considerablemente y mejora la aceptación del virus semilla.

45 **Ejemplo 17: Producción de virus del herpes humano**

Para la infección de las células de producción según los Ejemplos 8 a 13 con virus del herpes simple 1 (cepa aislada como se ha descrito en el ejemplo anterior) se elige una MOI de 0,1 ó 0,01 y un tiempo de incubación de 48 a 96 horas hasta la cosecha. Sin embargo, de todas formas también pueden usarse MOI más bajas o más altas con tiempo de incubación correspondientemente más largo o más corto, pudiendo variarse algo los rendimientos ya que no siempre se encuentra el momento de cosecha óptimo. Sin embargo, generalmente se prefieren las condiciones anteriormente mencionadas para que los rendimientos de cultivo no se encuentren esencialmente por debajo de 10⁸ de unidades infecciosas de cultivo al 50 %/ml (DIC₅₀/ml) por motivos económicos y para facilitar el posterior procesamiento. Además, este esquema de tiempo puede adaptarse favorablemente a ritmos de trabajo normales. MOI demasiado bajas inferiores a 0,0001 y tiempos de incubación prolongados conducen casi siempre a rendimientos más bajos y, por tanto, son inferiores a los óptimos.

55 **Ejemplo 18: Multiplicación de virus del herpes animal**

El virus del herpes suis (virus de la pseudorabia), cepa "Phylaxia" (cepa de vacuna) se inoculó para la infección de un

cultivo de producción a pequeña escala en cultivos de centrifuga de 100 ml según el Ejemplo 1. La infección del cultivo de producción se realizó a un recuento de células de 1×10^6 células/ml con una MOI de 0,01; la cosecha del sobrenadante de cultivo infeccioso se realizó después de un tiempo de incubación de 3 a 5 días a 37 °C o a 33 °C. Los rendimientos que eran de esperar se encontraron en el intervalo de o claramente superior a 10^8 unidades infecciosas /ml. Pudieron conseguirse títulos comparativamente más altos a diferentes temperaturas de incubación:

- después de 3 días a 37 °C: $10^{8,7}$ DIC₅₀/ml,
- después de 3 días a 33 °C: $10^{8,6}$ DIC₅₀/ml,
- después de 5 días a 37 °C: $10^{7,9}$ DIC₅₀/ml,
- después de 5 días a 37 °C: $10^{8,3}$ DIC₅₀/ml.

10 La valoración de los virus se realizó en estos casos en células CRFK (Crandall feline kidney de riñón felino de Crandall) y después de 7 días se leyeron mediante el efecto citopático.

Ejemplo 19: Multiplicación de adenovirus animales

15 Se inocularon adenovirus (adenovirus caninos 1, cepa de vacuna 269 de CAV-1) para la infección de un cultivo de producción a pequeña escala en cultivos de centrifuga de 100 ml según el Ejemplo 1. La infección del cultivo de producción se realizó a un recuento de células de 1 a $1,5 \times 10^6$ células/ml con una MOI de 0,01, la cosecha del sobrenadante de cultivo infeccioso después de un tiempo de incubación de 3 ó 5 días a 37 °C o a 33 °C. Independientemente de la temperatura de incubación (33 ó 37 °C) y de la duración de la fase de infección (3 ó 5 días) se encontraron títulos casi idénticos de $10^{7,5}$ ó $10^{7,6}$ DIC₅₀/ml en las cosechas.

20 La determinación del rendimiento mediante los títulos de virus se realizó mediante la valoración en células MDCK-33016 adherentes en placas de microtitulación (véase el Ejemplo 2) y se evaluó 7 días después de la preparación mediante el CPE. Los cultivos infectados de la valoración se mantuvieron en medio EME con adición del 2 % de bicarbonato (de una solución madre al 5 %), sin embargo sin adición de suero o proteínas. Este sistema de valoración demostró ser un sistema de detección sensible ya que incluso en las cantidades diluidas más pequeñas el adenovirus se multiplicó todavía muy eficazmente (reconocible en los valores de valoración logrados).

