

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 557**

51 Int. Cl.:
C12N 5/09 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05857088 .8**
96 Fecha de presentación: **16.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1831353**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54 Título: **Línea celular MDCK no tumorigénica para propagar virus**

30 Prioridad:
23.12.2004 US 638166 P
05.01.2005 US 641139 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.06.2012

73 Titular/es:
MedImmune, LLC
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878 , US

72 Inventor/es:
SCHWARTZ, Richard;
BERRY, John, Michael;
SUBRAMANIAN, Ajit y
SHI, Xiao

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

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).

ES 2 382 557 T3

DESCRIPCIÓN

Línea celular MDCK no tumorigénica para propagar virus.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formulaciones de medios y métodos de cultivo para la propagación de las células MDCK no tumorigénicas así como a métodos para mantener la naturaleza no tumorigénica de las líneas celulares de la invención. La presente invención se refiere además a procedimientos para la producción de virus influenza en cultivo celular usando células MDCK no tumorigénicas. La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de composiciones inmunogénicas que contienen virus de este tipo y/o componentes de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

15 La vacunación es la medida de salud pública más importante para prevenir la enfermedad provocada por las epidemias anuales de gripe. El uso eficaz de las vacunas depende de poder producir rápidamente grandes cantidades de material de vacuna (por ejemplo, virus) a partir de una fuente estable y fácil de cultivar. El desarrollo rápido de las vacunas y su disponibilidad abundante son críticos en la lucha contra muchas enfermedades humanas y animales. Los retrasos en la producción de vacunas y la escasez en su cantidad pueden provocar problemas al abordar los brotes de la enfermedad. Por ejemplo, recientes estudios sugieren que hay un motivo de preocupación referente a los largos plazos de entrega requeridos para producir vacunas contra la gripe pandémica. Véase, por ejemplo, Wood, J. M., 2001, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356:1953. La producción eficaz de vacunas requiere el crecimiento de grandes cantidades de material de vacuna producido en altos rendimientos a partir de un sistema huésped. Diferentes materiales de vacuna requieren diferentes condiciones de crecimiento con el fin de obtener rendimientos aceptables. Puede producirse material de vacuna en huevos embrionados, células de cultivo tisular primarias o en líneas celulares establecidas. Sin embargo, estos sistemas huésped padecen actualmente varias limitaciones detalladas a continuación.

25 Se usan normalmente huevos embrionados para la producción de virus de vacunas contra la gripe en un proceso intensivo de tiempo, trabajo y coste que necesita el manejo de la cría de pollos y la fertilización de huevos. Además, la vacuna contra la gripe producida en huevos está contraindicada para personas con alergias al huevo debido a la reacción de hipersensibilidad inmediata grave que puede producirse. Por tanto, la industria de las vacunas ha realizado un esfuerzo para desarrollar plataformas de producción alternativas que no utilizan huevos tales como producir la vacuna contra la gripe en un sistema de cultivo celular.

30 El uso de células de cultivo tisular primarias se ve obstaculizado por las dificultades encontradas en el desarrollo y el mantenimiento de una población de células primarias estables. A menudo, se usan líneas celulares establecidas para sortear las limitaciones técnicas de las células primarias. Sin embargo, se sabe que muchas de estas líneas celulares son tumorigénicas y como tales surgen problemas de seguridad y se ven sometidas a limitaciones regulatorias significativas con respecto a su uso para la producción de vacunas. De hecho, las directrices aplicables de la Organización Mundial de la Salud indican que sólo unas pocas líneas celulares están permitidas para la producción de vacunas. Surgen problemas adicionales del uso de aditivos de suero y/o proteína derivados de fuentes animales o humanas en medios de cultivo celular. Por ejemplo, se conocen bien la variabilidad en la calidad y composición entre lotes de aditivos y el riesgo de contaminación con micoplasmas, virus, agentes de BSE y otros agentes infecciosos. En general, el suero o las sustancias derivadas del suero como albúmina, transferrina o insulina pueden contener agentes no deseados que pueden contaminar el cultivo y los productos biológicos producidos a partir del mismo. Por tanto, muchos grupos están trabajando para desarrollar condiciones de cultivo y sistemas huésped eficaces que no requieren suero o productos derivados del suero.

45 En consecuencia, ha habido una demanda para el establecimiento de una línea celular no tumorigénica útil para la producción de materiales de vacuna de una manera estable, altamente segura y de bajo coste preferiblemente en condiciones de cultivo libre de suero o libre de proteínas animales. Un sistema celular de este tipo sería particularmente útil para la producción de material de vacuna contra la gripe.

50 Se han usado tradicionalmente células de riñón canino Madin Darby (MDCK) para la titulación de virus influenza (Zambon M., en *Textbook of Influenza*, ed Nicholson, Webster y Hay, cap. 22, págs. 291-313, Blackwell Science (1998)). Estas células se establecieron en 1958 a partir del riñón de un cocker spaniel macho normal. En la ATCC figura que la línea MDCK (CCL 34) ha sido depositada por S. Madin y N. B. Darby, sin embargo, están disponibles otros numerosos linajes de células MDCK. Leighton J y sus colaboradores publicaron una serie de artículos (Leighton *et al.*, 1968, *Science* 163:472; Leighton *et al.*, 1970, *Cancer* 26:1022 y Leighton *et al.*, 1971 *Europ J. Cancer* 8:281) que documentan las características oncogénicas de las células MDCK. Sin embargo, el linaje y el número de pases de las células MDCK para estos estudios no se describió y ya se sabía que células MDCK de diferentes linajes y diferentes pases mostraban cambios en el número y la estructura de los cromosomas (Gauth *et al.*, 1966, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122: 93 1) que podrían dar como resultado células con propiedades tumorigénicas.

Puesto que una de las principales consideraciones para la aceptabilidad de una línea celular para la producción de

vacunas se refiere al potencial maligno de esas células, el uso de células MDCK para la producción de material de vacuna usando líneas celulares descritas en la actualidad es limitado. Groner *et al.* (patente estadounidense 6.656.720) y Makizumi *et al.* (patente estadounidense 6.825.036) pretenden ambos dar a conocer líneas celulares derivadas de células MDCK que se han adaptado a crecer en medios libre de suero en suspensión y que pueden utilizarse para la producción de virus influenza. Sin embargo, se ha notificado que hay una correlación entre la pérdida del requisito de anclaje y la transformación de células animales normales a células que son tumorigénicas (Stiles *et al.*, 1976, Cancer Res., 36:3300). Varios grupos (Kessler *et al.*, 1999, Cell Culture Dev Biol Stand, 98:13; Merten *et al.*, 1999, Cell Culture Dev Biol Stand, 98:23 y Tree *et al.*, 2001, Vaccine, 19:3444) pretenden describir el uso de células MDCK para la producción a gran escala de virus influenza; sin embargo, no abordan la posible transformación de las células MDCK usadas.

La mención o discusión de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que tal es técnica anterior a la presente invención. Además, la mención de una patente no debe interpretarse como una admisión de su validez.

Sumario de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. También se proporcionan en el presente documento células MDCK no tumorigénicas que se han adaptado a crecer en formulaciones de medios que o bien contienen suero o bien libres de suero incluyendo formulaciones libres de proteínas animales (APF). En una realización, las células MDCK no tumorigénicas de la invención son adherentes. En otras realizaciones, las células MDCK no tumorigénicas de la invención tienen una morfología epitelial. Aún en otra realización, las células MDCK no tumorigénicas de la invención son adherentes y tienen una morfología epitelial. La tumorigenicidad, en una realización, se determina mediante el modelo de ratón desnudo adulto (por ejemplo, Stiles *et al.*, 1976, Cancer Res, 36:1353, y ejemplo 2 más adelante). La tumorigenicidad también puede someterse a prueba mediante otros ensayos, por ejemplo, mediante inyección en un embrión de pollo y/o aplicación tópica al corioalantoides (Leighton *et al.*, 1970, Cancer, 26:1024).

Los virus que pueden crecer en las células MDCK de la invención incluyen pero no se limitan a virus de ARN de cadena negativa, incluyendo pero sin limitarse a virus influenza, VRS, parainfluenza 1, 2 y 3, y metapneumovirus humano.

La presente invención proporciona métodos y formulaciones de medios útiles para la derivación y el mantenimiento de células MDCK no tumorigénicas. Las células MDCK de la invención son particularmente útiles para la producción de material de vacuna tal como, por ejemplo, virus.

Otros aspectos de la invención incluyen métodos de producción de material de vacuna (por ejemplo, virus) cultivando cualquier célula MDCK de la invención, en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permiten la producción de material de vacuna y aislando el material de uno o más de la célula huésped o el medio en el que se hace crecer.

También se describen en el presente documento composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, composiciones inmunogénicas que comprenden el material de vacuna producido tal como se describió anteriormente y, opcionalmente, un excipiente tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable o uno o más componentes de administración farmacéuticamente aceptables.

También se describen en el presente documento métodos de producción de respuestas inmunogénicas en un sujeto a través de la administración de una cantidad eficaz de una o más de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente a un sujeto están también dentro de la presente invención. Adicionalmente, se describen también en el presente documento métodos de tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección viral (por ejemplo, gripe viral) en un sujeto a través de la administración de una o más composiciones inmunogénicas descritas anteriormente en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunogénica contra la infección viral. Los sujetos para tal tratamiento pueden incluir mamíferos (por ejemplo, seres humanos). Adicionalmente, tales métodos pueden comprender también la administración de una composición de uno o más virus producidos en las células MDCK de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable que se administra al sujeto en una cantidad eficaz para tratar profiláctica o terapéuticamente la infección viral.

Estos y otros objetos y características de la invención y los aspectos adicionales descritos en el presente documento resultarán más completamente evidentes cuando se lee la siguiente descripción detallada conjuntamente con el apéndice de figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Crecimiento de cepas de influenza en células. El panel A es una fotografía que muestra los resultados de un ensayo de foco fluorescente que compara la propagación de la infección de una cepa de influenza *ca/ts* representativa en células MDCK y un clon de células Vero (27F9). El panel B es una curva de crecimiento de la cepa de influenza *ca A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)* en células MDCK. Los títulos alcanzaron un máximo a las 48 horas tras la infección a $\sim 8 \log_{10}$ TCID₅₀/ml y permanecieron estables durante los siguientes 3 a 4 días.

La figura 2 explica resumidamente el procedimiento usado para la derivación de PreMCB de MDCK-S (pase n.º 57). El procedimiento se describe en detalle en el ejemplo 2.

La figura 3 es una fotografía que muestra que las células MDCK-S tienen una morfología de tipo epitelial. La foto se tomó 3 días tras la siembra.

5 La figura 4 es la curva de crecimiento de células MDCK-S en medio DMEM con FBS al 10%. Las células tenían una fase de latencia de aproximadamente 1 día seguida por crecimiento exponencial entrando en la fase estacionaria en el día 4 tras la siembra y logrando una densidad máxima de $\sim 29 \times 10^6$ células en el día 5.

10 La figura 5 es un gráfico del consumo de glucosa y la producción de lactato de células MDCK-S en medio DMEM con FBS al 10%. Las tasas eran bajas durante la fase de latencia aumentando hasta 2,93 mM/día y 3,43 mM/día para glucosa y lactato, respectivamente.

La figura 6 es un gráfico del consumo de glutamina y de la producción de tanto glutamato como amoníaco de células MDCK-S en medio DMEM con FBS al 10%. La tasa de consumo de glutamina fue de 0,49 mM/día hasta el día 4 y la tasa de producción de amoníaco fue de 0,32 mM/día hasta el día 5. No se acumuló glutamato en este estudio.

15 La figura 7 es un diagrama de las distribuciones del número de cromosomas en 100 células MDCK-S con bajo número de pases (P61/4) y alto número de pases (P81/24) en metafase. El recuento de cromosomas osciló entre 70 y 84 por metafase con un número modal de cromosomas de 78 para las células con número de pases tanto alto como bajo.

La figura 8 explica resumidamente el procedimiento usado para la derivación de PreMCB de MDCK-T (n.º de pase 64/5). El procedimiento se describe en detalle en el ejemplo 3.

20 La figura 9 es una fotografía que muestra que las células MDCK-T tienen una morfología de tipo epitelial. La foto se tomó 3 días tras la siembra.

La figura 10 es la curva de crecimiento de células MDCK-T en medio de Taub. Las células no tenían fase de latencia y estaban en crecimiento exponencial hasta que entraron en la fase estacionaria en el día 4 tras la siembra.

25 La figura 11 es un gráfico del consumo de glucosa y la producción de lactato de células MDCK-T en medio de Taub. Durante la fase exponencial, las tasas fueron de 1,78 mM/día y 2,88 mM/día para glucosa y lactato, respectivamente.

30 La figura 12 es un gráfico del consumo de glutamina y la producción de tanto glutamato como amoníaco de células MDCK-T en medio de Taub. La tasa de consumo de glutamina fue de 0,36 mM/día hasta el día 4 y la tasa de producción de amoníaco aumentó linealmente hasta el día 7 a una tasa de 0,22 mM/día. No se acumuló glutamato en este estudio.

La figura 13 es un diagrama de las distribuciones del número de cromosomas en 100 células MDCK-T con bajo número de pases (P61/4) y alto número de pases (P81/24) en metafase. El recuento de cromosomas osciló entre 52 y 82 por metafase para células con bajo número de pases y entre 54 y 82 para células con alto número de pases.

35 La figura 14 es un diagrama de las distribuciones del número de cromosomas en 100 células MDCK-T, MDCK-SF101 (pase 71/9) y MDCK SF102 (pase 71/9) en metafase. Tanto células SF101 como SF102 tenían un número modal de cromosomas de 78, oscilando el recuento de cromosomas entre 70 y 82 y 60 y 80 por metafase para SF101 y SF102, respectivamente.

La figura 15 es una fotografía que muestra que MDCK-SF103 tienen una morfología de célula de tipo epitelial. La foto se tomó 3 días tras la siembra.

40 La figura 16 es la curva de crecimiento de células MDCK-SF103 en MediV SF103. Las células tenían una fase de latencia de aproximadamente 1 día seguida por crecimiento exponencial entrando en la fase estacionaria en el día 4 tras la siembra y logrando una densidad máxima de $\sim 17 \times 10^6$ en el día 4.

45 La figura 17 es un gráfico del consumo de glucosa y la producción de lactato de células MDCK-SF103 en MediV SF103. Durante la fase exponencial, el consumo de glucosa y la producción de lactato se correlacionaban entre sí aumentando la concentración de lactato a medida que la concentración de glucosa disminuía.

La figura 18 es un gráfico del consumo de glutamina y la producción de tanto amoníaco como glutamato de células MDCKSF103 en MediV SF103. La tasa de producción de amoníaco aumentó casi linealmente hasta el día 7. No se acumuló glutamato en este estudio.

50 La figura 19 es un diagrama de las distribuciones del número de cromosomas en 100 células MDCK-SF103 en metafase en el pase 87. Las células SF103 tenían un número modal de cromosomas 78, oscilando el recuento de cromosomas entre 66 y 80.

Figura 20. Crecimiento a escala de producción y purificación. El panel A es un diagrama del rendimiento obtenido para varias cepas reordenantes de vacuna, B/Victoria/504/2000 (~8 LogTCID 50/ml), A/Sydney/05/97 (~7,85 LogTCm 50/ml) y A/New Caledonia/ 20/99 (~8,2 LogTCID 50/ml), a partir de matraces de agitación de 250 ml de MDCK-SF103 hechas crecer sobre perlas Cytodex. El panel B explica resumidamente un procedimiento de aumento a escala del cultivo celular que puede utilizarse para la producción a escala comercial de material de vacuna.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que pueden cultivarse células MDCK en condiciones en las que siguen siendo no tumorigénicas. También se proporcionan en el presente documento líneas celulares no tumorigénicas, incluyendo líneas celulares MDCK y otros tipos de células que se han adaptado a una variedad de condiciones de cultivo celular incluyendo formulaciones de medios libres de suero y se denominan en el presente documento "células de la invención". La presente invención proporciona composiciones de cultivo celular que comprenden células de la invención y otros componentes incluyendo medios tal como se da a conocer en el presente documento y, por ejemplo, componentes de medios, tampones, compuestos químicos, tipos de células adicionales, material viral (por ejemplo, genomas virales, partículas virales) y proteínas heterólogas. La presente invención también proporciona métodos y formulaciones de medios útiles para el cultivo de células MDCK no tumorigénicas, con una o más características específicas incluyendo pero sin limitarse a no ser tumorigénicas (por ejemplo, no formar nódulos en un ratón desnudo) y/o crecer como células adherentes y/o tener una morfología de tipo epitelial y/o soportar la replicación de diversos virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus y flavovirus. Las condiciones de cultivo de la presente invención incluyen formulaciones de medios que contienen suero y libres de suero, así como formulaciones libres de proteínas animales (APF). Además, la presente invención también proporciona métodos de producción de material de vacuna (por ejemplo, virus influenza) en células MDCK no tumorigénicas, y de preparación de material de vacuna a partir de células no tumorigénicas. Las células de la invención son particularmente útiles para la producción de cepas de influenza adaptadas al frío/sensibles a la temperatura/atenuadas (*ca/ts/att*) ("*cold adapted/temperature sensitive/attenuated*") (por ejemplo, las de FluMist®) que no se replican tan eficazmente en otras líneas de celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, PerC6, HEK-293, MRC-5 y WI-38).