25 Otras preparaciones de infección demuestran la superioridad del sistema de cultivo en suspensión con respecto a una preparación de cultivo adherente del mismo tipo:

30 Se cultivaron cultivos MDCK 33016 adherentes en frascos de cultivo Falcon (175 cm^2) hasta confluencia del cultivo y al alcanzar la misma se infectaron con CAV-1. Para la infección se usó la misma cantidad (MOI= 0,01) de la misma preparación de virus que también se usó para la infección de cultivos en suspensión cultivados en paralelo. Ambos cultivos se cultivaron en el mismo medio (medio patrón) y a partir del momento de la infección se cambiaron mediante cambio de medio a medio libre de complemento. Ambos sistemas de cultivo se incubaron a 37 °C y los sobrenadantes de cultivo se cosecharon 5 días después de la infección. Los sobrenadantes de cultivo libres de células se valoraron como se ha descrito anteriormente en las células MDCK. El rendimiento de virus del sistema adherente ascendió a $10^{6,3}$ DIC₅₀/ml, el de la preparación del cultivo en suspensión a $10^{7,8}$ DIC₅₀/ml, es decir, aproximadamente 30 veces más.

35 Ejemplo 20: Multiplicación de paramixovirus

40 En un modo casi idéntico como se ha descrito en el ejemplo de adenovirus anterior se usó un representante de paramixovirus (ATCC, cepa VR-288). Era diferente el momento de cosecha ya después de 3 días ya que este virus se replica muy rápido, la evaluación de la valoración también se realizó antes, concretamente después de 5 días. Los cultivos que se cultivaron más adelante después de la infección a 37 °C proporcionaron rendimientos de $10^{7,4}$ DIC₅₀/ml; se midieron los mismos títulos cuando la temperatura de incubación se redujo a 33 °C partir del momento de la infección.

Análogamente al adenovirus, para el paramixovirus las células MDCK 33016 demostraron ser un sistema de valoración muy adecuado con replicación de virus eficaz en medio MEM sin adición de suero o de proteínas (aquí también se realizó la adición de bicarbonato).

45 Como se ha descrito en el ejemplo de adenovirus, aquí también se realizó una comparación directa entre cultivos adherentes y en suspensión. El rendimiento máximo en el sistema adherente se encontró en $10^{6,6}$ DIC₅₀/ml después de 96 horas de tiempo de infección, el sistema de cultivo en suspensión dio en comparación con éste rendimientos claramente mejores y más rápidos de $10^{7,3}$ DIC₅₀/ml después de 72 horas.

50 Alternativamente, células MDCK 33016 adherentes según el Ejemplo 2 se infectaron en MEM con el 5 % de SBF con otro virus de la misma familia (PI-3, ATCC VR-93). Los sobrenadantes después de una semana de incubación a 37 °C contuvieron después de la valoración en células CV-1 (ECACC 87032605) al menos 10^6 DIC₅₀/ml, mostraron una hemaglutinación positiva con eritrocitos de cobaya y una inmunofluorescencia positiva con anticuerpos específicos (anti PI-3 MAK-FITC de la empresa Biosoft).

La misma cepa de virus (PI-3, ATCC VR-93) también se usó bajo medios químicamente definidos y libres de proteínas

análogamente al Ejemplo 12 en cultivos MDCK-33016 para la infección. En los días de infección 3, 5, 9 y 12 se extrajeron respectivamente el 22 % del volumen de cultivo y se sustituyeron por medio fresco. En el día 7 se extrajo el 50 % del volumen de cultivo, incluidas las células, y se sustituyó por medio nuevo. Por tanto, en conjunto, el volumen de cultivo se cambió completamente en el transcurso de la infección más de una vez y mediante el aporte complementario de medio se ofreció la oportunidad de multiplicar adicionalmente las células correspondientemente a la dilución. El procedimiento usado se corresponde en conjunto con aproximadamente un pase de 1:2,4 del cultivo, eliminándose solamente los excesos de cantidad. El pase o dilución de los cultivos considerablemente mayor, especialmente posible en la fase inicial, no se aprovechó aquí completamente con diferencia.

Se midieron los siguientes rendimientos de virus:

Día de infección:	3	5	7	9	12	14
log DIC ₅₀ /ml	7,9	8,05	8,25	7,45	6,7	7,0
(Valores medios de pruebas duplicadas)						

Ejemplo 21: Multiplicación de reovirus

Se incubaron cultivos de células MDCK 33016 en suspensión en medio patrón con reovirus de tipo 3 (obtenidos de la empresa Bio Doc, Hannover) a una MOI de 0,01 y se incubaron adicionalmente 3 ó 5 días a 33 °C o 37 °C. Las muestras de los sobrenadantes de cultivo se extrajeron después de 5 y 7 días y se evaluaron en el sistema proporcionado usando células BHK en medio MEM con el 3 % de SBF. La evaluación de las valoraciones se realizó después de 7 días.