Características de las células

Las células también descritas en el presente documento son células de vertebrados. En otra realización, las células también descritas en el presente documento son células de mamífero, por ejemplo, de hámsteres, ganado, monos o perros, en particular células de riñón o líneas celulares derivadas de éstas. Según la invención, las células son células MDCK (por ejemplo, derivadas de MDCK CCL-34 de la ATCC) y se denominan específicamente en el presente documento "células MDCK de la invención" y están abarcadas por el término "células de la invención". En una realización específica, las células de la invención se derivan de MDCK CCL-34 de la ATCC. Las células de la invención pueden derivarse de células MDCK CCL-34 mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en primer lugar, se realizan pases de las células MDCK CCL-34 un número limitado de veces en un medio que contiene suero (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + un 10% de suero bovino fetal (FBS) + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l, u otros medios descritos en el presente documento) seguido por clonación de células individuales y caracterización de los clones. Se seleccionan clones con propiedades biológicas y fisiológicas superiores incluyendo, pero sin limitarse a, tiempos de duplicación, perfil de tumorigenicidad y producción de virus, para la generación de un banco de células maestras (MCB). En un aspecto, las células de la invención están adaptadas a crecer en un medio de elección (por ejemplo, un medio libre de suero o APF, tales como los descritos en el presente documento). Tal adaptación puede producirse antes de, simultáneamente con o posteriormente a la clonación de células individuales. En ciertas realizaciones, las células de la invención están adaptadas a crecer en MediV SF101, MediV SF102, MediV SF103, MediV SF104 o MediV SF105. Las células de la invención adaptadas a crecer en estos medios se denominan en el presente documento células "MDCK-SF101, MDCK-SF102, MDCK-SF103, MDCK-SF104 y MDCK-SF105", respectivamente y "células MDCK-SF" en conjunto. En otras realizaciones, las células de la invención están adaptadas a crecer en medios que contienen suero (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + un 10% de suero bovino fetal (FBS) + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l), tales células se denominan en el presente documento células "MDCK-S". Las células MDCK-SF y MDCK-S también están abarcadas por los términos "células de la invención" y "células MDCK de la invención".

En una realización específica de la invención, las células son de las líneas celulares que incluyen, pero no se limitan a, las que se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) y a las que se les ha asignado los números de depósito de la ATCC PTA-6500 (depositada el 5 de enero de 2005), PTA-6501 (depositada el 5 de enero de 2005), PTA-6502 (depositada el 5 de enero de 2005) y PTA-6503 (depositada el 5 de enero de 2005), estas células se denominan en el presente documento "MDCK-S, MDCK-SF101, MDCK-SF102 y MDCK-SF103", respectivamente y "las células MDCK de la invención" en conjunto. Estos depósitos se mantendrán según los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes. En una realización, las células MDCK de la invención se usan para generar un banco de células útil para la preparación de material de vacuna adecuado para su aprobación por la U.S. Food and Drug Administration para uso humano.

Las líneas celulares MDCK-S, MDCK-SF101, MDCK-SF102, MDCK-SF103, MDCK-SF104 y MDCK-SF105 se derivan de la línea celular MDCK (CCL 34) mediante pase y selección con respecto a una o más características específicas incluyendo pero sin limitarse a crecer como células adherentes en medios que contienen suero o libres de suero, o medios libres de proteínas animales, tener una morfología de tipo epitelial, no ser tumorigénicas (por ejemplo no formar nódulos en un ratón desnudo) y/o soportar la replicación de diversos virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus y flavovirus.

Las células MDCK células de la invención no son tumorigénicas. Se conocen en la técnica métodos para determinar si las células no son tumorigénicas (véase, por ejemplo, Leighton *et al.*, 1970, *Cancer*, 26:1024 y Stiles *et al.*, 1976, *Cancer Res*, 36:1353), el método actualmente preferido por la U.S. Food and Drug Administration usando el modelo de ratón desnudo se detalla en el ejemplo 2 a continuación. En una realización específica, las células MDCK de la invención no son tumorigénicas en el modelo de ratón desnudo adulto (véase, Stiles *et al.*, Id y ejemplo 2 a continuación). En otra realización específica, las células MDCK de la invención no son tumorigénicas cuando se inyectan en un embrión de pollo y/o se aplican por vía tópica al corioalantoides (véase, Leighton *et al.*, Id). Todavía en otra realización, las células MDCK de la invención no son tumorigénicas en el modelo de ratón desnudo adulto cuando se inyectan en un embrión de pollo y/o se aplican por vía tópica al corioalantoides. Aún en otra realización, las células MDCK de la invención no son tumorigénicas en el modelo de ratón desnudo adulto y cuando se inyectan en un embrión de pollo y/o se aplican por vía tópica al corioalantoides. Todavía en otra realización, las células MDCK de la invención no son tumorigénicas tras al menos 20 pases, o tras al menos 30 pases, o tras al menos 40 pases, o tras al menos 50 pases, o tras al menos 60 pases, o tras al menos 70 pases, o tras al menos 80 pases, o tras al menos 90 pases, o tras al menos 100 pases en un medio. Aún en otra realización específica, el medio es un medio descrito en el presente documento (por ejemplo, MediV SF103).

La tumorigenicidad puede cuantificarse de numerosas formas conocidas por un experto en la técnica. Un método comúnmente utilizado es determinar el valor de "DT₅₀" que se define como el número de células requerido para inducir tumores en el 50% de los animales sometidos a prueba (véase, por ejemplo, Hill R. The TD50 assay for tumor cells. En: Potten C, Hendry J, editores. *Cell clones*. Londres: Churchill Livingstone; 1985. p. 223). En una realización, las células MDCK de la invención tienen un valor de DT₅₀ de entre aproximadamente 10¹⁰ y aproximadamente 10¹, o entre aproximadamente 10⁸ y aproximadamente 10³, o entre aproximadamente 10⁷ y aproximadamente 10⁴. En una realización específica, las células MDCK de la invención tienen un valor de DT₅₀ de más de aproximadamente 10¹⁰, o de más de aproximadamente 10⁹, o de más de aproximadamente 10⁸, o de más de aproximadamente 10⁷, o de más de aproximadamente 10⁶, o de más de aproximadamente 10⁵, o de más de aproximadamente 10⁴, o de más de aproximadamente 10³, o de más de aproximadamente 10², o de más de aproximadamente 10¹.

En otra realización, las células no tumorigénicas de la invención crecen como células adherentes en medios que contienen suero o libres de suero o medios libres de proteínas animales. Todavía en otra realización, las células no tumorigénicas de la invención tienen una morfología de tipo epitelial. Aún en otra realización, las células MDCK de la invención soportan la replicación de diversos virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus y flavovirus. Se contempla que las células MDCK de la invención pueden tener cualquier combinación de una o más características específicas incluyendo pero sin limitarse a no ser tumorigénicas, crecer como células adherentes, tener una morfología de tipo epitelial y soportar la replicación de diversos virus.

Se contempla que cada uno y todos los pases de las células MDCK de la invención estén documentados en suficiente detalle de manera que esté disponible el linaje completo de cada línea celular. La documentación de cada uno y todos los pases puede facilitar la aprobación por la U.S. Food and Drug Administration y otros organismos regulatorios de todo el mundo para el uso de las células MDCK de la invención para la preparación de material de vacuna.

En otra realización, las células MDCK de la invención están libres de contaminantes bacterianos (por ejemplo, contaminantes bacterianos, virales y fúngicos). Se conocen bien en la técnica métodos para someter a prueba la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos y se realizan de manera rutinaria por contratistas comerciales (por ejemplo, BioReliance[®], Rockville, MD). Se detallan pruebas de micoplasmas y esterilidad microbiana aceptadas en el ejemplo 2 a continuación. Se enumeran en la tabla 6 ejemplos específicos de agentes microbianos para los que puede someterse a prueba su presencia.

Aún en otra realización, las células MDCK de la invención soportan la replicación de virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus (incluyendo las cepas A y/o B de influenza), paramixovirus (incluyendo VRS A y/o B, metapneumovirus humano y parainfluenza 1, 2 y/o 3), rabdovirus y flavovirus. En una realización, las células MDCK de la invención soportan la replicación de virus influenza adaptados al frío/sensibles a la temperatura (ca/ts) tales como los encontrados, por ejemplo, en FluMist[®] (Belshe *et al.*, 1998, *N Engl J Med* 338:1405; Nichol *et al.*, 1999, *JAMA* 282:137; Jackson *et al.*, 1999, *Vaccine*, 17:1905) y/o virus reordenantes que comprenden la estructura principal de estos virus o que comprenden la estructura principal (o uno o más segmento(s) de ARNV de virus influenza que tienen una o más de las siguientes características: adaptados al frío, atenuados y sensibles a la temperatura. Una indicación de la capacidad de una célula para soportar la replicación viral es el rendimiento de virus obtenido a partir de un cultivo celular infectado. El rendimiento viral puede determinarse mediante numerosos métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el rendimiento viral puede cuantificarse determinando

- la concentración de virus presente en una muestra según un ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular (TCID₅₀) mediana que mide los viriones infecciosos. Los valores de TCID₅₀ se notifican a menudo como el log₁₀ TCID₅₀/ml. En una realización, las células MDCK de la invención soportan la replicación de virus influenza (por ejemplo, cepas *ca/ts*) a un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. En otra realización, las células MDCK de la invención soportan la replicación de virus influenza (por ejemplo, cepas *ca/ts*) a un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 6,0, o al menos aproximadamente 6,2, o al menos aproximadamente 6,4, o al menos aproximadamente 6,6, o al menos aproximadamente 6,8, o al menos aproximadamente 7,0, o al menos aproximadamente 7,2, o al menos aproximadamente 7,4, o al menos aproximadamente 7,6, o al menos aproximadamente 7,8, o al menos aproximadamente 8,0, o al menos aproximadamente 8,2, o al menos aproximadamente 8,4, o al menos aproximadamente 8,6, o al menos aproximadamente 8,8, o al menos aproximadamente 9,0, o al menos aproximadamente 9,2, o al menos aproximadamente 9,4, o al menos aproximadamente 9,6, o al menos aproximadamente 9,8.
- Un experto en la técnica entenderá que las células de la invención generalmente serán parte de una composición de cultivo celular. Los componentes de una composición de cultivo celular variarán según las células y el uso previsto. Por ejemplo, para fines de cultivo, una composición de cultivo celular puede comprender células de la invención y un medio adecuado para el crecimiento de las células. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones de cultivo celular que comprenden células de la invención y otros componentes incluyendo, pero sin limitarse a, medios (por ejemplo, un medio dado a conocer en el presente documento), componentes de medios, tampones, compuestos químicos, tipos celulares adicionales, material viral (por ejemplo, genomas virales, partículas virales) y proteínas heterólogas. En una realización, una composición de cultivo celular comprende células de la invención y un medio o componentes del mismo. Los medios que pueden estar presentes en una composición de cultivo celular incluyen medios libres de suero, medios que contienen suero y medios APF. En una realización, una composición celular comprende un medio dado a conocer en el presente documento (por ejemplo, MediV SF101, MediV SF102, MediV SF103, MediV SF104 o MediV SF105) o componentes del mismo.

Métodos y formulaciones de medios

- Se describen en el presente documento métodos y formulaciones de medios para el cultivo de células MDCK no tumorigénicas en medios que contienen suero. La presente invención también proporciona métodos para la adaptación a y el posterior cultivo de células MDCK no tumorigénicas en medios libres de suero incluyendo formulaciones de medios APF. En ciertos aspectos de la invención, los medios se formulan de manera que las células MDCK conservan una o más de las siguientes características incluyendo pero sin limitarse a ser no tumorigénicas, crecer como células adherentes, tener una morfología de tipo epitelial y soportar la replicación de diversos virus cuando se cultivan. Se contempla que las formulaciones de medios dadas a conocer en el presente documento o componentes de los mismos puedan estar presentes en una composición de cultivo celular.

- Se conocen bien en la técnica formulaciones de medios que contienen suero. Las formulaciones de medios que contienen suero incluyen pero no se limitan a medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + suero bovino fetal (FBS) + glutamina + glucosa. En una realización, está presente FBS en un medio que contiene suero a una concentración de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20%, o entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 15%, o entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 10%. En una realización específica, está presente FBS en un medio que contiene suero a una concentración del 10%. En otra realización, está presente glutamina en un medio que contiene suero a una concentración de entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 10 mM, o entre aproximadamente 1 mM y 10 mM, o entre aproximadamente 2 mM y 5 mM. En una realización específica, está presente glutamina en un medio que contiene suero a una concentración de 4 mM. Todavía en otra realización, está presente glucosa en un medio que contiene suero a una concentración de entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 10 g/l, o entre aproximadamente 2 g/l y aproximadamente 5 g/l. En una realización específica, está presente glucosa en un medio que contiene suero a una concentración de 4,5 g/l. Aún en otra realización, una formulación de medio que contiene suero comprende FBS a una concentración de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20%, glutamina a una concentración de entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 10 mM, y glucosa a una concentración de entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 10 g/l. En una realización específica, una formulación de medio que contiene suero comprende medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + 10% suero bovino fetal (FBS) + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l. DMEM está fácilmente disponible de diversas fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, Gibco/BRL (n.º de cat. 11965-084). FBS está fácilmente disponible de numerosas fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, JRH Biosciences (n.º de cat. 12107-500M). Aunque FBS es el complemento más comúnmente aplicado en medios de cultivo de células animales, otras fuentes de suero se usan también de manera rutinaria y se abarcan por la presente invención, incluyendo ternero recién nacido, caballo y ser humano.

- En una realización, se derivan células MDCK-S no tumorigénicas adaptadas a suero de células de riñón canino Madin Darby (MDCK) obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC CCL34) cultivándolas en un medio químicamente definido complementado con suero. En una realización específica, se expanden células MDCK (ATCC CCL34) en un medio químicamente definido complementado con suero para generar la línea celular MDCK-S tal como sigue: se realizan pases de las células MDCK (ATCC CCL34) según sea necesario en medio de Eagle

modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (10% v/v), glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l para obtener suficientes células para preparar un banco de células pre-maestras (PreMCB) designado MDCK-S. En otra realización específica, las células se cultivan usando el procedimiento detallado en el ejemplo 2, a continuación. Se contempla específicamente que se realizan pases de las células MDCK-S adaptadas a suero durante otros 20 pases o más, a partir de un vial de PreMCB y se sometan a prueba para detectar tumorigenicidad en un modelo de ratón desnudo adulto vivo y la cariólogía en un ensayo de cariotipo. En ciertas realizaciones, las células MDCK-S expandidas no producirán nódulos cuando se inyectan por vía subcutánea en ratones desnudos adultos y tendrán un número modal de cromosomas de 78 con un intervalo de número de cromosomas de no más de aproximadamente 60-88, o de no más de aproximadamente 65-85, o de no más de aproximadamente 65-80, o de no más de aproximadamente 70-85. En una realización, las células MDCK-S no son tumorigénicas tras al menos 20 pases, o tras al menos 30 pases, o tras al menos 40 pases, o tras al menos 50 pases, o tras al menos 60 pases, o tras al menos 70 pases, o tras al menos 80 pases, o tras al menos 90 pases, o tras al menos 100 pases en un medio (por ejemplo, un medio descrito en el presente documento).

Un experto en la técnica apreciará que el uso de suero o extractos animales en aplicaciones de cultivo tisular puede tener desventajas (Lambert, K.J. *et al.*, en: *Animal Cell Biotechnology*, vol. 1, Spier, RE. *et al.*, Eds., Academic Press Nueva York, págs. 85-122 (1985)). Por ejemplo, la composición química de estos complementos puede variar entre lotes, incluso de un único fabricante. Además, los complementos de origen animal o humano pueden también estar contaminados con agentes adventicios (por ejemplo, microplasma, virus y priones). Estos agentes pueden socavar la salud de las células cultivadas cuando se usan estos complementos contaminados en formulaciones de medios de cultivo celular. Además, estos agentes pueden representar un riesgo para la salud cuando se usan sustancias producidas en cultivos contaminados con agentes adventicios en terapia celular y otras aplicaciones clínicas. Un temor importante es la presencia de priones, que pueden provocar encefalopatías espongiiformes en animales y enfermedad de Creutzfeld-Jakob en seres humanos. Por consiguiente, la presente invención proporciona además formulaciones de medios libres de suero.

Las formulaciones de medios libres de suero de la invención incluyen pero no se limitan a MediV SF101 (Taub + hidrolizado vegetal), MediV SF102 (Taub + lípidos), MediV SF103 (Taub + lípidos + hidrolizado vegetal), MediV SF104 (Taub + lípidos + hidrolizado vegetal + factor de crecimiento) y Medi SF105 (igual que MediV SF104 excepto porque se sustituye la transferrina por citrato de amonio férrico/tropolona o sulfato de amonio férrico/tropolona). Se contempla específicamente que el medio SF de Taub (Taub y Livingston, 1981, *Ann NY Acad Sci.*, 372:406) es una mezcla 50:50 de DMEM y F12 de Ham complementado con hormonas, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, prostaglandina E1 25 ng/ml, hidrocortisona 50 nM, triyodotironina 5 pM y Na₂SeO₃ 10 nM, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM. El medio SF de Taub se denomina también en el presente documento medio de Taub o simplemente "Taub".

Los hidrolizados vegetales incluyen pero no se limitan a hidrolizados de uno o más de los siguientes: maíz, semilla de algodón, guisante, soja, malta, patata y trigo. Pueden producirse hidrolizados vegetales mediante hidrólisis enzimática y contienen generalmente una mezcla de péptidos, aminoácidos libres y factores de crecimiento. Se obtienen fácilmente hidrolizados vegetales de varias fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, Marcor Development, HyClone y Organo Technie. También se contempla que puedan utilizarse hidrolizados de levaduras en lugar de, o en combinación con hidrolizados vegetales. Se obtienen fácilmente hidrolizados de levaduras de varias fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, Sigma-Aldrich, USB Corp, Gibco/BRL y otros.

Los lípidos que pueden usarse para complementar los medios de cultivo incluyen pero no se limitan a complementos de lípidos derivados de plantas y animales químicamente definidos así como lípidos derivados de manera sintética. Los lípidos que pueden estar presentes en un complemento de lípido incluyen pero no se limitan a colesterol, ácidos grasos saturados y/o insaturados (por ejemplo, ácidos araquidónico, linoleico, linolénico, mirístico, oleico, palmítico y esteárico). Puede estar presente colesterol a concentraciones de entre 0,10 mg/ml y 0,40 mg/ml en una disolución madre 100X de complemento de lípido. Pueden estar presentes ácidos grasos en concentraciones de entre 1 µg/ml y 20 µg/ml en una disolución madre 100X de complemento de lípido. Se obtienen fácilmente lípidos adecuados para formulaciones de medios de varias fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, HyClone, Gibco/BRL y Sigma-Aldrich.

En una realización, el medio de Taub se complementa con un hidrolizado vegetal y una concentración final de al menos 0,5 g/l, o al menos 1,0 g/l, o al menos 1,5 g/l, o al menos 2,0 g/l, o al menos 2,5 g/l, o al menos 3,0 g/l, o al menos 5,0 g/l, o al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l. En una realización específica, el medio de Taub se complementa con un hidrolizado de trigo. En otra realización específica, el medio de Taub se complementa con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l. La presente invención proporciona un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV SFM 101 que comprende medio de Taub complementado con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l.

En otra realización, el medio de Taub se complementa con una mezcla de lípidos a una concentración final de al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 100%, o al menos el 125%, o al menos el 150%, o al menos el 200%, o al menos el 300% de la concentración final recomendada por los fabricantes. En una realización específica, el medio de Taub se complementa con una mezcla de lípidos químicamente definida. En otra realización específica, el medio de Taub se complementa con una mezcla

de lípidos químicamente definida a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes (por ejemplo, se añadiría una disolución madre 100X obtenida de un fabricante hasta una concentración final de 1X). La presente invención proporciona un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV SFM 102 que comprende medio de Taub complementado con una mezcla de lípidos químicamente definida a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes.

Todavía en otra realización, el medio de Taub se complementa con un hidrolizado vegetal a una concentración final de al menos 0,5 g/l, o al menos 1,0 g/l, o al menos 1,5 g/l, o al menos 2,0 g/l, o al menos 2,5 g/l, o al menos 3,0 g/l, o al menos 5,0 g/l, o al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l y con una mezcla de lípidos a una concentración final de al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 100%, o al menos el 125%, o al menos el 150%, o al menos el 175%, o al menos el 200% de la concentración recomendada por los fabricantes. En una realización específica, el medio de Taub se complementa con hidrolizado de trigo y una mezcla de lípidos químicamente definida. En otra realización específica, el medio de Taub se complementa con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos químicamente definida a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes. La presente invención proporciona un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV SF 103 que comprende medio de Taub complementado con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos químicamente definida a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes.

Aún en otra realización, el medio de Taub se complementa con una hormona de crecimiento. Las hormonas de crecimiento que pueden usarse incluyen pero no se limitan a factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento transformante (TGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). En una realización particular, la hormona de crecimiento es factor de crecimiento epidérmico (EGF). En una realización, el medio de Taub se complementa con un factor de crecimiento a una concentración final de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50,0 ng/ml, o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 25,0 ng/ml, o entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 20 ng/ml, o entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 15,0 ng/ml, o entre aproximadamente 8 ng/ml y aproximadamente 12 ng/ml. En una realización específica, el medio de Taub se complementa con un EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml. Todavía en otras realizaciones, el medio de Taub se complementa con un factor de crecimiento a una concentración final de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50,0 ng/ml, o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 25,0 ng/ml, o entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 20 ng/ml, o entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 15,0 ng/ml, o entre aproximadamente 8 ng/ml y aproximadamente 12 ng/ml y con un hidrolizado vegetal a una concentración final de al menos 0,5 g/l, o al menos 1,0 g/l, o al menos 1,5 g/l, o al menos 2,0 g/l, o al menos 2,5 g/l, o al menos 3,0 g/l, o al menos 5,0 g/l, o al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l y con una mezcla de lípidos a una concentración final de al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 100%, o al menos el 125%, o al menos el 150%, o al menos el 175%, o al menos el 200% de la concentración recomendada por los fabricantes. En otra realización específica, el medio de Taub se complementa con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos químicamente definida a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes y EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml. La presente invención proporciona un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV SF 104 que comprende medio de Taub complementado con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos químicamente definida a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes y EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml.

Un experto en la técnica también apreciará que pueden ser deseables formulaciones de medios libres de proteínas animales para la producción de virus usados en la fabricación de vacunas. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se sustituye uno o más o todos los componentes derivados de animales de los medios libres de suero dados a conocer en el presente documento (por ejemplo, MediV SF101, MediV SF102, MediV SF103, MediV SF104 y MediV SF105) por un derivado no animal. Por ejemplo, puede utilizarse insulina recombinante disponible comercialmente derivada de fuentes no animales (por ejemplo, n.º de cat. de Biological Industries 01-818-1) en lugar de insulina derivada de una fuente animal. Asimismo, pueden utilizarse agentes de unión a hierro (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.045.454; 5.118.513; 6.593.140; y la publicación PCT publicación número WO 01/16294) en lugar de transferrina derivada de una fuente animal. En una realización, las formulaciones de medios libres de suero de la invención comprenden tropolona (2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1) y una fuente de hierro (por ejemplo, citrato de amonio férrico, sulfato de amonio férrico) en lugar de transferrina. Por ejemplo, estará presente tropolona o un derivado de tropolona en una concentración molar en exceso con respecto al hierro presente en el medio a una razón molar de aproximadamente 5 a 1 a aproximadamente 70 a 1, o de aproximadamente 10 a 1 a aproximadamente 70 a 1. Por consiguiente, cuando la concentración de hierro en el medio es de aproximadamente 0,3 μM , la tropolona o el derivado de la misma puede emplearse a una concentración de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 20 μM , por ejemplo de aproximadamente 3 μM a aproximadamente 20 μM . El hierro puede estar presente como iones ferrosos o férricos, que resultan por ejemplo del uso de sales de hierro sencillas o complejas en el medio tal como sulfato ferroso, cloruro férrico, nitrato férrico o en particular citrato de amonio férrico. La presente invención proporciona un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV SFM 105 que comprende medio de Taub sin transferrina complementado con un

hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos químicamente definida a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes y EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml y citrato de amonio férrico:tropolona o sulfato de amonio férrico:tropolona a una razón de entre 10 a 1 y 70 a 1.

5 En una realización, se derivan células no tumorigénicas adaptadas a medios libres de suero MDCK-SF101, MDCK-SF102, MDCK-SF103, MDCK-SF104 y MDCK-SF105 (denominadas colectivamente en el presente documento MDCK-SF) de células de riñón canino Madin Darby (MDCK) obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC CCL34) mediante cultivo en un medio químicamente definido complementado con suero durante al menos un pase y luego realizando pases en un medio libre de suero tal como, por ejemplo, los medios libres de suero descritos
10 anteriormente. En una realización específica, las células MDCK (ATCC CCL34) se adaptan a medios libres de suero para generar una línea celular MDCK-SF tal como sigue: se realizan pases de las células MDCK (ATCC CCL34) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (10% v/v), glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l al menos una vez y entonces se realizan pases en medios libres de suero. Entonces se realizan pases de las células MDCK-SF según sea necesario en medios libres de suero para obtener suficientes células para preparar un banco de células pre-maestras (PreMCB) congelado. En ciertas realizaciones, se realizan pases de las células en un medio que contiene suero (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (10% v/v), glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l) entre 1 y 5 veces, o entre 4 y 10 veces, o entre 9 y 20 veces, o más de 20 veces, y entonces se realizan pases en medios libres de suero (por ejemplo, MediV SF101, MediV SF102, MediV SF103, MediV SF104 y MediV SF105).

20 Se contempla específicamente que se realizan pases de las células MDCK-SF adaptadas a medios libres de suero durante otros 20 pases o más, a partir de un vial de PreMCB y se sometan a prueba para determinar la tumorigenicidad en un modelo de ratón desnudo adulto y la cariólogía en un ensayo de cariotipo. En ciertas realizaciones, las células MDCK-SF expandidas no producirán nódulos cuando se inyectan por vía subcutánea en ratones desnudos adultos y/o tendrán un número modal de cromosomas de 78. En otra realización, las células MDCK-SF expandidas tendrán un número modal de cromosomas de 78 con un intervalo de número de cromosomas de no más de aproximadamente 60 a aproximadamente 88, o de no más de aproximadamente 65 a aproximadamente 85, o de no más de aproximadamente 65-80, o de no más de aproximadamente 70 a aproximadamente 85. En una realización, las células MDCK-SF no son tumorigénicas tras al menos 20 pases, o tras al menos 30 pases, o tras al menos 40 pases, o tras al menos 50 pases, o tras al menos 60 pases, o tras al menos 70 pases, o tras al menos 80 pases, o tras al menos 90 pases, o tras al menos 100 pases en un medio (por ejemplo, un medio descrito en el presente documento).

En una realización, el medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK-SF es MediV SF101. En otra realización, el medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK-SF es MediV SF102. Aún en otra realización, el medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK-SF es MediV SF103. Todavía en otra
35 realización, el medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK-SF es MediV-SF104. En otra realización, el medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK-SF es MediV SF105. Aún en otra realización, el medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK-SF es un medio APF. Se contempla que los medios descritos en el presente documento puedan formularse para eliminar las proteínas animales. Por ejemplo, la transferrina bovina puede sustituirse por una transferrina recombinante derivada de una fuente no animal.
40

Condiciones de cultivo

La presente invención proporciona métodos para el cultivo de células MDCK (preferiblemente no tumorigénicas) y otras células animales (tumorigénicas o no) en formulaciones de medios que contienen suero y libres de suero (citado anteriormente). Se contempla específicamente que las condiciones de cultivo adicionales puedan desempeñar un papel en el mantenimiento de las células MDCK-S y MDCK-SF en un estado no tumorigénico. Estas condiciones de cultivo incluyen pero no se limitan a la elección de la superficie adherente, la densidad celular, la temperatura, la concentración de CO₂, el método de cultivo, el contenido en oxígeno disuelto y el pH.
45

Se contempla específicamente que un experto en la técnica pueda adaptar las condiciones de cultivo de varias formas para optimizar el crecimiento de las células MDCK de la invención. Tales adaptaciones pueden dar como resultado también un aumento en la producción de material viral (por ejemplo, virus), alternativamente, un experto en la técnica puede adaptar las condiciones de cultivo para optimizar la producción de material de vacuna a partir de las células MDCK de la invención sin tener en cuenta el crecimiento de las células. Estas condiciones de cultivo incluyen, pero no se limitan a, superficie adherente, densidad celular, temperatura, concentración de CO₂, método de cultivo, contenido en oxígeno disuelto y pH.
50

55 En una realización, las células MDCK de la invención se cultivan como células adherentes sobre una superficie a la que se unen. Se conocen bien en la técnica superficies adherentes sobre las que pueden hacerse crecer células de cultivo tisular. Las superficies adherentes incluyen, pero no se limitan a, plásticos de poliestireno modificados en la superficie, superficies recubiertas con proteínas (por ejemplo, vidrio/plástico recubierto con fibronectina y/o colágeno), así como una gran variedad de microportadores disponibles comercialmente (por ejemplo, perlas microportadoras de DEAE-dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas
60

de copolímero de estireno-tri-metilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor). Las perlas microportadoras son esferas pequeñas (en el intervalo de 100-200 micras de diámetro) que proporcionan una gran área superficial para el crecimiento de células adherentes por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un único litro de medio puede incluir más de 20 millones de perlas microportadoras que proporcionan más de 8000 centímetros cuadrados de superficie de crecimiento. La elección de la superficie adherente se determina mediante los métodos utilizados para el cultivo de las células MDCK de la invención y puede determinarse por un experto en la técnica. Recipientes de cultivo adecuados que pueden emplearse en el transcurso del procedimiento según la invención son todos los recipientes conocidos por el experto en la técnica, tales como, por ejemplo, frascos de agitación, frascos rotatorios, fermentadores o biorreactores. Para la producción comercial de virus, por ejemplo, para la producción de vacunas, es deseable a menudo cultivar las células en un biorreactor o fermentador. Los biorreactores están disponibles en volúmenes de desde menos de 1 litro hasta más de 100 litros, por ejemplo, el biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, NJ); biorreactores a escala comercial y de laboratorio de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

En una realización, las células MDCK de la invención se cultivan como células adherentes en un sistema de cultivo discontinuo. Todavía en otra realización, las células MDCK de la invención se cultivan como células adherentes en un sistema de cultivo por perfusión. Se contempla específicamente que las células MDCK de la invención se cultivarán en un sistema de perfusión, (por ejemplo, en un fermentador de recipiente con agitación, usando sistemas de retención de células conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, filtros de centrifugación y similares) para la producción de material de vacuna (por ejemplo, virus).

En una realización, las células MDCK de la invención se cultivan a una concentración de CO₂ de al menos el 1%, o de al menos el 2%, o de al menos el 3%, o de al menos el 4%, o de al menos el 5%, o de al menos el 6%, o de al menos el 7%, o de al menos el 8%, o de al menos el 9%, o de al menos el 10%, o de al menos el 20%.

En una realización, la concentración de oxígeno disuelto (OD) (valor de pO₂) se regula ventajosamente durante el cultivo de las células MDCK de la invención y está en el intervalo de desde el 5% y el 95% (basándose en la saturación de aire), o entre el 10% y el 60%. En una realización específica, la concentración de oxígeno disuelto (OD) (valor de pO₂) es al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 50%, o al menos el 60%.

En otra realización, el pH del medio de cultivo usado para el cultivo de las células MDCK de la invención se regula durante el cultivo y está en el intervalo de desde pH 6,4 hasta pH 8,0, o en el intervalo de desde pH 6,8 hasta pH 7,4. En una realización específica, el pH del medio de cultivo es al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0.

En una realización adicional, las células MDCK de la invención se cultivan a una temperatura de 25°C a 39°C. Se contempla específicamente que la temperatura de cultivo pueda variarse dependiendo del procedimiento deseado. Por ejemplo, las células MDCK de la invención pueden hacerse crecer a 37°C para la proliferación de las células y a una temperatura inferior (por ejemplo, de 25°C a 35°C) para la producción de materiales de vacuna (por ejemplo, virus). En otra realización, las células se cultivan a una temperatura de menos de 30°C, o de menos de 31°C, o de menos de 32°C, o de menos de 33°C, o de menos de 34°C para la producción de material de vacuna. En otra realización, las células se cultivan a una temperatura de 30°C, o 31°C, o 32°C, o 33°C, o 34°C para la producción de material de vacuna.

Con el fin de generar material de vacuna (por ejemplo, virus), se contempla específicamente que las células MDCK de la invención se cultiven de manera que el medio pueda intercambiarse fácilmente (por ejemplo, un sistema de perfusión). Las células pueden cultivarse a una densidad celular muy alta, por ejemplo a entre 1x10⁶ y 25x10⁶ células/ml. El contenido en glucosa, glutamina, lactato, así como el valor de pH y pO₂ en el medio y otros parámetros, tal como agitación, conocidos por el experto en la técnica, pueden manipularse fácilmente durante el cultivo de las células MDCK de la invención de manera que la densidad celular y/o la producción de virus pueden optimizarse.

Producción de material de vacuna (por ejemplo, virus)

También se describe en el presente documento un procedimiento para la producción de virus en cultivo celular (denominado en el presente documento "el procedimiento de la invención"), en el que se usan las células MDCK de la invención. En una realización, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- i) proliferación de las células MDCK de la presente invención en medios de cultivo;
- ii) infección de las células con virus; y
- iii) tras una fase de cultivo adicional, aislamiento de los virus replicados en las células no tumorigénicas.