Los rendimientos de virus de los cultivos en suspensión después de 5 días ascendieron a 37 °C a 10^{8,1} DIC₅₀/ml, a 33 °C a 10^{8,0} DIC₅₀/ml. Después de 7 días, los títulos en ambas preparaciones de temperatura se encontraron en 10^{8,0} DIC₅₀/ml.

La misma cepa de virus se usó bajo medios químicamente definidos y libres de proteínas análogamente al Ejemplo 12 en cultivos MDCK-33016 para la infección a una MOI de 0,01. En los días de infección 3, 7, y 10 se extrajeron respectivamente el 22 % del volumen de cultivo y se sustituyeron por medio fresco. En el día 7 se extrajo el 50 % del volumen de cultivo, incluidas las células, y se sustituyó por medio nuevo. Por tanto, en conjunto, el volumen de cultivo se cambió casi completamente en el transcurso de la infección y mediante el aporte complementario de medio se ofreció la oportunidad de multiplicar adicionalmente las células correspondientemente a la dilución. El procedimiento usado se corresponde en conjunto con aproximadamente un pase de 1:2 del cultivo, eliminándose solamente los excesos de cantidad. El pase o dilución de los cultivos considerablemente mayor, especialmente posible en la fase inicial, no se aprovechó aquí completamente con diferencia.

Se midieron los siguientes rendimientos de virus:

Día de infección:	3	7	10	14
log DIC ₅₀ /ml:	5,4	7,1	6,6	6,6
(Valores medios de pruebas duplicadas)				

Ejemplo 22: Multiplicación de flavivirus

Se infectaron cultivos de células MDCK 33016 en suspensión con una densidad celular de 1 - 1,5 x 10⁶ células/ml bajo las condiciones habituales (medio patrón, temperatura de cultivo y de infección 37 °C) con el virus de la encefalitis centroeuropea (cepa K23, Niedrig y col., 1994, Acta Virologica 38: 141-149). A diferencia de los ejemplos previos, para la infección se usaron MOI muy variables. Además, los cultivos de infección se mantuvieron parcialmente en medio químicamente definido o en medio sin aditivos que contuvieran proteínas. Se aplicaron distintos procedimientos de cultivo y de cosecha que muestran a modo de ejemplo que con el sistema también pueden conseguirse altos rendimientos con cambio de distintos parámetros e incluso son posibles múltiples cosechas. Estos cambios se resumen en la Tabla 3. La valoración de virus se realizó en células A 549 (ECACC nº 86012804) y se valoró después de 5 días mediante el CPE. Era digno de mención el hecho de que la cosecha repetida de exactamente el mismo cultivo iba respectivamente acompañada de un cambio del medio de cultivo de manera que las células en cada cosecha se proveyeron de medio nuevo y, por tanto, pudieron crecer adicionalmente. Sin esta cosecha, el cultivo no hubiera permanecido viable y productivo durante un espacio de tiempo más largo. Como los cambios de medio frecuentes a cortos intervalos no pudieron compensar la alta capacidad metabólica de los cultivos, se realizaron otros aportes complementarios de medio y aumentos de los cultivos después de 4 ó 5 días de tiempo de infección.

Tabla 3: Multiplicación del virus FSME/K23 en cultivos MDCK 33016 en medio patrón, así como en medios alternativos usando distintas MOI y variantes de cosecha

MOI	Rendimiento ($\log_{10} DIC_{50}/ml$) durante la cosecha después de ... días								Medio
	1	2	3	4	5	6	7	8	Medio usado
<i>Preparaciones con múltiples cosechas con cambio de medio completo:</i>									
2,0		9,0		8,8				8,8	medio patrón
2,0			9,0		(M+30) ⁺			8,4	medio patrón
2,0			6,1		(M+30)			6,1	medio libre de proteínas
0,2			7,8		(M+30)			7,8	medio químicamente modificado
0,2		8,7		8,0				7,7	medio patrón
0,2		8,3		(M+30)	8,6				medio patrón
0,2			9,0		(M+30)	9,0			medio patrón
0,2		8,6		9,2				9,0	medio patrón
0,2		9,0			9,0			8,6	medio patrón
0,2			7,3		(M+30)	8,2			medio libre de proteínas
0,2			7,2		(M+30)	8,6			medio químicamente modificado
<i>Preparaciones con toma de muestras sin cambio de medio o aporte complementario</i>									
$10^{0,3}$	7,7	8,3	9,2	9,4	9,3				medio patrón
(=0,5)									
$10^{0,3}$	6,3	7,5	8,4	8,6	8,9				medio MEM, cultivo <u>adherente</u> , 1 % de SBF
$10^{1,3}$	5,2	6,3	6,6	6,8	6,8				medio patrón, exceso de temperatura mediante agitador
(=0,05)									
$10^{1,3}$	5,1	6,2	7,1	8,0	8,4				medio patrón
$10^{2,3}$	4,8	6,2	7,6	7,5	8,1				medio patrón
$10^{3,3}$	3,4	4,7	4,9	5,6	6,0				medio patrón
$10^{4,3}$	2,7	3,7	4,3	4,3	4,4				medio patrón
$10^{5,3}$	2,5	2,6	3,4	3,7	4,3				medio patrón
⁺ (M+30) significa complementación de medio + 30 % del volumen de cultivo en el día especificado									