En una realización, las células MDCK de la invención proliferan en la etapa (i) como células adherentes. Las células MDCK de la invención pueden cultivarse en el transcurso del procedimiento en cualquier medio incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, las células MDCK de la invención se cultivan en el

- 5 transcurso del procedimiento en un medio libre de suero tal como, por ejemplo, MediV-SF101, MediV-SF102, MediV-SF103, MediV-SF104, MediV-SF105 y formulaciones APF de los mismos. Opcionalmente, las células MDCK de la invención pueden cultivarse en el transcurso del procedimiento en un medio que contiene suero (por ejemplo, DMEM + FBS al 10% + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l). Condiciones de cultivo adicionales tales como, por ejemplo, temperatura, pH, pO₂, concentración de CO₂ y densidad celular se describen en detalle anteriormente. Un experto en la técnica puede establecer una combinación de condiciones de cultivo para la proliferación de las células MDCK de la invención para la producción de virus.
- 10 La temperatura para la proliferación de las células antes de la infección con virus está en una realización entre 22°C y 40°C. En ciertas realizaciones, la temperatura para la proliferación de las células antes de la infección con virus es inferior a 39°C, o inferior a 38°C, o inferior a 37°C, o inferior a 36°C, o inferior a 35°C, o inferior a 34°C, o inferior a 33°C, o inferior a 32°C, o inferior a 30°C, o inferior a 28°C, o inferior a 26°C, o inferior a 24°C. El cultivo para la proliferación de las células (etapa (i)) se lleva a cabo en una realización del procedimiento en un sistema de perfusión, por ejemplo en un fermentador de recipiente con agitación, usando sistemas de retención de células conocidos por el experto en la técnica, tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, filtros de centrifugación, microportadores y similares.
- 15 Las células proliferan en este caso durante de 1 a 20 días, o durante de 3 a 11 días. El intercambio del medio se lleva a cabo en el transcurso de este tiempo, aumentando de desde 0 hasta aproximadamente de 1 a 5 volúmenes de fermentador al día. Las células proliferan hasta altas densidades celulares de esta manera, por ejemplo hasta al menos 1 x10⁶-25x10⁶ células/ml. Las tasas de perfusión durante el cultivo en el sistema de perfusión pueden regularse mediante el recuento celular, el contenido en glucosa, glutamina o lactato en el medio y mediante otros parámetros conocidos por el experto en la técnica. Alternativamente, las células en la etapa (i) del procedimiento según la invención se cultivan en un procedimiento discontinuo.
- 20 En una realización del procedimiento según la invención, el pH, valor de pO₂, concentración de glucosa y otros parámetros del medio de cultivo usado en la etapa (i) se regulan durante el cultivo tal como se describió anteriormente usando métodos conocidos por el experto en la técnica.
- 25 En otra realización, la infección de las células con virus se lleva a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,5. Todavía en otra realización, la infección de las células con virus se lleva a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de 0,0001 a 10, o de 0,0005 a 5, o de 0,002 a 0,5. Tras la infección, el cultivo de células infectadas se cultiva adicionalmente para replicar los virus, en particular hasta un efecto citopático máximo o hasta que pueda detectarse una cantidad máxima de antígeno de virus. En una realización, tras la infección las células se cultivan a una temperatura de entre de entre 22°C y 40°C. En ciertas realizaciones, tras la infección con virus las células se cultivan a una temperatura de menos de 39°C, o menos de 38°C, o menos de 37°C, o menos de 36°C, o menos de 35°C, o menos de 34°C, o menos de 33°C, o menos de 32°C, o menos de 30°C, o menos de 28°C, o menos de 26°C, o menos de 24°C. En otra realización, tras la infección las células se cultivan a una temperatura de menos de 33°C. Todavía en otra realización, tras la infección las células se cultivan a una temperatura de 31°C. En ciertas realizaciones, el cultivo de las células se lleva a cabo durante de 2 a 10 días. El cultivo puede llevarse a cabo en el sistema de perfusión u opcionalmente en el procedimiento discontinuo.
- 30 El cultivo de las células tras la infección con virus (etapa (iii)) se lleva a cabo a su vez de manera que el pH y el valor de pO₂ se mantienen tal como se describió anteriormente. Durante el cultivo de las células o la replicación del virus según la etapa (iii) del procedimiento, también es posible una sustitución del medio de cultivo celular por medio recién preparado, concentrado de medio o con constituyentes definidos tales como aminoácidos, vitaminas, fracciones de lípidos, fosfatos etc. para optimizar el rendimiento de antígenos. Las células o bien pueden diluirse lentamente mediante la adición adicional de medio o concentrado de medio a lo largo de varios días o bien pueden incubarse durante la perfusión adicional con medio o concentrado de medio. Las tasas de perfusión en este caso pueden regularse a su vez por medio del recuento celular, el contenido en glucosa, glutamina, lactato o lactato deshidrogenasa en el medio u otros parámetros conocidos por el experto en la técnica. Además es posible una combinación del sistema de perfusión con un procedimiento de alimentación discontinua.
- 35 En una realización del procedimiento, la recogida y el aislamiento de los virus producidos (etapa (iii)) se llevan a cabo tras un periodo suficiente para producir rendimientos adecuados de virus, tal como de 2 a 10 días, u opcionalmente de 3 a 7 días, tras la infección. En una realización del procedimiento, la recogida y el aislamiento de los virus producidos (etapa (iii)) se lleva a cabo 2 días, o 3 días, o 4 días, o 5 días, o tras 6 días, o 7 días, u 8 días, o 9 días, o 10 días, tras la infección.
- 40 Los virus que pueden producirse en las células MDCK de la presente invención incluyen pero no se limitan a virus animales, incluyendo familias de *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Togaviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdoviridae*, *Retroviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae*, *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Arenaviridae* y *Poxviridae*.
- 45 También se han desarrollado en los últimos años sistemas para producir virus influenza en cultivo celular (véase, por ejemplo, Furminger, en Textbook of Influenza, ed Nicholson, Webster y Hay, págs. 324-332, Blackwell Science
- 50
- 55

(1998); Merten *et al.* en *Novel Strategies in The Design and Production of Vaccines*, ed Cohen & Shafferman, págs. 141-151, Kluwer Academic (1996)). Normalmente, estos métodos implican la infección de células huésped inmortalizadas adecuadas con una cepa de virus seleccionada. Aunque se eliminan muchas de las dificultades relacionadas con la producción de vacunas en huevos de gallina, no todas las cepas patógenas de influenza crecen bien y pueden producirse según métodos de cultivo tisular establecidos. Además, muchas cepas con características deseables, por ejemplo, atenuación, sensibilidad a la temperatura y adaptación al frío, adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas, no se han hecho crecer satisfactoriamente, especialmente a escala comercial, en cultivo tisular usando métodos establecidos.

La presente invención proporciona varias líneas celulares MDCK no tumorigénicas, que se han adaptado a crecer en medios o bien que contienen suero o bien libres de suero y que pueden soportar la replicación de virus incluyendo pero sin limitarse a influenza cuando se cultivan. Estas líneas celulares son adecuadas para la replicación económica de virus en cultivo celular para su uso como material de vacuna. Las células MDCK de la presente invención son particularmente útiles para la producción de cepas de influenza adaptadas al frío, sensibles a la temperatura (*ca/ts*) (por ejemplo, las cepas de influenza encontradas en FluMist[®]) que no crecen bien usando otras líneas celulares establecidas (véase el ejemplo 1, a continuación). Además, las células MDCK de la presente invención son útiles para la producción de cepas de influenza que no pueden crecer en huevos embrionados tales como virus influenza aviar que también pueden provocar enfermedad en seres humanos (por ejemplo, una cepa "pandémica")

Los virus influenza que pueden producirse mediante el procedimiento de la invención en las células MDCK de la invención incluyen pero no se limitan a virus reordenantes que incorporan antígenos de hemaglutinina y/o neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra atenuada, sensible a la temperatura, adaptada al frío (*ca/ts/att*). Por ejemplo, los virus pueden comprender las estructuras principales (o uno más segmentos de ARNv) de cepas maestras que son una o más de, por ejemplo, una cepa sensible a la temperatura (*ts*), adaptada al frío (*ca*) o atenuada (*att*) (por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66, PR8, B/Leningrad/14/17/55, B/14/5/1, B/USSR/60/69, B/Leningrad/179/86, B/Leningrad/14/55, B/England/2608/76 etc.). Se conocen bien en la técnica métodos para la producción de cepas de vacuna contra la gripe reordenantes en o bien huevos o bien líneas celulares e incluyen, por ejemplo, Kilbourne, E.D. en *Vaccines* (2ª edición), ed. Plotkin and Mortimer, WB Saunders Co. (1988) y los datos a conocer en las publicaciones de patente PCT de solicitud PCT n.ºs WO 05/062820 y WO 03/091401. Otros virus influenza que puede producirse mediante el procedimiento de la invención en las células MDCK de la invención incluyen virus influenza recombinantes que pueden expresar un producto génico heterólogo, véanse por ejemplo las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2004/0241139 y 2004/0253273.

En una realización, las células proliferan (etapa (i)) tal como se describió anteriormente, entonces se infectan las células con virus influenza (etapa (ii)). En ciertas realizaciones, la infección se lleva a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de 0,0001 a 10, o de 0,0005 a 5, o de 0,002 a 0,5. En otras realizaciones, la infección se lleva a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,5. Opcionalmente, se añade una proteasa que ocasiona la escisión de la proteína precursora de hemaglutinina [HA₀] y por tanto la adsorción de los virus sobre las células. La adición de una proteasa puede llevarse a cabo según la invención poco antes, simultáneamente a o poco después de la infección de las células con virus influenza (etapa (ii)). Si la adición se lleva a cabo simultáneamente a la infección, la proteasa puede o bien añadirse directamente al cultivo celular que va a infectarse o bien, por ejemplo, como un concentrado junto con el inóculo de virus. La proteasa es, en ciertos aspectos de la invención, una serina proteasa, o una cisteína proteasa, o una asparagina proteasa. En una realización, se usa tripsina. En una realización específica, se usa tripsina tratada con TPCK.

En una realización, se añade tripsina al cultivo celular hasta una concentración final de 1 a 5000 mU/ml, o de 5 a 1000 mU/ml, o de 100 a 500 mU/ml. En una realización alternativa, se añade tripsina al cultivo celular hasta una concentración final de 1 a 200 µg/ml, o de 5 a 50 µg/ml, o de 5 a 30 µg/ml en el medio de cultivo. Durante el cultivo adicional de las células infectadas según la etapa (iii) del procedimiento según la invención, la reactivación con tripsina puede llevarse a cabo mediante adición reciente de tripsina en el caso del procedimiento discontinuo o en el caso del sistema de perfusión mediante adición continua de una disolución de tripsina o mediante adición intermitente.

Tras la infección, el cultivo celular infectado se cultiva adicionalmente para replicar los virus, en particular hasta un efecto citopático máximo o hasta que puede detectarse una cantidad máxima de virus y/o antígeno de virus. En ciertas realizaciones, el cultivo de las células se lleva a cabo durante de 2 a 10 días. El cultivo puede llevarse a cabo a su vez en el sistema de perfusión u opcionalmente en el procedimiento discontinuo. En una realización adicional, las células se cultivan a una temperatura de 25°C a 36°C, o de 29°C a 34°C, tras la infección con virus influenza. El cultivo de las células infectadas a temperaturas inferiores a 33°C, en particular en los intervalos de temperatura indicados anteriormente, conduce a la producción de rendimientos superiores de ciertos virus influenza, tales como, por ejemplo cepas B. Además, se contempla el cultivo de las células infectadas a temperaturas inferiores a 35°C para la producción del virus influenza sensible a la temperatura, adaptado al frío (*ts/ca*). Se contempla que virus *ts/ca* puedan estar también atenuados (*att*). En otra realización, las células se cultivan a una temperatura de menos de 30°C, o de menos de 31°C, o de menos de 32°C, o de menos de 33°C, o de menos de 34°C para la producción de cepas de influenza *ts/ca*. En una realización específica, las células se cultivan a una temperatura de 31°C, para la

producción de cepas B del virus influenza.

El cultivo de las células tras la infección con virus influenza (etapa (iii)) se lleva a cabo a su vez, por ejemplo, tal como se describió anteriormente.

5 En una realización del procedimiento, la recogida y el aislamiento de los virus influenza producidos (etapa (iii)) se lleva a cabo tras un periodo suficiente para producir rendimientos adecuados de virus, tal como de 2 a 10 días, o de 3 a 7 días, tras la infección. Los virus se recuperan normalmente del medio de cultivo en el que se han hecho crecer las células infectadas. Normalmente, el medio bruto se clarifica antes de la concentración de los virus influenza. Los métodos comunes incluyen filtración, ultrafiltración, adsorción sobre sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, medio bruto de cultivos infectados puede clarificarse en primer lugar mediante centrifugación a, por ejemplo 10 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para eliminar los residuos celulares y otra materia particulada grande, por ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Alternativamente, el medio se filtra a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,8 µm para eliminar las células intactas y otra materia particulada grande. Opcionalmente, el sobrenadante de medio clarificado se centrifuga entonces para sedimentar los virus influenza, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Tras la resuspensión del sedimento de virus en un tampón apropiado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,0001 M) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, el virus puede concentrarse mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre sacarosa (60%-12%) o tartrato de potasio (50%-10%). Son adecuados o bien gradientes continuos o bien escalonados, por ejemplo, un gradiente de sacarosa de entre el 12% y el 60% en cuatro escalones del 12%. Los gradientes se centrifugan a una velocidad y durante un tiempo suficientes para que los virus se concentren en una banda visible para su recuperación. 15 Alternativamente, y para la mayoría de las aplicaciones comerciales a gran escala, el virus se eluye de los gradientes de densidad usando un rotor de centrifuga zonal que funciona en modo continuo. Se proporcionan detalles adicionales suficientes para guiar a un experto a través de la preparación de virus influenza a partir del cultivo tisular, por ejemplo, en Furminger, en *Textbook of Influenza* págs. 324-332 Nicholson *et al.* (ed); Merten *et al.*, en *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* págs. 141-151 Cohen & Shafferman (ed) y patente estadounidense n.º 5.690.937. Si se desea, los virus recuperados pueden almacenarse a -80°C en presencia de un estabilizador, tal como sacarosa-fosfato-glutamato (SPG).

En ciertas realizaciones del procedimiento, el virus se trata con Benzonase® u otra endonucleasa no específica. Opcionalmente, el tratamiento con Benzonase® se produce de manera temprana en la recogida y el aislamiento de los virus influenza producidos (etapa (iii)). En otras realizaciones del procedimiento, tras el tratamiento con Beazonase®, el material se clarifica. Los métodos útiles para la clarificación incluyen pero no se limitan a filtración de flujo directo (DFF). Las etapas adicionales que pueden utilizarse para la recogida y el aislamiento del virus influenza producido (etapa (iii)) incluyen pero no se limitan a filtración de flujo tangencial (TFF), cromatografía de afinidad así como cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de hidroxapatita. Otras etapas se muestran a modo de ejemplo en la sección de ejemplos a continuación.

35 **Composiciones de vacuna y métodos de uso**

Además, se describen en el presente documento virus (por ejemplo, influenza) que pueden obtenerse mediante un procedimiento de la invención. Estos virus pueden formularse mediante métodos conocidos para proporcionar una vacuna para su administración a seres humanos o animales. Los virus pueden estar presentes como partículas de virus intactos (por ejemplo, virus atenuados vivos) o como virus inactivo/disgregados (por ejemplo, tratados con detergentes de formaldehído). Opcionalmente, puede aislarse un componente viral definido (por ejemplo, proteína) a partir de los virus mediante métodos conocidos por el experto en la técnica, y usarse en la preparación de una vacuna.

La formulación partículas de virus intactos (por ejemplo, virus atenuados vivos) puede incluir etapas adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, un intercambio de tampón mediante filtración en una formulación final seguido por una etapa de esterilización. Los tampones útiles para una formulación de este tipo pueden contener sacarosa 200 mM y un tampón fosfato o histidina de pH 7,0-7,2 con la adición otros excipientes de aminoácido tales como arginina. En ciertas realizaciones, se añaden hidrolizados de proteína de estabilización tales como gelatina porcina. En algunas realizaciones, las disoluciones/vacunas virales finales de la invención pueden comprender virus vivos que son estables en forma líquida durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el almacenamiento "en el campo" (por ejemplo, en venta y comercialización cuando se refrigera a 2-8°C, 4°C, 5°C, etc.) durante toda la temporada de vacunación contra la gripe (por ejemplo, normalmente desde aproximadamente septiembre hasta marzo en el hemisferio norte). Por tanto, se desea que las composiciones de virus/vacuna conserven su potencia o pierdan su potencia a una velocidad aceptable a lo largo del periodo de almacenamiento. En otras realizaciones, tales disoluciones/vacunas son estables en forma líquida a desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C, por ejemplo, la temperatura de un frigorífico. Por ejemplo, se describen métodos y composiciones para formular una vacuna contra la gripe atenuada estable en frigorífico en la solicitud de patente PCT PCT/US2005/035614 presentada el 4 de octubre de 2005, véase también la publicación PCT WO 05/014862. Opcionalmente, puede utilizarse secado por pulverización, un procedimiento de secado rápido mediante el cual la alimentación líquida de la formulación se atomiza por pulverización en gotitas finas bajo una corriente de gas calentado seco, para prolongar el tiempo de almacenamiento de una formulación de vacuna. La evaporación de las gotitas finas da como resultado polvos secos compuestos por los solutos disueltos (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense

2004/0042972). Se conocen bien en la técnica métodos para la generación y formulación de partículas de virus inactivos/disgregados para composiciones de vacuna y se han utilizado durante más de 40 años.

5 Generalmente, pueden administrarse virus o componentes virales profilácticamente en un excipiente o portador apropiado para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas de virus. Normalmente, el excipiente o portador es un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, solución salina acuosa, soluciones salinas tamponadas acuosas, disoluciones de dextrosa acuosas, disoluciones de glicerol acuosas, etanol o combinaciones de los mismos. La preparación de tales disoluciones garantizando la esterilidad, el pH, la isotonicidad y la estabilidad se efectúa según protocolos establecidos en la técnica. Generalmente, se selecciona un excipiente o portador para minimizar efectos alérgicos y otros efectos no deseados, y para adecuarse a la vía de administración particular, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

10 Opcionalmente, la formulación para la administración profiláctica de los virus, o componentes de los mismos, también contiene uno o más adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria frente a los antígenos de influenza. Los adyuvantes adecuados incluyen: saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum* y los adyuvantes sintéticos QS-21 y MF59.

15 Generalmente, se administran formulaciones de vacuna en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas de virus influenza. Preferiblemente, la administración de los virus provoca una respuesta inmunitaria protectora. Los expertos en la técnica conocen dosificaciones y métodos para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra una o más cepas virales. Por ejemplo, se proporcionan virus influenza inactivados en el intervalo de 1-1000 DIH₅₀ (dosis infecciosa humana), es decir, aproximadamente 10⁵ - 10⁸ ufp (unidades formadoras de placa) por dosis administrada. Alternativamente, se administran aproximadamente 10-50 µg, por ejemplo, aproximadamente 15 µg de HA sin un adyuvante, administrándose dosis más pequeñas con un adyuvante. Normalmente, la dosis se ajustará dentro de este intervalo basándose en, por ejemplo, la edad, el estado físico, el peso corporal, el sexo, la dieta, el momento de administración y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra de manera sistémica, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y jeringuilla, o un dispositivo de inyección sin aguja. Alternativamente, la formulación de vacuna se administra por vía intranasal, o bien mediante gotas, aerosol de partículas grandes (mayores de aproximadamente 10 micrómetros), o bien pulverización en las vías respiratorias superiores. Aunque cualquiera de las vías anteriores de administración da como resultado una respuesta inmunitaria sistémica protectora, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad de la mucosa en el sitio de entrada del virus influenza. Para la administración intranasal, se prefieren a menudo vacunas de virus vivos atenuados, por ejemplo un virus influenza recombinante o reordenante atenuado, adaptado al frío y/o sensible a la temperatura. Aunque se prefiere la estimulación de una respuesta inmunitaria protectora con una única dosis, pueden administrarse dosis adicionales, mediante la misma o diferente vía, para lograr el efecto profiláctico deseado. Estos métodos pueden adaptarse para cualquier virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus (incluyendo cepas A y B de influenza), paramixovirus (incluyendo VRS, metapneumovirus humano y parainfluenza), rabdovirus y flavovirus.