Ejemplo 23: Multiplicación de picornavirus

- 5 Se cultivaron cultivos MDCK-33016 adherentes para la infección con virus de la hepatitis A (VHA, cepa HM 175, ATCC VR-1358) en medio MEM con adición del 5 % de suero bovino fetal y bicarbonato (véase el Ejemplo 2). En el marco del experimento se usó además otra cepa aislada de virus "Munich" (véase Frösner y col. 1979; Infection 7: 303-305). El virus se inoculó diluido en el cultivo recientemente preparado y los cultivos se incubaron a 37 °C. En turnos alternos de 3-4 días los cultivos se sometieron a pases adicionales de 1:4.
- 10 Los cultivos de células MDCK-33016 en suspensión se cultivaron en medio patrón según el Ejemplo 1, se inocularon con HM 175 y se incubaron a 33 °C y a continuación se sometieron a pases semanales de 1:10. Las células adherentes y los cultivos en suspensión se mantuvieron adicionalmente durante hasta 35 días después de la infección. Después se realizó

la detección de la replicación de virus activa mediante el CPE (cepa HM 175) o según un procedimiento ya descrito (véase la valoración de virus, página 93 en Gregersen y col. 1988; Med. Microbiol. Immunol. 177: 91-100). Como desviación, como anticuerpo específico de virus se usó un anticuerpo anti-VHA humano como IgG purificada (denominación F 86012, cedido amablemente por la empresa Dade Behring). Como anticuerpo anti-IgG humana con marcación de biotina se usó el número de producto 39015 (Firma Sigma). La detección específica de una multiplicación de virus activa con este sistema proporciona células de color rosa amarronado que pueden reconocerse fácilmente en el microscopio a bajo aumento. Por el contrario, las células negativas para virus aparecen sin teñir o sólo presentan una coloración muy insignificante. Con los mismos procedimientos de detección también se evaluaron valoraciones de virus tres semanas después de la preparación para los que se usaron células diploides humanas (MRC-5) como sistema de cultivo.

En todas las preparaciones de infección anteriormente descritas y con ambas cepas aisladas de virus usadas pudo detectarse una replicación activa de VHA en las células MDCK. En cultivos en suspensión se detectó con la cepa HM 175 una multiplicación de virus sorprendentemente rápida. En el día 7 después de infección, los títulos de virus medidos en el sobrenadante se encontraron en $10^{5.4}$ DIC₅₀/ml; este cultivo se sometió a pases semanalmente mediante dilución simple de 1:10 y a su vez proporcionó títulos de virus similares en los cultivos resultantes después de otros 7 días. Al final del cultivo y después de otros dos pases de células, los títulos de virus se determinaron en una muestra del medio libre de células. Adicionalmente se tomó una muestra del cultivo completo y las células allí contenidas se descompusieron congelando dos veces a -20 °C y descongelando. Los constituyentes celulares se eliminaron mediante centrifugación antes de valorar estas muestras. Los rendimientos de virus obtenidos de esta preparación se resumen en la Tabla 4 y muestran que sin pérdida de los rendimientos específicos es posible decuplicar semanalmente los cultivos, pudiendo cosecharse buenos títulos de virus por unidad de volumen a pesar del enorme aumento de cantidad. A este respecto es digno de mención que se encuentra una proporción considerable de virus en el sobrenadante, lo que también es sorprendente para este virus fuertemente unido a la células (véase la Tabla 4).

Tabla 4: Multiplicación del virus de la hepatitis A (cepa HM 175) en cultivos MDCK 33016 en suspensión bajo multiplicación continua y aumento del volumen de cultivo.

Día después de la infección	Pase de células (aumento del volumen de cultivo)	Volumen de cosecha relativo (día 0 = 1)	Rendimiento total de virus (DIC ₅₀)	
			en el medio	después de la disgregación de las células
7	1:10	1	$10^{7.4}$	$10^{0.8}$
14	1:10	10	$10^{8.5}$	$10^{9.2}$
21	1:10	100	n.d.	n.d.
28	1:10	1000	$10^{10.8}$	$10^{11.4}$
35	Final	10000	$10^{12.5}$	$10^{14.2}$
n.d.: no determinado				

Ejemplo 24: Multiplicación de pneumovirus

Se usaron cultivos MDCK-33016 adherentes en medio MEM con adición del 5 % de SBF y bicarbonato (véase el Ejemplo 2) para la infección con VRS A humano (cepa A-2; ATCC VR-1302). El virus se diluyó 1:100 y se inoculó en cultivo recientemente preparado, el cultivo se incubó luego a 37 °C. Después de una semana, 1 ml del sobrenadante de cultivo se transfirió a un nuevo cultivo y de nuevo se incubó 7 días. El sobrenadante de cultivo cosechado en células MA-104 (ECACC 85102918) valorado muestra en la evaluación de la valoración mediante el CPE un título de virus de $10^{5.5}$ DIC₅₀/ml.

La cepa de virus A-2; ATCC VR-1302 se usó bajo medios químicamente definidos y libres de proteínas análogamente al Ejemplo 12 en cultivos MDCK-33016 para la infección. En los días de infección 3, 5, 7, 9 y 12 se extrajeron respectivamente el 22 % del volumen de cultivo y se sustituyeron por medio fresco. En el día 7 se extrajo el 50 % del volumen de cultivo, incluidas las células, y se sustituyó por medio nuevo. Por tanto, en conjunto, el volumen de cultivo se cambió completamente en el transcurso de la infección más de una vez y mediante el aporte complementario de medio se ofreció la oportunidad de multiplicar adicionalmente las células correspondientemente a la dilución. El procedimiento usado se corresponde en conjunto con aproximadamente un pase de 1: 2,4 del cultivo, eliminándose solamente los excesos de cantidad. El pase o dilución de los cultivos considerablemente mayor, especialmente posible en la fase inicial, no se aprovechó aquí completamente con diferencia.

Se midieron los siguientes rendimientos de virus:

Día de infección:	3	5	7	9	12	14
log DIC ₅₀ /ml	7,85	8,5	7,55	6,55	4,45	n.p.
(Valores medios de pruebas duplicadas) n.p.: muestras no probadas ya que no eran estériles)						

5 La cepa de virus VRS B, ATCC VR-1401, se probó en una preparación del mismo tipo. Para la valoración de virus se usaron a este respecto células Hep-2 (sublínea Hep-2 C, cedida amablemente por Paul-Ehrlich-Institut, anteriormente de Fráncfort) ya que en ellas se desarrollaron mejor los sincitios típicos de virus y, por tanto, se facilitó la evaluación. Se midieron los siguientes rendimientos de virus:

Día de infección:	3	5	7	9	12	14
log DIC ₅₀ /ml	3,7	4,75	7,45	6,3	3,2	3,75
(Valores medios de pruebas duplicadas)						

Ejemplo 25: Multiplicación de rotavirus

10 Se usaron cultivos MDCK-33016 adherentes en medio MEM con adición del 5 % de complemento y bicarbonato (véase el Ejemplo 2) para la infección con el rotavirus simio SA-11 (ATCC, VR-899). El virus se inoculó 1:100 en el cultivo recientemente preparado y éste se complementó con tripsina (0,5-10 µg/ml, preferiblemente 5 µg/ml), el cultivo se incubó luego a 37 °C. Los cultivos se sometieron a pases de 1:4 adicionales en turnos de 3-4 días alternos.

15 Las muestras del cultivo después de la tripsinación se congelaron tres veces sucesivamente (-20 °C) y se descongelaron de nuevo y después se usaron para la valoración de virus. La valoración de virus se realiza en células MA-104 (ECACC 85102918). La evaluación de la valoración se realiza mediante el CPE después de 10 días. En este virus se encontraron títulos de virus óptimos sólo después de 5-10 pases de células dependiendo del contenido de virus del material de partida.

20 Después se realiza la selección del material de partida para la preparación del virus semilla que se prepara análogamente al procedimiento descrito en el Ejemplo 3. El virus semilla se usa entonces como se ha descrito en los Ejemplos 8, 9 ó 10 para la producción, manteniéndose las concentraciones de tripsina allí especificadas para los distintos medios.