40 Virus influenza

40 Los métodos, procedimientos y composiciones en el presente documento se refieren principalmente a la producción de virus influenza para vacunas. Los virus influenza están constituidos por un núcleo de ribonucleoproteína interno que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado y una envuelta de lipoproteína externa revestida por una matriz de proteína. Los virus influenza A e influenza B contienen cada uno ocho segmentos de ARN de sentido negativo monocatenario. El genoma de influenza A codifica para once polipéptidos. Los segmentos 1-3 codifican para tres polipéptidos, que constituyen una ARN polimerasa dependiente de ARN. El segmento 1 codifica para la proteína PB2 del complejo de la polimerasa. Las proteínas de la polimerasa restantes PB1 y PA están codificadas por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de influenza codifica para una proteína pequeña, PB1-F2, producida a partir de un marco de lectura alternativo dentro de región que codifica para PB1. El segmento 4 codifica para la glicoproteína de superficie hemaglutinina (HA) implicada en la unión celular y la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica para el polipéptido nucleoproteína (NP) de la nucleocápsida, el principal componente estructural asociado con ARN viral. El segmento 6 codifica para una glicoproteína de la envuelta, neuraminidasa (NA). El segmento 7 codifica para dos proteínas de la matriz, denominadas M1 y M2, que se traducen a partir de ARNm sometido a corte y empalme de manera diferencial. El segmento 8 codifica para NS1 y NS2, dos proteínas no estructurales, que se traducen a partir de variantes de ARNm sometido a corte y empalme de manera alternativa.

50 Los ocho segmentos del genoma de influenza B codifican para 11 proteínas. Los tres genes más grandes codifican para componentes de la ARN polimerasa, PB1, PB2 y PA. El segmento 4 codifica para la proteína HA. El segmento 5 codifica para NP. El segmento 6 codifica para la proteína NA y la proteína NB. Ambas proteínas, NB y NA, se traducen a partir de marcos de lectura solapantes de un ARNm bicistrónico. El segmento 7 de influenza B también codifica para dos proteínas: M1 y M2. El segmento más pequeño codifica para dos productos, NS1 que se traduce a partir del ARN de longitud completa, y NS2 que se traduce a partir de una variante de ARNm sometido a corte y

empalme.

Se producen virus reordenantes para incorporar antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra aprobada también denominada virus donante maestro (MDV). FluMist® hace uso de cepas de MDV adaptadas al frío, atenuadas, sensibles a la temperatura aprobadas (por ejemplo, A/AnnArbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66). Varios métodos son útiles para la generación de virus reordenantes incluyendo métodos basados en huevos y más recientemente métodos de cultivo celular. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 03/091401; WO 05/062820 y las patentes estadounidenses n.ºs 6.544.785; 6.649.372; 6.951.754). Se contempla que las células MDCK, los medios y los procedimientos de la invención sean útiles para la producción de virus influenza incluyendo, pero sin limitarse a, las cepas de influenza dadas a conocer en el presente documento (por ejemplo, A/AnnArbor/6/60 y B/AnnArbor/1/66) y virus reordenantes que comprenden genes de las cepas A/AnnArbor/6/60, B/AnnArbor/1/66, PR8. Se contempla además que las células MDCK, los medios y los procedimientos de la invención sean útiles para la producción de virus influenza, incluyendo virus reordenantes, que tienen uno o más de los siguientes fenotipos, sensible a la temperatura, adaptado al frío, atenuado. Pueden generarse reordenantes mediante técnicas de reordenamiento clásicas, por ejemplo, mediante métodos de coinfección u opcionalmente mediante técnicas de rescate de plásmidos (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 03/091401; WO 05/062820 y las patentes estadounidenses n.ºs 6.544.785; 6.649.372, 6.951.754).

EJEMPLOS

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1.

20 **Determinación de la propagación de la infección de cepas de influenza ca/ts en líneas celulares y caracterización de influenza producido en células MDCK**

La industria de vacunas ha realizado un esfuerzo para desarrollar plataformas de producción alternativas que no utilizan huevos y para producir vacunas contra la gripe en un sistema de cultivo de células de mamífero o insecto. Las ventajas obvias son la fácil capacidad de la ampliación a escala, el control del proceso aumentado y la eliminación de proteínas del huevo que podrían producir una reacción alérgica en algunas vacunas. Puesto que los sistemas basados en cultivo celular pueden ampliarse a escala rápidamente, ofrecen una ventaja adicional en el momento de una pandemia de gripe, cuando existe la posibilidad de escasez de suministro de huevos y se requiere la rápida producción de vacuna. Se han realizado estudios iniciales con un total de 7 líneas celulares diferentes: 2 líneas de fibroblastos de pulmón diploides humanos (MRC-5 y WI-38) (datos no mostrados), un retinoblastoma humano y una línea de células de riñón humanas construidas ambas genéticamente para la producción de productos adenovirales (PER.C6 y 293, respectivamente) (datos no mostrados), una línea de células de pulmón de mono *Rhesus* fetales (FRhL2) (datos no mostrados), una línea de células de riñón de mono verde africano (Vero), y una línea de células de riñón canino Marin-Darby (MDCK). Las células MDCK fueron la única línea celular de las sometidas a prueba que podía propagar los cuatro tipos de cepas de virus influenza adaptadas al frío, atenuadas sensibles a la temperatura (*ca/ts/att*) reordenantes, H1N1, H3N2, la posible cepa de vacuna pandémica H5N1, así como las cepas B, a títulos razonables comercialmente ($>10^7$ Log TCID₅₀/ml) (figura 1 y datos no mostrados). Se compararon las características genéticas y antigénicas del crecimiento del virus en células MDCK con las del crecimiento del virus en huevos. No se observaron cambios significativos en la secuencia genómica (datos no mostrados) y la antigenicidad, tal como se determina mediante títulos de HAI, fue comparable (tabla 1).

40 **Ensayo de foco fluorescente:** Se hicieron crecer células MDCK y Vero en placas negras de 96 pocillos durante 4 días (DMEM + glutamina 4 mM + PEN/Strep). Se infectó cada pocillo con las cepas de influenza B *ca/ts* (B/HongKong/330/01 y B/Yamanashi/166/98) a una MOI de ~ 0,01 en DMEM + glutamina 4 mM + tripsina TPCK 60 mU/ml. Las placas infectadas por virus se fijaron y se inmunotifieron tal como sigue para determinar la propagación de infección. Se eliminó el medio que contenía virus de cada placa y se lavaron las placas una vez con 200 µl/pocillo con DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) y luego se fijaron las placas mediante la adición de 200 µl/pocillo de paraformaldehído frío al 4% (v/v) en PBS. Se lavaron dos veces las placas con 200 µl/pocillo de DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) seguido por incubación de las células con anticuerpo primario (anticuerpo de oveja anti-B yamanshi y de oveja anti-B Hong Kong diluida en saponina al 0,1%, BSA al 1% en PBS a una razón de 1:1000). Tras la incubación durante una hora, se eliminó el anticuerpo primario y se lavaron las células tres veces con Tween 20 al 0,1% en PBS y se incubaron los pocillos con anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti-anticuerpo de oveja marcado con FITC en saponina al 0,1%, BSA al 1% en PBS a una razón de dilución de 1:100). Se visualizaron los pocillos diariamente durante 4 días usando un microscopio de fluorescencia y se tomaron las imágenes diariamente usando el programa SPOT.

Resultados y discusión

55 Se usó un ensayo de foco fluorescente para evaluar si había propagación de infección de cepas de influenza B *ca/ts* en células MDCK y Vero y también se evaluó si había alguna diferencia en la propagación de la infección del virus entre los 50 clones celulares de Vero. Puesto que la fluorescencia en la monocapa aumentó durante 4 días en las células MDCK pero no en las células Vero (véase la figura 1A), se concluyó que las células Vero no eran permisivas para la producción de cepas B *ca/ts*, mientras que las células MDCK sí lo eran. Estos datos fueron similares a los

datos en los experimentos anteriores que mostraron que las cepas B podrían producirse hasta 7-7,5 log₁₀ TCID₅₀ en células MDCK pero sólo hasta 4-4,5 log₁₀ TCID₅₀ en células Vero (datos no mostrados).

También se sometieron a prueba las células MDCK para determinar su capacidad para soportar la replicación de varias cepas *ca/ts/att* reordenantes incluyendo una posible cepa de vacuna pandémica, *ca A/Vietnam/1203/2004*. Se infectaron células MDCK a una baja multiplicidad de infección con *ca A/Vietnam/1203/2004* y se cuantificó el virus en el sobrenadante varias veces tras la infección. A las 48 horas tras la infección, los títulos de *ca A/Vietnam/1203/2004* alcanzaron aproximadamente 8 log₁₀ TCID₅₀/ml y permanecieron estables durante los siguientes de 3 a 4 días. Véanse la figura 1B y la tabla 2.

Las cepas *ca/ts/att* de tipo A/H1N1, A/H5N1, A/H3N2 y B replicaron hasta títulos relativamente altos en células MDCK. Además, el pase de estas cepas *ca/ts/att* en células MDCK no alteró significativamente su secuencia genómica. Se realizaron pases de tres cepas *ca/ts/att*, *ca A/Sydney/05/97*, *ca A/Beijing/262/95* y *ca B/Ann Arbor/1/94* una vez o dos veces en células MDCK y se secuenciaron las regiones codificantes completas de los 6 genes internos y se compararon con el material de partida. No se observaron cambios de nucleótidos (datos no mostrados), lo que demuestra que estos pases a través de este sustrato no cambiaron la composición genética de estas cepas. Se realizaron caracterizaciones de secuencia adicionales en diferentes cepas de vacunas producidas en células MDCK en condiciones que se esperaba que imitaban el proceso de producción incluyendo composiciones de medios, dosis de entrada (moi), temperatura de incubación y tiempo de recogida. Basándose en los datos preliminares, se espera que no habrá cambios significativos en la secuencia genómica de los virus producidos por MDCK.

Puesto que el genoma era genéticamente estable tras el pase en células MDCK, se esperaba que las características biológicas de la vacuna producida en huevos o células MDCK fueran indistinguibles. Sin embargo, el producto viral principal del cultivo celular puede tener algunas diferencias sutiles en comparación con el producto basado en huevos, particularmente con respecto a la modificación postraduccional de las proteínas virales HA y NA, o a la composición de lípidos en la membrana viral; pudiendo cambiar ambas potencialmente las propiedades físicas globales del virión. Los datos preclínicos preliminares sobre la antigenicidad de la vacuna producida por cultivos celulares y producida por huevos demostraron que no había diferencias detectables en este importante parámetro. Se realizaron pases de reservas en huevos de varias cepas de vacuna a través de células MDCK y se determinó la antigenicidad de ambos productos midiendo los títulos de HAI usando antiseros de referencia. Tal como se muestra en la tabla 1, todos los títulos de HAI eran unos el doble de los otros, lo que indica que la replicación de la vacuna en células no cambió la antigenicidad de la vacuna en comparación con el material derivado de los huevos.

Tabla 1. Títulos de HAI de cepas producidas en huevos y células MDCK

Cepa	Título de HAI	
	Derivada de huevos	Derivada de MDCK
A/Panama/20/99	256	256
A/Wuhan/359/95	1024	2048
A/Wyoming/03/2003	512	1024
B/Jilin/20/2003	64	32
B/Hong Kong/330/01	64	64
B/Jiangsu/10/2003	128	128

Ejemplo 2.

Derivación de células MDCK de suero no tumorigénicas

Tradicionalmente se han usado las células MDCK para la titulación de virus influenza (Zambon, 1988, en Textbook of Influenza, ed Nicholson, Webster y Hay, capítulo 24, pág. 324-332, Blackwell Science) y por tanto podrían usarse para la propagación de influenza para la producción de materiales de vacuna. Sin embargo, tradicionalmente se han hecho crecer las células MDCK en formulaciones de medio basal como medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) complementado con FBS. Múltiples informes indican que las células MDCK pueden ser tumorigénicas cuando se cultivan en estas condiciones y/o durante periodos de tiempo prolongados (véase por ejemplo, Gaush *et al.*, Proc Soc Exp Biol Med, 122:931; Leighton *et al.*, 1968, Science, 163:472 y Leighton *et al.*, 1970, Cancer, 26:1022). Por tanto, hay una preocupación acerca del uso de células MDCK para la producción de materiales de vacuna y los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de otras líneas celulares (por ejemplo, PER.C6 y VERO). Desgraciadamente, no todas las cepas de influenza crecen bien en otras líneas celulares de mamífero, en particular

los virus influenza adaptados al frío que comprenden FluMist[®], una vacuna contra la gripe atenuada viva, que sólo crece hasta títulos razonables ($>10^7$ TCID₅₀/ml) en células MDCK (véase el ejemplo 1, citado anteriormente). Los informes iniciales que caracterizaban las células MDCK indican que los pases iniciales de células MDCK pueden no ser tumorigénicos (Gaush *et al.*, 1966, Proc Soc Exp Biol Med.122:931). El objetivo de este experimento fue establecer un medio de cultivo y un protocolo de pases para mantener las células MDCK en un estado no tumorigénico.

Se expandieron células MDCK obtenidas de la ATCC (CCL 34) en matraces en T usando medio DMEM complementado con FBS al 10%, glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l como medio de crecimiento. Se estableció un banco de células pre-maestras de MDCK con las células MDCK crecidas en suero (células MDCK-S), que se sometió a prueba para determinar los contaminantes bacterianos/fúngicos y la contaminación con micoplasmas usando pruebas de rutina realizadas por contratistas comerciales (BioReliance, Rockville, MD). Se encontró que las células eran negativas para la presencia de contaminantes bacterianos/fúngicos. También se encontró que las células MDCK-S eran negativas para la presencia de micoplasmas cultivables. También se sometieron a prueba las células MDCK-S del banco mediante un ensayo de cariotipo y se encontró que eran de origen canino y que tenían un número modal de cromosomas de 78, oscilando los números de cromosomas entre 70 y 84. Entonces se realizaron otros 20 pases de las células MDCK-S a partir de un vial de PreMCB y se sometieron a prueba para determinar la cariología y la tumorigenicidad en un modelo de ratón desnudo adulto vivo. La prueba de cariología demostró que las células MDCK-S del último pase (p 81/24) mostraban el mismo número modal de cromosomas (78) e intervalo de cromosomas (de 70 a 84) que las células MDCK-S del pase inicial, lo que demuestra que las células no cambiaban en los pases prolongados. Cuando se inyectaron por vía subcutánea 1×10^7 células MDCK-S en ratones desnudos adultos no dieron como resultado la formación de ningún nódulo y se consideró que no eran tumorigénicas.

Materiales y métodos

Materiales: Células MDCK (ATCC, n.º de cat.: (CCL-34); matraces T-25, T-75, T-225 (Coming, n.º de cat.: 430639, 430641, 431082); medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en polvo (Gibco, Grand Island NY, formulación n.º: 01-5052EF); suero bovino fetal, irradiado con radiación gamma (JRH, Lenexa KS, n.º de cat.: 12107-500M); L-glutamina (JRH, Lenexa KS, n.º de cat.: 59202-100M); D-glucosa (Amresco, n.º de cat.: 0188-1KG); solución salina tamponada con Dulbecco (DPBS) sin Ca^{2+} y Mg^{+} en polvo (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 21600-069); tripsina al 0,05%- EDTA (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 25300), dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: D2650); colorante azul tripano al 0,4% p/v en PBS (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: T8154); incubador de CO₂ (Forma Scientific, n.º de modelo: 3110); bioanalizador YSI (YSI, n.º de modelo: 2700 select); Vitro Chemistry System (Ortho clinic, Modelo: DT60 II); hematocitómetro de Neubaurr mejorado (Hausser Scientific, Brightline 0,1 mm de profundidad/Reichert, Brightline 0,1 mm de profundidad).

Subcultivo de células MDCK (MDCK-S) en suero en matraces de cultivo tisular: Se obtuvo un vial de células MDCK en suero de la ATCC. Se hicieron crecer las células en medio DMEM complementado con un 10% (v/v) de FBS, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM en matraces T-75. Se realizaron pases de las células 3 ó 4 días tras la siembra, realizándose un cambio de medio completo en el día 3 tras la siembra si se había realizado el pase de las células el día 4. Se recuperaron las células de los matraces en T tal como se describe más adelante.