25 Las muestras del cultivo después de la tripsinación se congelan sucesivamente tres veces (-20 °C) y se descongelan de nuevo y después se usan para la valoración de virus. La valoración de virus se realiza en células MA-104 (ECACC 85102918). La evaluación de la valoración se realiza mediante el CPE después de 10 días. En este virus se encontraron títulos de virus óptimos sólo después de 5-10 pases de células dependiendo del contenido de virus del material de partida.

Después se realiza la selección del material de partida para la preparación de los virus semilla que se prepara análogamente al modo de proceder descrito en el Ejemplo 3. El virus semilla se usa entonces como se ha descrito en los Ejemplos 8, 9 ó 10 para la producción, manteniéndose las concentraciones de tripsina allí especificadas para los distintos medios.

30 Según otras experiencias se siguió una ruta algo distinta que condujo a mejores resultados. Inicialmente se optimizó adicionalmente la concentración de tripsina usada mediante ensayos en células MA-104 y después se ajustó a 8-20 µg/ml. Además, se aportaron complementariamente concentraciones de EDTA entre 1,6 y 4,4 µg/ml (1,6 a 8 µg/ml de tripsina o 4,4 a 20 µg/ml de tripsina). El virus procedente de estas condiciones optimizadas se valoró como se ha descrito anteriormente - sin embargo, con elevadas concentraciones de tripsina (8 ó 16 µg/ml) y en presencia de EDTA y ya
35 proporcionó títulos óptimos en la lectura de los cultivos después de sólo 5 días. El virus que se obtuvo bajo estas condiciones optimizadas se inoculó después de ajustar la dosis de infección a una MOI de 0,1 ó 0,01 en células MDCK-33016 en suspensión en medio libre de suero (análogamente al Ejemplo 5, sin embargo a escala de 100 ml, 8 µg/ml de tripsina, 1,6 µg/ml de EDTA). Los títulos de virus del sobrenadante de estos cultivos después de 1 día de incubación a 37 °C se encontraron en 10^{6,0} o 10^{6,1} DIC₅₀/ml, después de 2 días en 10^{7,6} ó 10^{6,4} DIC₅₀/ml. A 20 µg/ml de tripsina y 4,4
40 µg/ml de EDTA, después de 1-3 días se encontraron títulos entre 10^{5,8} y 10^{6,0} DIC₅₀/ml. Dos pases más con las muestras cosechadas en el día 2 dieron títulos máximos de 10^{7,5} ó 10^{7,9} DIC₅₀/ml a una MOI de 0,01 y 8 µg/ml de tripsina/1,6 µg/ml de EDTA, de manera que probablemente ha tenido lugar una cierta adaptación que, sin embargo, sólo requirió algunos pases de virus en estos cultivos.

XXX

45

Ejemplo 26: Multiplicación de virus vacunal

Se usaron cultivos MDCK-33016 adherentes en medio MEM con adición del 5 % de SBF y bicarbonato (véase el Ejemplo 2) para la infección con virus vacunal (cepa WR, ATCC VR-119). El virus se inocula en el cultivo recientemente preparado, el cultivo se incuba luego a 37 °C. Después de 5 días se usa una muestra del sobrenadante de cultivo cosechado para una valoración de virus.

Los cultivos de células MDCK-33016 en suspensión se cultivan en medio patrón según el Ejemplo 1 y se inoculan con virus vacunal bajo dilución 1:1000. En otra incubación del cultivo infectado se toman muestras a intervalos de 2 días y se valoran.

La valoración de virus se realiza en células Vero ("WHO-Seed", que puede obtenerse de ECACC). La evaluación de la valoración se realiza mediante el CPE después de 5 días. Se encontraron títulos de virus superiores a 10^6 DIC₅₀/ml a una MOI de 0,01 ya después de 2-3 días.

Ejemplo 27: Multiplicación de rabdovirus

Se sembraron cultivos en suspensión en medio patrón según el Ejemplo 1 en frascos de cultivo celular con una densidad celular de 1×10^6 células por ml de medio. Después de crecer los cultivos se infectaron respectivamente dos cultivos con una MOI de 0,01 y un cultivo con una MOI de 0,001 con un virus de la rabia (cepa Pitman-Moore, cepa de virus de la vacuna). Los cultivos se incubaron a 37 °C y se desprendieron cada 4 ó 3 días con tripsina y se sometieron a pases en la relación 1:10 (después de 4 días) o 1:8 (después de 3 días) y así se mantuvieron durante 18 días (véase la Tabla 5). El éxito de la infección se siguió en cada pase. Un cultivo se proveyó de una solución de formalina al 3,5 % y se incubó durante tres días a temperatura ambiente en esta solución para conseguir una inactivación de los virus. Después de eliminar la solución de formalina, el cultivo se lavó con PBS y se incubó 25 minutos con un 1 % de Triton X100 en PBS a temperatura ambiente. Después de eliminarse esta solución se lavó tres veces con PBS y se aplicó un anticuerpo marcado con FITC contra el virus de la rabia (50 µl 1:400 de FITC anti-IgG de la rabia de conejo diluida, Dade Behring, OSHY 005). Después de 90 minutos de incubación a 37 °C se lavó de nuevo con PBS y el cultivo se evaluó bajo un microscopio de fluorescencia invertido.

Alternativamente, después de los procedimientos convencionales se realizaron valoraciones de virus de los sobrenadantes de cultivo en células MRC-5 que también se evaluaron después del pretratamiento con formalina/Triton mediante inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente. Mediante los títulos de virus logrados con este sistema se hizo una correlación aproximada de los rendimientos en el procedimiento de preparación correspondiente usando cultivos MRC-5 para una vacuna humana autorizada (rabivac) que hace posible una orientación sobre cuánto antígeno de vacuna está contenido por ml de cosecha de cultivo (véase la Tabla 5).

Ambas preparaciones (MOI 0,01 y 0,001) ya mostraron después de 4 días resultados positivos y después de un transcurso de infección similar, no obstante, a la menor MOI el transcurso de la infección se ralentizó ligeramente - reconocible en los títulos de virus que se encontraron más bajos hasta el día 11 a aproximadamente 1,2 a 0,5 log DIC₅₀. A partir del 3^{er} pase de los cultivos en el día 11, en todos los cultivos se mostró una inmunofluorescencia específica muy intensa con destrucción celular incipiente que después siguió aumentando hasta que en el transcurso del 5^o pase en el día 18 se había destruido completamente una gran parte de las células, de manera que finalizó la infección. El contenido de virus específico creció continuamente hasta el día 14 para después disminuir de nuevo debido a la creciente destrucción celular. Los resultados de este transcurso de la infección se resumen en la siguiente tabla y muestran que - medidos en la multiplicación de virus conocidamente lenta de la rabia - es de esperar una multiplicación de virus muy rápida sin adaptación en estas células, pudiendo cosecharse buenos rendimientos de antígeno a pesar de la remultiplicación continua de las células a intervalos regulares y repetidamente.

Tabla 5: Multiplicación del virus de la rabia en cultivos MDCK 33016 con aumento continuo del volumen de cultivo

Día después de la infección	Pase de las células	Volumen de cultivo relativo	Antígeno de la rabia (dosis de vacuna/ml)
4	1:4	1	Sin determinar
7	1:3	4	Sin determinar
11	1:4	12	0,2-0,4
14	1:3	36	0,4-0,5
18	No aplicable	108	0,4-0,5

Similarmente, el mismo virus se inoculó directamente en cultivos en suspensión según el Ejemplo 1, usándose adicionalmente una MOI de 0,0001. A su vez se usó exclusivamente medio patrón para todo el transcurso de la infección

5 y los cultivos también se transfirieron semanalmente dos veces a 1:8 ó 1:10. La transferencia se realizó a este respecto respectivamente sólo mediante dilución simple de las células en medio fresco y cultivando de nuevo. El éxito de la infección se siguió a este respecto tan sólo mediante valoraciones de virus en células MRC-5 como se ha descrito anteriormente. Las infecciones proporcionaron a las tres MOI ya después de 4 días títulos de virus positivos en el sobrenadante de cultivo. Los títulos de virus aumentaron de pase a pase después de las pérdidas por dilución iniciales después del 7º día y a pesar de la dilución exponencial realizada una y otra vez continuamente, pero no condujeron a destrucción celular excesiva en estos cultivos en suspensión. La infección se siguió hasta el 8º pase (día 28 después de la infección) y luego se interrumpió.