Se eliminó el medio de crecimiento consumido y se lavó la monocapa de células dos veces con DPBS (libre de calcio y magnesio). Se añadió la cantidad apropiada de tripsina-EDTA (3 ml/T-75, 7,5 ml/T-225), precalentado en un baño de agua a 37°C, a cada matraz y se incubaron los matraces en T en un incubador de CO₂ al 5%, a 37°C, durante aproximadamente 15-20 min. Se comprobaron los matraces cada 5 minutos para comprobar si células se habían separado y se dieron golpecitos a los matraces varias veces para ayudar a separar las células. Cuando las células se habían separado completamente del matraz en T, se inhibió la tripsina mediante la adición de volúmenes iguales de medio de crecimiento completo que contenía 10% de suero (3 ml/T-75, 7,5 ml/T-225). Se aspiró la suspensión celular hacia arriba y hacia abajo con una pipeta de tamaño apropiado para romper cualquier agrupación grande de células. Se realizó el recuento de dos muestras de suspensión celular de 0,5 ml en un hemacitómetro. Se repitieron los recuentos celulares si los resultados de los dos recuentos no eran uno el 15% del otro. Se diluyeron las células hasta $0,05 \times 10^6$ células viables/ml en medio de crecimiento caliente recién preparado (DMEM +10% de FBS + glucosa 4,5 g/l + glutamina 4 mM) en matraces nuevos y se sembraron en matraces en T (35 ml/T75 o 100 ml/T-225). Entonces se incubaron los matraces en un entorno de CO₂ al 5%, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 3 días antes del subcultivo o del cambio de medio.

Preparación del banco de células MDCK-S: Se expandieron células MDCK-S en matraces en T tal como se describió anteriormente hasta que se pudo recuperar la cantidad de células requerida total para el banco (4×10^6 células/vial x número de viales). Se recuperaron las células MDCK-S cuando estaban en la fase de crecimiento exponencial (3 días tras la siembra) mediante tripsinización tal como se ha descrito. Se reunieron las suspensiones de células MDCKS de matraces individuales y se recuperaron las células mediante centrifugación a 150-250 g durante 7 ± 1 min. Se eliminó por aspiración el sobrenadante de cada tubo y se resuspendieron los sedimentos de células en medio de crecimiento completo recién preparado (DMEM + FBS al 10% + glucosa 4,5 g/l + glutamina 4 mM). Se reunieron las suspensiones celulares de diferentes frascos de agitación y se aspiró la suspensión celular hacia arriba y hacia abajo con una pipeta varias veces para romper cualquier agrupación grande de células. Se

determinó el número de células totales y se determinó el número total de viales que pudo congelarse a 4×10^6 células/vial.

Entonces se ajustó el volumen de suspensión celular al valor anterior usando medio de crecimiento recién preparado. Se añadieron volúmenes iguales de medio de congelación 2X recién preparado (DMEM + FBS al 10% + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l + 15% DMSO) a la suspensión celular. Se mezcló completamente la suspensión celular y se dispensó 1 ml de suspensión celular en cada criovial. Se transfirieron todos los viales a recipientes de congelación Nalgene y se colocaron en un congelador a -60°C . Se transfirieron los viales congelados a un tanque de almacenamiento con nitrógeno líquido.

Preparación de curva de crecimiento de células MDCK-S en matraces T-75: Se realizaron pases de las células al menos 4 veces (tras descongelar) en su medio de crecimiento antes del estudio de la curva de crecimiento celular. Se expandieron las células MDCK-S en matraces T-225 con el fin de obtener al menos $2,7 \times 10^7$ células totales. Se hicieron crecer los matraces hasta el 80-95% de confluencia antes de la tripsinización tal como se describió anteriormente. Se reunieron las células MDCK-S recuperadas y se aspiró la suspensión celular hacia arriba y hacia abajo con una pipeta varias veces para romper cualquier agrupación grande de células. Se retiraron dos muestras (0,5 ml) para los recuentos de células y se determinó la densidad celular. Se repitieron los dos recuentos de muestras si no era uno el 15% del otro. Entonces se diluyeron $2,7 \times 10^7$ células MDCK-S totales hasta un volumen total de 540 ml de medio de crecimiento completo ($5,0 \times 10^4$ células/ml). Entonces se dispensó esta suspensión de células MDCK-S en 14 x matraces T-75 (35 ml/matraz T-75). Se colocaron los matraces en un incubador de CO_2 al 5%, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se retiraron dos matraces en T diariamente del incubador para los recuentos de células y los análisis metabólicos. Se retiraron dos muestras (aproximadamente 1,0 ml) de medios de cultivo celular de cada matraz para los análisis metabólicos. Se usó una muestra para determinar las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amoniaco usando los analizadores YSI y Vitros. La otra muestra se congeló a -70°C para el análisis de aminoácidos en una fecha posterior. Se recuperaron las células MDCK-S de cada matraz mediante tripsinización tal como se describió anteriormente. También se determinó la densidad celular y el número total de células/matraz en T. Se repitieron los dos recuentos si no era uno el 15% del otro. Los números presentados son el promedio de dos estudios de curvas de crecimiento independientes realizados en dos números de pases diferentes (p63 y p65) de células MDCK-S.

Prueba de cariólogía: Se llevó a cabo la prueba de cariólogía en Applied Genetics Laboratories en Melbourne, Florida. En resumen, se enviaron células MDCK-S crecidas en matraces T-225 a Applied Genetics Laboratories. Las células se mantuvieron y se subcultivaron según los métodos enumerados anteriormente. Cuando se pensó que las células tenían suficientes células mitóticas, se recogieron las células para el análisis mitótico. Se trataron las células con colcemida ($0,02 \mu\text{g/ml}$) durante 150 minutos a 37°C . Entonces se recogieron las células mediante tripsinización, y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 200 g. Se eliminó por aspiración el sobrenadante y se resuspendieron las células en disolución hipotónica calentada previamente y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se sedimentaron las células hinchadas mediante centrifugación y luego se fijaron mediante incubación en disolución de Carnoy (metanol:ácido acético glacial 3:1) a temperatura ambiente durante 40 minutos. Entonces se centrifugaron de nuevo las células y se lavaron las células al menos dos veces con disolución de fijación de Carnoy. Tras la última centrifugación, se suspendieron las células en de 1 a 3 ml de disolución de fijación recién preparada para producir una suspensión celular opalescente. Se colocaron gotas de la suspensión celular final en portaobjetos limpios y se secaron al aire.

Se tiñeron las células mediante la adición de la disolución de tinción de Wright en tampón fosfato a los portaobjetos y e incubación durante 7-10 minutos. Se lavaron los portaobjetos con agua corriente tras 7-10 minutos y luego se secaron al aire. Se exploraron las células con objetivos de poca potencia (10X) para encontrar células en la etapa de metafase de la división celular y se analizaron los cromosomas de células en metafase a través de lentes de inmersión en aceite de alta potencia (100X). Se analizaron 100 células en metafase para determinar anomalías citogénicas y para el recuento de cromosomas. Se exploraron 1000 células para determinar la frecuencia de poliploides y el índice mitótico (porcentaje de células en mitosis).

Pruebas de esterilidad de PRE-MCB de MDCK-S (bacteriostáticas y fungistáticas y esterilidad de cuatro medios): Se sometieron a prueba Pre-MCB de MDCK-S para determinar la actividad bacteriostática y fungistática en Bioreliance Inc., Rockville, Maryland. El ensayo se realizó para cumplir los requisitos de las normas US 26 y 21 CFR 610,12. Estos ensayos someten a prueba si hay diferencia en el crecimiento de los microorganismos control (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium spirogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus Niger*) inoculados en medio de caldo apropiado que contenía 0,1 ml de muestra de prueba frente a medio de caldo que contenía microorganismos control únicamente. En resumen, se inoculó el artículo de prueba en tres tubos de TSB (medio de digestión de soja-caseína), cuatro tubos de THIO (medio de tioglicolato fluido), dos tubos de SAB (agar dextrosa Sabouraud) y un tubo de PYG (extracto de levadura y peptona). Entonces se inoculó cada microorganismo control que contenía menos de 100 ufc de microorganismos control en el tipo de medio apropiado. Los controles positivos consistieron en *Bacillus subtilis* en TSB y THIO, *Candida albicans* en TSB y SAB (a $20-25^\circ\text{C}$ y $30-35^\circ\text{C}$), *Clostridium spirogenes* en THIO y PYG, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*. El control negativo fue PBS estéril. Se incubaron los medios durante 3-5 días y se comprobaron para

determinar el crecimiento de microorganismos.

También se analizó el artículo de prueba para determinar la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos usando la prueba de esterilidad de cuatro medios en Bioreliance, Rockville MD y se diseñaron los ensayos para cumplir los requisitos de las normas USP 26, EP y 21 CFR610, 12. En resumen, se inoculó el artículo de prueba en dos tubos de TSB (medio de digestión de soja-caseína), dos tubos de THIO (medio de tioglicolato fluido), tres tubos de SAB (agar dextrosa Sabouraud) y dos tubos de PYG (extracto de levadura y peptona). Se incubaron los medios a temperaturas apropiadas (se incubaron medios inclinados de SAB a dos temperaturas) y se observaron todos los tubos durante un periodo de 14 días comprobándose los tubos en los días tercero/cuarto o quinto, los días séptimo u octavo y el día catorce de las pruebas. Cualquier tubo inoculado con el artículo de prueba que apareciera turbio se sembró en placa y se realizaron tinciones de Gram en la placa. Los controles negativos fueron PBS estéril.

Prueba de micoplasmas/micoplasmosis: Se envió un vial de células MDCK-S congeladas (lote de preMCB de MDCK n.º 747p105) a Bioreliance. Se expandieron las células y se cultivaron en matraces en T tal como se explicó anteriormente. Se prepararon lisados de células a una concentración de 5×10^5 células/ml y se congelaron a -70°C . Se sometió a prueba el artículo de prueba para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma orale* y *Mycoplasma hyorhinis* ya sea en caldo/placas de agar y/o en células VERO.

Para el ensayo de aislamiento en agar, se sometió a prueba el artículo de prueba o bien con adiciones conocidas o bien sin adiciones conocidas en placas de agar o frascos de caldo. Se realizaron adiciones conocidas en el artículo de prueba con *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma orale* hasta lograr una dilución de 10 a 100 ufc/0,2 ml (para las pruebas de Agar) y de 10 a 100 ufc/10 ml (para el ensayo en semi-caldo). En una porción de la muestra de prueba no se realizaron adiciones conocidas. Se inocularon 4 frascos de caldo semisólido con 10 ml de cada muestra con adiciones conocidas (2 frascos) o sin adiciones conocidas (2 frascos). Se incubó un frasco de cada muestra de adiciones conocidas/sin adiciones conocidas o bien en condiciones aerobias o bien anaerobias a temperaturas apropiadas. Se inocularon 10 placas de agar tipo A y 10 placas de agar tipo B con cada muestra con adiciones conocidas o muestra sin adiciones conocidas. Se incubó la mitad de las placas de agar tipo A y placas de agar tipo B o bien en condiciones aerobias o bien en condiciones anaerobias a temperaturas apropiadas. El caldo semisólido de *Mycoplasma* sin inocular sirvió como control negativo no inoculado. Se observaron todos los frascos de caldo durante 21 días. Cada frasco de caldo (con la excepción del control negativo no inoculado) se subcultivó en los días 3, 7 y 14 en placas de agar tipo A o placas de agar tipo B (10 placas de cada uno, 0,2 ml/placa) y se incubaron en las mismas condiciones que el frasco apropiado. Se examinaron una vez al día durante 21 días.

Para el ensayo de cultivo de células VERO potenciado, se sometió a prueba el artículo de prueba con y sin adiciones conocidas. Se realizaron adiciones conocidas en el artículo de prueba con *M. orale* y *M. hyorhinis* a una concentración de 10-100 ufc/0,2 ml. Los artículos de prueba con adiciones conocidas, los artículos de prueba sin adiciones conocidas, los controles positivos y los controles negativos se inocularon cada uno en matraces T-75 de cultivos de células VERO. Tras 3-5 días de incubación, se rascaron y se congelaron instantáneamente las células de cada matraz. Se inocularon dos decenas de un ml de lisado celular de cada matraz, en cada pocillo de una placa de seis pocillos que contenía células VERO. Además, se inocularon controles positivos y negativos en pocillos apropiados de placas de seis pocillos que contenían células VERO. Tras 3-5 días, se fijaron las células y se tiñeron con colorante HOECHT de unión a ADN y se evaluaron para determinar la presencia de *Mycoplasma*.

Pruebas de tumorigenicidad de células MDCK-S en ratones desnudos: Se realizó la evaluación de la formación de tumores en ratones atímicos desnudos (nu/nu) por BioReliance®, Rockville, MD. En resumen, se inyectaron por vía subcutánea a treinta ratones atímicos hembra (de 4 semanas de edad) 0,2 ml (1×10^7 células/ratón) de o bien control positivo (células 18C1-10T), control negativo (células embrionarias de hámster chino; células SHE) o las células de prueba (células MDCK de suero, alto número de pases 747p105). Se aleatorizó a los animales antes de la inyección y se inyectó a todos los ratones usando una aguja de calibre 22 el mismo día. Se observó a los animales cada día laborable y se palpó el sitio de inyección dos veces a la semana para determinar el desarrollo de lesiones durante un periodo de ochenta y cuatro días. Se midió cada lesión se mantuvo a los animales siempre que no hubiera un aumento visible en el tamaño de la lesión. Esto fue durante un máximo de 3 meses. Se sacrificó a todos los animales y se realizó la autopsia tras 84 días y se analizaron el sitio de inyección, los pulmones, los ganglios linfáticos escapulares y las lesiones macroscópicas mediante métodos histopatológicos.

Replicación de cepas de influenza adaptadas al frío en MDCK-S: Se sembraron matraces T-75 a 5×10^4 células/ml (35 ml de DMEM + FBS al 10% + glutamina 4 mM) y se hicieron crecer en un incubador mantenido a 37°C y CO_2 al 5% durante 3 días. 3 días tras la siembra, se determinaron las totales por matraz en T recogiendo usando tripsina - EDTA y se determinaron los recuentos de células mediante exclusión con azul tripano. Los matraces en T restantes se infectaron de la siguiente forma. Se eliminó por aspiración el medio de crecimiento y se lavaron las células dos veces con 10 ml de DPBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) por matraz. Se determinó la cantidad de virus para infectar cada matraz en T a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 según la ecuación siguiente:

$$\text{Cantidad de virus (ml)} = \frac{\text{Células totales por matraz} * \text{MOI}}{10^{(\log \text{TCID}_{50} / \text{ml})}}$$

Definiéndose MOI como las partículas de virus por célula añadida.

Entonces se añade la cantidad requerida de virus a 35 ml de medio tras la infección en cada matraz en T (DMEM + glutamina 4 mM + tripsina TPCK 60 mU/ml). Entonces se incuban los matraces en T a 33°C, CO₂ al 5% y se toman muestras cada día durante 6 días. Se añadieron 10X SP a cada muestra como estabilizador y se almacenaron las muestras a <-70°C antes de someter a prueba para determinar la infectividad.

Se determinó la concentración de virus presente en cada muestra según un ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular media (TCID₅₀) que mide los viriones infecciosos. En resumen, se hicieron crecer células MDCK hasta monocapas confluentes en placas de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron diluciones en serie de muestra de virus influenza ca/ts. Normalmente las muestras en el ensayo de células MDCK estaban a una dilución final de 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰. Los pocillos en las columnas 1-5 y 8-12 contenían muestra diluida de virus y los pocillos en las columnas 6-7 recibieron sólo diluyente de virus y sirvieron como controles celulares. Este formato produjo dos puntos de datos (n=2) por placa. La replicación del virus en las células MDCK dio como resultado la muerte celular y la liberación del virus progenie en el sobrenadante del cultivo. El virus progenie infectó a otras células, dando como resultado la destrucción final de la monocapa. Se permitió que se desarrollara el efecto citopático (CPE) que resulta de la infección durante una incubación en un entorno de CO₂ al 5%, 37 ± 1°C, durante un periodo de seis días. Entonces se extrajeron las placas del incubador, se desecharon los medios en los pocillos, y se añadieron 100 µl de MEM + glutamina 4 mM+ penicilina/estreptomicina + MTT a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 6 h a 37°C, CO₂ al 5% y se determinó el número de pocillos que mostraba CPE mediante inspección visual del color formado en cada pocillo (amarillo/naranja significa pocillos con CPE morado oscuro significa sin CPE). Se usó el número de pocillos que mostraba CPE en cada mitad de placa para calcular el título (log₁₀ TCID₅₀/ml) basándose en la modificación de Karber modificación del método de Reed-Muench.

Resultados y discusión

Se descongelaron dos viales congelados de células MDCK en suero en medio de crecimiento completo (DMEM + FBS al 10% + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l) en ocasiones separadas en matraces T-75. La viabilidad celular con la descongelación fue del 97% y el 98%, respectivamente. Las células lograron la confluencia tres días tras la descongelación. La morfología de las células fue de tipo epitelial y similar a la reserva obtenida de la ATCC (figura 3). Se realizaron pases de estas células 5 veces y se estableció un banco de células pre-maestras PreMCB para estas células MDCK crecidas en suero (células MDCK-S). La figura 2 explica resumidamente el procedimiento usado para la derivación del banco de células pre-maestras MDCK-S (pre-MCB).

En la figura 4 se muestran las curvas de crecimiento para células MDCK-S en medio DMEM - FBS al 10%. Los resultados son el promedio que dos experimentos que usan células con números de pases diferentes (P63 y P65). Las células MDCK-S tenían una fase de latencia de aproximadamente 1 día cuando no se duplicó el número de células a partir de la siembra (1,75 x 10⁶ células totales/matraz T75 en la siembra y 2,9 x 10⁶ células totales/matraz T-75, día 1). La tasa de consumo de glucosa/producción de lactato fue casi cero durante el primer día, lo que demuestra que las células estaban en la fase de latencia (figura 5). Entonces, las células crecieron exponencialmente durante el periodo de crecimiento celular antes de entrar en la fase estacionaria en el día 4 tras la siembra. El tiempo de duplicación de las células MDCK-S en la fase exponencial fue de 23,1 horas. Durante la fase exponencial, el consumo de glucosa y la producción de lactato se correlacionaron entre sí, aumentando la concentración de lactato a medida que disminuía la concentración de glucosa (figura 5). La tasa de consumo de glucosa/producción de lactato se correlacionaron bien con la curva de crecimiento celular (compárense las figuras 4 y 5). Las tasas fueron bajas durante la fase de latencia, aumentaron hasta 2,93 mM/día para la glucosa, 3,43 mM/día para el lactato durante la fase exponencial desde el día 1 hasta el día 4.

Las células MDCK-S entraron en la fase estacionaria en el día 4 tras la siembra, y lograron una densidad celular máxima de aproximadamente 29 ± 0,99 x 10⁶ células en el día 5 tras la siembra (figura 4). El número de células permaneció constante tras alcanzar la densidad máxima y hasta el día 7 en este estudio. La tasa de consumo de glucosa y producción de lactato se ralentizó hasta 0,33 mM/día para la glucosa y 0,25 mM/día para el lactato en la fase estacionaria. Quedaban todavía aproximadamente 12 mM de glucosa en el medio tras el cultivo de 7 días. La razón de la cantidad de glucosa consumida con respecto al lactato producida en el día 4 fue de 1,2.

El consumo de glutamina y tanto la producción de glutamato como la de amoniaco de las células MDCK-S se muestran en la figura 6. La tasa de consumo de glutamina y la producción de amoniaco también se correlacionaba con la curva de crecimiento celular (compárense las figuras 4 y 6). Las células MDCK-S consumían glutamina a una tasa de 0,49 mM/día durante la fase de crecimiento exponencial hasta el día 4 mientras que producían amoniaco a una tasa de 0,32 mM/día hasta el día 5. Entonces, la tasa de consumo de glutamina disminuyó hasta 0,24 mM/día mientras que la tasa de producción de amoniaco disminuyó hasta 0,11 mM/día, cuando las células entraban en la fase estacionaria. La razón de producción de amoniaco con respecto a consumo de glutamina fue de 0,7 en el día 4 tras la siembra. No se acumuló glutamato generado a partir del metabolismo de glutamina en este estudio de crecimiento celular de 7 días.

Se sometió a prueba la cariología de las células MDCK-S en el pase 61/4 y en el pase 81/24. El análisis de cromosomas de banda G mostró que las células eran de origen canino. En la figura 7 se muestran las distribuciones

del número de cromosomas en 100 células en metafase. El recuento de cromosomas osciló entre 70 y 84 cromosomas por metafase para las células con bajo número de pases 61/4 y entre 70 y 84 cromosomas para un alto número de pases 81/24. Ambos números de pases tenían un número modal de cromosomas de 78 cromosomas. La distribución de cromosoma no cambió con los pases. La modalidad de células fue tal como se esperaba para una célula de riñón canina normal (Starke *et al.*, 1972, Prog Immunobiol Stand., 5:178).

Se sometió a prueba preMCB de MDCK-S para determinar la presencia de cualquier contaminante bacteriano, fúngico o de micoplasmas. Se hizo pasar Pre-MCB por la prueba de esterilidad (prueba de esterilidad de cuatro medios usando el método de inoculación directa para comprobar los contaminantes bacterianos y fúngicos) y se encontró que era negativo para la presencia de micoplasmas (ensayo cultivable en agar y no cultivable en agar). También se encontró que el artículo de prueba no inhibía el crecimiento de controles positivos tanto en la prueba de bacteriostasis/fungistasis como en la prueba de micoplasmastatis.

Se colocaron células MDCK-S en el pase 81/24 (pre-MCB +20 pases) en ratones desnudos para la prueba de tumorigenicidad durante 3 meses. No se diagnosticó neoplasma en ningún ratón que se inoculó con células MDCK-S, lo que demuestra que las células MDCK-S no eran tumorigénicas (tabla 4).

Se sometieron a prueba las células MDCK-S y se encontró que podían soportar la replicación de cepas de influenza reordenantes atenuadas, sensibles a la temperatura, adaptadas al frío (tabla 2).

Tabla 2: Crecimiento de cepas de virus influenza adaptadas al frío en células MDCK adaptadas a MediV SF101 en suero y libre de suero

Cepa de virus (reordenante 6:2)	MDCK en suero (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	MDCK libre de suero (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)
A/New Caledonia/20/99	8,1	7,8
A/ Texas/36/91	6,4	<5,2
A/Panama/2007/99	6,8	6,4
A/Sydney/05/97	7,0	6,5
B/Brisbane/32/2002	7,2	7,5
B/HongKong/330/01	7,2	7,4
B/Victoria/504/2000	6,9	7,5

Ejemplo 3.

Derivación de células MDCK libres de suero en medio de Taub

Los resultados detallados en el ejemplo 2 anterior demuestran que las células MDCK pueden cultivarse en condiciones que mantienen su morfología epitelial y cariología normal, así como su capacidad para replicar cepas de influenza adaptadas al frío. Además, se demostró que el cultivo de células MDCK en las condiciones desarrolladas en el estudio anterior da como resultado células MDCK que no son tumorigénicas. Sin embargo, el medio de cultivo usado en el ejemplo 2 contiene suero bovino fetal (FBS). El FBS es una mezcla compleja de constituyentes y se han notificado problemas de variación de un lote a otro. Además, los problemas continuados con la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en vacas plantean preocupaciones de seguridad. Es importante el desarrollo de medios libres de suero en los que se mantengan las características de crecimiento y la naturaleza no tumorigénica de la línea de células MDCK-S para aumentar la seguridad de los productos biológicos producidos para terapia y vacunación.

Se expandieron células de riñón canino Madin Darby (MDCK) obtenidas de la ATCC (ccl 34) en matraces en T usando medio DMEM complementado con FBS al 10%, glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l como medio de crecimiento durante 5 pases. Entonces se transfirieron las células a medio de Taub libre de suero (véase la formulación más adelante). Las células adaptadas para crecer en las formulaciones de medio de Taub se designaron MDCK-T. Se estableció un pre-MCB para las células MDCK-T (véase la figura 8) y se sometieron a prueba para determinar contaminantes bacterianos/fúngicos y la contaminación con micoplasmas. También se sometieron a prueba las células MDCK-T del banco de células pre-maestras mediante un ensayo de cariotipo y se encontró que eran de origen canino y que tenían un número modal de cromosomas de 78, oscilando los números de cromosomas entre 52 y 84. Además, se realizaron pases de células MDCK-T durante al menos otros 20 pases a partir de un vial de preMCB y se sometieron a prueba para determinar la cariología y la tumorigenicidad en un modelo de ratón desnudo adulto vivo. Sin embargo, se encontró que las células MDCK-T eran tumorigénicas en este

modelo, lo que indica que el medio de Taub publicado no soporta el cultivo estable de células MDCK para la producción de material de vacuna humana.

Materiales y métodos

5 **Materiales:** Células MDCK (ATCC, n.º de cat.: CCL-34, pase 54); matraces T-25, T-75, T-225 (Corning, n.º de cat.: 430639, 430641, 431082); medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en polvo (Gibco, Grand Island NY, formulación n.º:01-5052EF); mezcla de nutrientes - medio F12 de Ham en polvo (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 21700-075); suero bovino fetal, irradiado con radiación gamma (JRH, Lenexa KS, n.º de cat.: 12107-500M); L-glutamina (JRH, Lenexa KS, n.º de cat.: 59202-100M); D-glucosa (Amresco, n.º de cat.: 0188-1KG); solución salina tamponada con Dulbecco (DPBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} en polvo (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 21600-069);
 10 insulina en polvo (Serological, n.º de cat.:4506); transferrina (forma APO) (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.:11108-016); prostaglandina E1 (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: P7527); hidrocortisona (Mallinckrodt, n.º de cat.: 8830(-05)); triyodotironina (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: T5516); selenito sódico (EMD, n.º de cat.: 6607-31); tripsina al 0,05%-EDTA (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 25300); inhibidor de tripsina extraído de haba de lima (Worthington, n.º de cat.:LS002829); dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: D2650);
 15 colorante azul tripano al 0,4% p/v en PBS (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: T8154); hematocitómetro de Neubaurr mejorado (Hausser Scientific, Brightline 0,1 mm de profundidad/Reichert, Brightline 0,1 mm de profundidad); bioanalizador YSI (YSI, n.º de modelo: 2700 select); Vitro Chemistry System (Ortho clinic, Modelo: DT60 II).

20 **Formulación del medio de Taub libre de suero:** El medio de Taub (Taub y Livingston, 1981, Ann NY Acad Sci.,372: 406) es una formulación de medio libre de suero que consiste en de DMEM/HAM F12 (1:1) que contiene glucosa 4,5 g/l y glutamina 4 mM como la formulación de medio basal, a la que se añaden hormonas/factores tal como se indica en la tabla 3.

Tabla 3: Hormonas y factores de crecimiento añadidos a las formulaciones de medio libre de suero

Nombre del componente	Concentración final
Insulina	5 µg/ml
Transferrina	5 µg/ml
Triyodotironina (T_3)	5×10^{-12} M
Hidrocortisona	5×10^{-8} M
Prostaglandina E_1	25 ng/ml
Selenito sódico	10^{-8} M

25 SF de Taub se prepara nuevo en el momento de los pases o se realimenta mediante la adición de disoluciones madre de complementos hormonales a medio SF DMEM/F12 de Ham + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l + selenito sódico 10^{-8} M. Se preparan 100 ml de medio de Taub mediante la adición de 100 µl de disolución madre de insulina (5 mg/ml), 100 µl de disolución madre de transferrina (5 mg/ml), 100 µl de disolución madre de triyodotironina (T_3) (5×10^{-9} M), 5 µl de disolución madre de hidrocortisona (10^{-3} M) y 50 µl de disolución madre de prostaglandina E_1 (50 µg/ml) hasta medio basal DMEM/F12 de Ham + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l + selenito sódico 10^{-8} M. Todas las disoluciones madre se preparan de la siguiente forma:

30 **Disolución madre de insulina** – Se prepara una disolución madre de 5 mg/ml disolviendo la cantidad apropiada de insulina en HCl 0,01 N. Se hace pasar la disolución a través de un filtro de 0,2 micrómetros de calidad para esterilización y se añaden alícuotas en un criovial Nalgene y se almacena a 4°C.

35 **Disolución madre de transferrina** – Se prepara una disolución madre de 5 mg/ml disolviendo la cantidad apropiada de transferrina en agua MilliQ. Se hace pasar la disolución a través de un filtro de calidad para esterilización y entonces se añaden alícuotas en un criovial Nalgene y se almacena a < 20°C.

40 **Disolución madre de triyodotironina (T_3)** - Se prepara una disolución madre disolviendo la cantidad apropiada de T_3 en NaOH 0,02 N para obtener una disolución 10^{-4} M. Esta disolución madre se diluye adicionalmente hasta una concentración de disolución madre de 5×10^{-9} M con NaOH 0,02 N, se hace pasar a través de un filtro de calidad para esterilización, se añaden alícuotas en un criovial Nalgene y se almacena a < -20°C.

Disolución madre de hidrocortisona – Se prepara una disolución madre 10^{-3} M disolviendo la cantidad apropiada de hidrocortisona en EtOH al 100% y se añaden alícuotas en crioviales Nalgene. Se almacenan los viales a 4°C durante 3-4 meses.

Disolución madre de prostaglandina E₁ – Se prepara una disolución madre de 50 µg/ml disolviendo la cantidad apropiada de PGE1 en EtOH estéril al 100% y se añaden alícuotas en un criovial Nalgene y se almacenan a < -20°C.

- 5 Disolución madre de Na₂SeO₃ – Se prepara una disolución madre de 10⁻² M disolviendo la cantidad apropiada de selenito sódico en agua WFI o agua MilliQ. Esto se diluye adicionalmente en agua hasta una concentración final de 10⁻⁷ M se hace pasar a través de un filtro de calidad para esterilización y se almacena a 4°C.

- 10 Adaptación de células MDCK-S en medio de Taub libre de suero: Se hizo crecer un vial congelado de células MDCK de la ATCC (pase 54) en medio DMEM con FBS al 10% con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM durante 5 pases (tal como se describió anteriormente) antes de pasarlo a medio de Taub libre de suero. Se recuperaron las células MDCK en suero crecidas en un matraz T-75 mediante tripsinización. Se eliminó el medio de crecimiento consumido y se lavó la monocapa de células dos veces con DPBS (libre de calcio y magnesio) y luego se desechó la DPBS. Se añadió la cantidad apropiada de tripsina-EDTA precalentado (3 ml/T-75) y se incubó el matraz en T en un incubador de CO₂ al 5%, a 37°C durante aproximadamente 15 min. Se dieron golpecitos a los matracos contra la palma de la mano varias veces hasta separar completamente las células. Se añadió un volumen igual de inhibidor de tripsina extraído de haba de lima para neutralizar la tripsina y se tomaron dos muestras para determinar la concentración de células en la suspensión celular. Entonces se diluyeron 1,75x10⁶ células en 35 ml de medio de Taub en un matraz T75 nuevo. Se colocó el matraz en un incubador de cultivo celular mantenido a CO₂ al 5%, 37 ± 1°C. Las células o bien se subcultivaron 3 días tras la siembra o bien se realizó un cambio de medio completo en el día 3 seguido por subcultivo en el día 4 tras la siembra.

- 20 Subcultivo de células MDCK adaptadas al medio de Taub: Se eliminó el medio de crecimiento consumido y se lavó la monocapa de células dos veces con DPBS (libre de calcio y magnesio). Se añadió la cantidad apropiada de tripsina-EDTA precalentado (3 ml/T-75, 7,5 ml/T-225) y se incubó el matraz en T en un incubador de CO₂ al 5%, a 37°C durante aproximadamente 15 min. Se dieron golpecitos a los matracos contra la palma de la mano varias veces hasta separar completamente las células. Entonces se inhibió la tripsina mediante la adición de volúmenes iguales de inhibidor de tripsina extraído de haba de lima (3 ml/T-75, 7,5 ml/T-225). Se homogeneizó la suspensión celular aspirando hacia arriba y hacia abajo con una pipeta de tamaño apropiado. Se tomaron dos muestras de 0,5 ml de suspensión celular para el recuento celular. Se repitieron los recuentos celulares si los resultados de los dos recuentos no eran uno el 15% del otro. Tras el recuento, se diluyeron las células hasta 0,05 x 10⁶ células viables/ml en medio de Taub precalentado preparado recientemente en matraces nuevos, para un volumen total de 35 ml/T75 o 100 ml/T-225. Entonces se incubaron los matraces en un entorno de CO₂ al 5%, 37 ± 1°C. Las células o bien se subcultivaron en nuevos matraces en T en el día 3 (tal como se describe más adelante) o bien se realizó un cambio de medio completo y se subcultivó el cultivo en nuevos matraces en T en el día 4 tras la siembra.

- 30 Preparación de bancos preMCB de células MDCK adaptadas al medio de Taub: Se prepararon bancos de células pre-maestras para la línea celular MDCK adaptada en medio de Taub libre de suero (MDCK-T) tal como se describió en el ejemplo 2 anteriormente, excepto en que el medio de congelación 2X era el medio de Taub + DMSO al 15%.

- 35 Caracterización de células MDCK adaptadas al medio de Taub (MDCK-T): Se realizaron las pruebas de cariología, esterilidad y micoplasmas de preMCB de MDCK-T tal como se describe en el ejemplo 2, excepto en que se usó medio de Taub en lugar de medios completos que contenían suero. Además, se examinaron las características de la curva de crecimiento de células MDCK-T en matraces T-75 y la replicación de cepas de influenza adaptadas al frío en células MDCK-T, tal como se describe en el ejemplo 2, excepto en que se usó medio de Taub en lugar de medios completos que contenían suero. Se realizaron estudios de tumorigenicidad en células MDCK-T en el pase 88/29 (pre-MCB +20 pases) por BioReliance tal como se describió en el ejemplo 2 anteriormente.

Resultados y discusión

- 45 Se descongeló un vial congelado de preMCB de células MDCK-T (pase 64/5) en medio de Taub libre de suero en matraces T-75. La viabilidad celular fue del 97% y se recuperaron 5,25 x 10⁶ células del vial congelado con la descongelación. Las células fueron confluentes tres días tras la descongelación. La morfología celular mostró células de tipo epitelial similares a las células MDCK-S originales (figura 9).

- 50 En la figura 10 se muestran las curvas de crecimiento para las células MDCK-T en medio SF de Taub. Los resultados son el promedio de dos experimentos usando células con números de pases diferentes (P71/12 y P73/14). Las células MDCK-T no tenían fase de latencia, duplicándose las células un día tras la siembra (3,42 x 10⁶ células totales/matraz T75 en el día 1 frente a 1,75 x 10⁶ células totales/matraz T75 en el día 0). Las células estuvieron en la fase exponencial de crecimiento hasta el día 4, cuando entraron en la fase estacionaria. El tiempo de duplicación de las células en la fase exponencial fue de 20,4 h. Durante la fase exponencial (del día 0 al día 4) utilizaron glucosa y glutamina (figuras 11 y 12) mientras producían lactato y amoníaco. La tasa de consumo de glucosa/producción de lactato se correlacionó bien con la curva de crecimiento celular (compárense las figuras 10 y 11). La tasa de consumo de glucosa fue de 1,78 mM/día durante la fase exponencial desde el día 0 hasta el día 4 y el lactato se produjo a una tasa de 2,88 mM/día. Las células MDCKT sólo consumieron aproximadamente un total de glucosa 10 mM en el medio hasta el cultivo de 7 días. La razón de la cantidad de glucosa consumida con respecto al lactato producido en el día 4 tras la siembra fue de 1,2. La tasa de consumo de glucosa y la producción de lactato se

ralentizaron tras el día 4 cuando las células entraron en la fase estacionaria, siendo el consumo de glucosa de 0,65 mM/día y produciéndose el lactato a una tasa de 0,46 mM/día. Se logró una densidad celular máxima de $37 \pm 0,24 \times 10^6$ alrededor del día 4 tras la siembra. La densidad celular no disminuyó durante la fase estacionaria y se mantuvo constante hasta el día 7.