10 Las muestras de virus de estas infecciones se congelaron como virus semilla y se usaron para una nueva infección de cultivos en suspensión empezando con 100 ml y también en medio patrón y bajo las mismas condiciones de pase que se han descrito anteriormente. La MOI se redujo en este caso a 0,000025. La infección se mantuvo durante 6 pases de células (21 días). En títulos de virus lentamente crecientes a pesar de las excesivas diluciones de pases, al final de este transcurso de infección se midieron títulos de virus que convertidos dieron aproximadamente 0,3 dosis de vacuna por ml de sobrenadante de cultivo. Si el volumen de cultivo total se hubiera sometido realmente a más pases y no respectivamente sólo una parte del mismo, después de los 6 pases se hubieran cosechado aproximadamente 500 litros de cultivo, el rendimiento de virus se hubiera correspondido a este respecto con aproximadamente 150.000 dosis de vacuna.

Ejemplo 28: Multiplicación de togavirus

20 Se usan cultivos MDCK-33016 adherentes en medio patrón o en EME con adición del 5 % de SBF y bicarbonato (véase el Ejemplo 2) para la infección con virus de la encefalitis japonesa (ATCC VR-343). El virus se inocula disuelto con una MOI de 0,1 a 0,001 en el cultivo recientemente preparado, el cultivo se incuba luego a 33 °C o alternativamente a 37 °C. La multiplicación de virus activa se detecta mediante inmunofluorescencias con antisuero específico en células fijadas en acetona y el momento de la presencia máxima de antígeno de virus se determina en función de la MOI usada. La valoración de virus de las cosechas de virus del sobrenadante se realiza en células Vero y también se evalúa con ayuda de la inmunofluorescencia. Alternativamente a la inmunofluorescencia, análogamente al Ejemplo 23 (multiplicación de picornavirus descrita para el virus de la hepatitis A) puede usarse un sistema de avidina-biotina-peroxidasa para la detección del virus y para la evaluación de las valoraciones.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la preparación de un componente activo de una vacuna en ausencia de suero, comprendiendo etapas que en las que
- 5 (a) se infectan células MDCK con un virus, tratándose el virus de un virus de la gripe de un aislado primario, que se multiplicó previamente en cultivo celular para obtener un virus de siembra homogéneo para fines productivos,
- (b) las células MDCK en cultivo en suspensión se cultivan a escala industrial en condiciones que hacen posible una multiplicación de los virus,
- realizándose el cultivo en un volumen de al menos 30 l.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células en la etapa (a) crecen adheridas o en suspensión.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el componente activo es un virus.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el virus presenta un genoma viral que comprende una secuencia que codifica una proteína heteróloga funcional con un tamaño de al menos 10 kDa.
- 15 5.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el componente activo es una proteína que se generó del virus.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la multiplicación de los virus se lleva a cabo en un sistema de perfusión.
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la multiplicación de los virus se lleva a cabo en un sistema por lotes.
- 20 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las células MDCK se cultivan para la multiplicación de los virus a temperaturas entre 30 y 40° C.
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las células MDCK se cultivan para la multiplicación de los virus a una presión parcial de oxígeno entre 35 y 60%.
- 25 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el valor del pH del medio se encuentra para la multiplicación de los virus entre pH 6,8 y pH 7,8.
- 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las células MDCK se infectan con el virus a un valor m.o.i. entre 10^8 y 10.
- 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las células se cultivan al menos de 2 a 28 días tras la infección.
- 30 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque durante el cultivo de las células MDCK se añade medio fresco, concentrado de medio o componentes del medio.
- 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las células MDCK durante la multiplicación de los virus se multiplican en medio sin suero con cambio del medio de cultivo o mediante adición de medio de cultivo fresco.
- 35 15.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se repite el cambio del medio de cultivo o la adición de medio de cultivo fresco durante la multiplicación de los virus.
- 16.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque los virus o una proteína generada por estos virus se aíslan del cultivo celular.
- 40 17.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque para el aislamiento de los virus o de la proteína se separa al menos una parte del medio de cultivo de al menos una parte de las células MDCK.
- 18.- Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque la separación se realiza mediante un filtro de lecho profundo o un separador.
- 19.- Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque los virus se obtienen del sobrenadante de cultivo o de células MDCK.
- 45 20.- Procedimiento según la reivindicación 19, caracterizado porque la purificación comprende una ultracentrifugación para la concentración de los virus.

21.- Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque la purificación comprende una cromatografía.

22.- Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque los virus se inactivan durante o tras la purificación.

5 23.- Procedimiento para la preparación de una vacuna, en el que se genera un componente activo según un procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes y en el que se mezcla además según la etapa (c) el componente activo, que se multiplicó en el cultivo, con un adyuvante, coadyuvante, tampón, diluyente o vehículo de fármaco adecuado.