5 La tasa de consumo de glutamina y la tasa de producción de amoníaco fueron similares a los perfiles de crecimiento de células MDCK-T y de glucosa/lactato (compárense las figuras 10,11 y 12). Las células MDCK-T consumían glutamina a una tasa de 0,36 mM/día durante la fase de crecimiento exponencial (del día 0 al día 4) disminuyendo la tasa hasta 0,27 mM/día cuando las células entraban en la fase estacionaria (del día 4 al día 7). La producción de amoníaco aumentó linealmente hasta el día 7 a una tasa de 0,22 mM/día. La razón de producción de amoníaco con respecto al consumo de glutamina fue de 0,49 en el día 4 tras la siembra. La concentración de glutamato no cambió de manera apreciable durante todo el periodo de 7 días.

Se sometieron a prueba las células MDCK-T para determinar su capacidad para soportar la replicación de influenza ca/ts según el ejemplo 2. Los resultados mostrados en la tabla 2 indican que las células MDCK-T podían soportar la replicación de repeticiones de influenza ca/ts hasta niveles casi iguales a los observados para las células MDCK-S.

15 Se sometió a prueba la cariólogía de las células MDCK-T en el pase 68/9 y en el pase 88/29. El análisis de cromosomas de banda G mostró que las células eran de origen canino. En la figura 13 se mostraron las distribuciones del número de cromosomas en 100 células en metafase. El recuento de cromosomas osciló entre 52 y 82 cromosomas por metafase para las células con bajo número de pases 68/9, y osciló entre 54 y 82 cromosomas para un alto número de pases de 81/24 lo que indica que la distribución de cromosomas no cambió con los pases. Sin embargo, puede observarse que las células MDCK-T muestran una propagación más amplia en el número de cromosomas (de 52 a 84) en comparación con las células MDCK-S (70-84).

20 Se sometió a prueba preMCB de MDCK-T para determinar la presencia de cualquier contaminante bacteriano, fúngico o de micoplasmas. Se hizo pasar pre-MCB de MDCKT por la prueba de esterilidad (prueba de esterilidad de cuatro medios usando el método de inoculación directa para comprobar los contaminantes bacterianos y fúngicos) y se encontró que era negativo para la presencia de micoplasmas (ensayo cultivable en agar y no cultivable en agar). También se encontró que el artículo de prueba no inhibía el crecimiento de controles positivos tanto en la prueba de bacteriostasis/fungistasis como en la prueba de micoplasmastatis.

25 Se colocaron células MDCK-T en el pase 88/29 (pre-MCB +20 pases) en ratones desnudos para la prueba de tumorigenicidad durante 3 meses. El artículo de prueba se diagnosticó como adenocarcinomas en el sitio de inyección en seis de diez ratones con artículo de prueba. Esto muestra que las células MDCK crecidas en el medio SF de Taub son tumorigénicas. La tumorigenicidad, estimada como TP50 y la cariólogía para las células MDCK-S y MDCK-T se resumen en la tabla 4 más adelante.

Ejemplo 4.

Derivación de células MDCK libres de suero en medio MediV libre de suero:

35 Los resultados detallados en el ejemplo 3 demuestran que, aunque las células MDCK adaptadas a crecimiento en medio de Taub libre de suero (MDCK-T) tenían excelentes características de crecimiento y podían soportar la replicación de cepas de influenza ca/ts, eran tumorigénicas. Por tanto, estos resultados indican que las células MDCK pueden llegar a transformarse fácilmente en las formulaciones de medio libres de suero convencionales presentadas en la bibliografía. Según la invención, se desarrollaron varias formulaciones de medio libres de suero adicionales y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para mantener la naturaleza no tumorigénica de las células MDCK-S. Se adaptaron células MDCK-S a cada una de las nuevas formulaciones libres de suero designadas MediV SF 101, 102 y 103. Estas líneas celulares adaptadas libres de suero se designaron MDCK-SF101, -SF102 y -SF103, respectivamente y se denominan colectivamente "MDCK-SF". Se generaron preMCB para cada línea celular adaptada de MDCK-SF. Se sometieron a prueba preMCB de la línea celular MDCK-SF para determinar contaminantes bacterianos/fúngicos y la contaminación con micoplasma (a la espera de los resultados finales). También se sometieron a prueba preMCB de MDCK-SF mediante un ensayo de cariotipo. Las células MDCK-SF101 y MDCK-SF102 tenían un número modal de cromosomas de 78, oscilando los números de entre 70 y 82 y entre 60 y 80, respectivamente. Además, se realizaron pases de las células de cada banco de medio libre de suero durante al menos otros 20 pases a partir de un vial de PreMCB y se sometieron a prueba las células MDCK-SF103 para determinar la cariólogía y la tumorigenicidad en un modelo de ratón desnudo adulto vivo. En el pase 87, se encontró que las células MDCKSF103 tenían un número modal de cromosomas de 78, oscilando entre 66 y 80 y se consideró que no eran tumorigénicas.

55 Materiales: Células MDCK (ATCC, n.º de cat.: CCL-34, pase 54); matraces T-25, T-75, T-225 (Coming, n.º de cat.: 430639, 430641, 431082); medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en polvo (Gibco, Grand Island NY, formulación n.º:01-5052EF); mezcla de nutrientes - medio F12 de Ham en polvo (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 21700-075); suero bovino fetal, irradiado con radiación gamma (JRH, Lenexa KS, n.º de cat.: 12107-500M); L-Glutamina (JRH, LenexaKS, n.º de cat.: 59202-100M); D-glucosa (Amresco, n.º de cat.: 0188-1KG); solución salina tamponada con Dulbecco (DPBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} en polvo (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 21600-069);

5 insulina en polvo (Serological, n.º de cat.:4506); transferrina (forma APO) (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.:11108-016); prostaglandina E1 (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: P7527); hidrocortisona (Mallinckrodt, n.º de cat.: 8830(-05)); tridoyotironina (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: T5516); selenito sódico (EMD, n.º de cat.: 6607-31); tripsina al 0,05%-EDTA (Gibco, Grand Island NY, n.º de cat.: 25300); inhibidor de tripsina extraído de haba de lima (Worthington, n.º de cat.:LS002829); dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: D2650); colorante azul trípano al 0,4% p/v en PBS (Sigma, St. Louis MS, n.º de cat.: T8154); hematocitómetro de Neubaurr mejorado (Hausser Scientific, Brightline 0,1 mm de profundidad/Reichert, Brightline 0,1 mm de profundidad); bioanalizador YSI (YSI, n.º de modelo: 2700 select); Vitro Chemistry System (Ortho clinic, Modelo: DT60 II).

10 Formulación de medios MediV libres de suero (MediV SFM 101, 102 y 103): Cada formulación de medio MediV medio libre de suero usa medio de Taub (véase la sección de métodos del ejemplo 2 anterior) como medios basales y añade complementos tal como sigue:

MediV SF 101: Medio de Taub + peptona de trigo E1 2,5 g/l de Organo Techine (n.º de cat. 19559). La peptona de trigo E1 se almacena en agua como una disolución madre estéril 250 g/l.

15 MediV SF 102: 102: Medio de Taub + 100 X concentrado lipídico químicamente definido de GIBCO BRL (n.º de cat. 11905) añadido a una concentración final de 1X.

MediV SF 103: Medio de Taub + concentrado lipídico a una concentración final de 1X de GIBCO + peptona de trigo E1 2,5 g/l de Organo Technie.

MediV SF 104: Medio de Taub + concentrado lipídico a una concentración final de 1X de GIBCO + peptona de trigo E1 2,5 g/l de Organo Technie + 0,01 µg/ml de EGF (de múltiples fuentes).

20 MediV SF105: Medio de Taub sin transferrina, +concentrado lipídico a una concentración final de 1X de GIBCO + peptona de trigo E1 2,5 g/l de Organo Technie + 0,01 g/ml de EGF + citrato de amonio férrico:tropolona o sulfato de amonio férrico:tropolona a una razón de entre 10 y 1 y entre 70 y 1.

25 Adaptación de células MDCK-S en formulaciones de medio MediV SFM libres de suero: Se hizo crecer un vial congelado de células MDCK de la ATCC en medio DMEM con FBS al 10% con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM durante 5 pases (tal como se describió anteriormente) antes de pasarlo a formulación de medio MediV SF (MediV SF 101, MediV SF 102 o MediV SF 103). Se recuperaron las células MDCK en suero crecidas en un matraz T-75 mediante tripsinización. Se eliminó el medio de crecimiento consumido y se lavó la monocapa de células dos veces con DPBS (libre de calcio y magnesio) y luego se desechó la DPBS. Se añadió la cantidad apropiada de tripsina-EDTA precalentado (3 ml/T-75) y se incubó el matraz en T en un incubador de CO₂ al 5%, a 30 37°C durante aproximadamente 15 min. Se dieron golpecitos a los matraces contra la palma de la mano varias veces hasta separar completamente las células. Se añadió un volumen igual de inhibidor de tripsina extraído de haba de lima para neutralizar la tripsina y se tomaron dos muestras para determinar la concentración de células en la suspensión celular. Entonces se diluyeron 1,75x10⁶ células en 35 ml de la formulación de medio MediV SF deseada en un matraz T75 nuevo. Se colocó el matraz en un incubador de cultivo celular mantenido a CO₂ al 5%, 35 ± 1°C. Las células o bien se subcultivaron 3 días tras la siembra o bien se realizó un cambio de medio completo en el día 3 seguido por subcultivo en el día 4 tras la siembra. Las células pueden adaptarse a MediV SF104 y MediV SF105 usando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

40 Subcultivo de células MDCK adaptadas al medio MediV SFM: Se eliminó el medio de crecimiento consumido y se lavó la monocapa de células dos veces con DPBS (libre de calcio y magnesio). Se añadió la cantidad apropiada de tripsina-EDTA precalentado (3 ml/T-75, 7,5 ml/T-225) y se incubó el matraz en T en un incubador de CO₂ al 5%, a 37°C, durante aproximadamente 15 min. Se dieron golpecitos a los matraces contra la palma de la mano varias veces hasta separar completamente las células. Entonces se inhibió la tripsina mediante la adición de volúmenes iguales de inhibidor de tripsina extraído de haba de lima (3 ml/T-75, 7,5 ml/T-225). Se homogeneizó la suspensión celular aspirando hacia arriba y hacia abajo con una pipeta de tamaño apropiado. Se tomaron dos muestras de 0,5 45 ml de suspensión celular para el recuento celular. Se repitieron los recuentos celulares si los resultados de los dos recuentos no eran uno el 15% del otro. Tras el recuento, se diluyeron las células hasta 0,05 x 10⁶ células viables/ml en la formulación de medio MediV SF precalentada preparada recientemente apropiada en matraces nuevos, para un volumen total de 35 ml/T75 o 100 ml/T-225. Entonces se incubaron los matraces en un entorno de CO₂ al 5%, 37 ± 1°C. Las células o bien se subcultivaron en nuevos matraces en T en el día 3 (tal como se describe más adelante) 50 o bien se realizó un cambio de medio completo y se subcultivó el cultivo en nuevos matraces en T en el día 4 tras la siembra. Nota: Las células MDCK-SF siempre se subcultivan en la misma formulación de medio MediV SFM en la que se adaptaron.

55 Preparación de bancos PreMCB de células MDCK adaptadas al medio MediV SFM: Se preparan bancos de células pre-maestras para las líneas celulares MDCK tal como se describió en el ejemplo 1 anteriormente, excepto que en el medio de congelación 2X es la formulación de medio MediV SF apropiada + DMSO al 15%.

Caracterización de células MDCK (MDCK-SF) adaptadas al medio MediV SFM: Se realizan las pruebas de cariología, esterilidad y micoplasmas de los preMCB de MDCK-SF según la metodología descrita en el presente

documento, por ejemplo, en el ejemplo 2, excepto en que se usa la formulación de medio MediV SFM apropiada en lugar de medio completo que contiene suero. Además, pueden examinarse las características de la curva de crecimiento de células MDCK-SF en matraces T-75 y la replicación de cepas de influenza adaptadas al frío en células MDCK-SF tal como se describe en el ejemplo 2, excepto en que se usa la formulación de medio MediV SF apropiada en lugar de medio completo que contiene suero. Además, pueden realizarse estudios de tumorigenicidad en células MDCK-SF tras varios pases adicionales (por ejemplo, preMCB +20 pases) por un contratista comercial (por ejemplo, BioReliance) tal como se describió en el ejemplo 2 anteriormente.

Resultados y discusión

Se sometió a prueba la cariólogía de las células MDCK-SF101 y MDCK-SF102 en el pase 71/9 y de MDCK-SF103 en el pase 87. En la figura 14 se muestran las distribuciones del número de cromosomas en 100 metafases de células MDCK-T, MDCK-SF101 y MDCK-SF102 y en la figura 19 de células MDCK-SF103. Puede observarse que las células MDCK-T muestran una propagación más amplia en el número de cromosomas (de 52 a 84) en comparación con las células MDCK-SF101, MDCK-SF102 o MDCK-SF103 (70-82, 60-80 y 66-80, respectivamente). La propagación en el número de cromosomas para las células MDCK-SF101, MDCK-SF102 y MDCK-SF103 es mucho más próxima a la observada para las células MDCK-S no tumorigénicas crecidas en suero (70-84), lo que indica que las formulaciones de medios MediV SF101, MediV SF102 y MediV SF103 pueden mantener mejor el número de cromosomas normal de las células MDCK crecidas en estas formulaciones.

En la figura 16 se muestra una curva de crecimiento preliminar representativa para las células MDCK-SF103 en medio MediV SF103. Las células MDCK-SF103 tenían aproximadamente una fase de latencia de un día. Las células estuvieron en la fase exponencial de crecimiento hasta aproximadamente el día 4, cuando entraron en la fase estacionaria. Durante la fase exponencial (del día 0 al día 4) utilizaron glucosa y glutamina (figuras 17 y 18) mientras que produjeron lactato y amoníaco. La tasa de consumo de glucosa/producción de lactato se correlacionó bien con la curva de crecimiento celular (véanse la figuras 16 y 17). Se logró una densidad celular máxima de $\sim 17 \times 10^6$ aproximadamente en el día 4 tras la siembra. La densidad celular no disminuyó durante la fase estacionaria y permaneció bastante constante hasta el día 7.

La tasa de consumo de glutamina y la tasa de producción de amoníaco fueron similares a los perfiles de crecimiento de las células MDCK-SF103 y de glucosa/lactato (véase la figura 18). La producción de amoníaco aumentó linealmente hasta el día 7, mientras que la concentración de glutamato no cambió de manera apreciable durante el periodo de 7 días.

Se sometieron a prueba las células MDCK-SF103 para determinar su capacidad para soportar la replicación de varias cepas de influenza reordenantes tal como se describe en el ejemplo 7 más adelante. Los resultados mostrados en la figura 20A indican que las células MDCK-SF103 podían soportar la replicación de cada cepa de influenza sometida a prueba.

Se colocaron células MDCK-SF103 en ratones desnudos para la prueba de tumorigenicidad durante 3 meses tal como se describió anteriormente. Se consideró que el artículo de prueba no era tumorigénico en el estudio de BioReliance número AB09EU. 001000.BSV en modelo de ratón desnudo adulto.

Tabla 4: Tumorigenicidad y cariólogía de células MDCK que se han hecho pasar a diferentes medios.

Células (numero de pases)	Tumorigenicidad	TP ₅₀ * estimado (ningún animal con tumores / animales totales)	Cariología Mediana del número; comentarios
MDCK-S (P61/4)	NR	NR	78; Pocas células con número anómalo de cromosomas (de 70 a 82)
MDCK-S (P81/24)	Sin neoplasias. Fibrosarcomas en el sitio de inyección	No estimable (>10 ⁷) (0/10)	78; Pocas células con número anómalo de cromosomas (de 70 a 82)
MDCK-T (P63/4)	NR	NR	78; Gran distribución de células con número de cromosomas de 52 a 82
MDCK-T (P88/29))	Neoplasias observadas	$\sim 10^7$ (6/10)	78; Gran distribución de células con número de cromosomas de 52-82
MDCK-SF101	NR	NR	78; Pocas células con número anómalo de

			cromosomas (de 70 a 82)
MDCK-SF102	NR	NR	78; Pocas células con número anómalo de cromosomas (de 60 a 80)
MDCK-SF103	Sin neoplasias. Fibrosarcomas en el sitio de inyección	No estimable ($>10^7$) (0/10)	78; Pocas células con número anómalo de cromosomas (de 66 a 80)

*TP₅₀: Número de células requerido para inducir tumores en el 50% de los animales

NR: No realizado

Ejemplo 5.

5 Infección de células epiteliales humanas en cultivo

Para evaluar las similitudes bioquímicas, biológicas y estructurales tras la replicación de vacunas producidas en MDCK y huevos en células de origen humano, se realizaron pases de las vacunas una vez en células humanas diploides relevantes, tales como células epiteliales bronquiales humanas (NHBE) normales. Este pase sirve para imitar un único acontecimiento de infección en las vías respiratorias humanas y luego permitir la comparación del virus progenie, el virus que finalmente es responsable de provocar una respuesta inmunitaria eficaz. Se evalúan estudios en que se miden las actividades de neuraminidasa y hemaglutinina de vacunas (unión y fusión) en estos materiales, así como otros estudios bioquímicos y estructurales, incluyendo microscopía electrónica, razones de partículas infecciosas con respecto a totales y equivalentes genómicos virales. En general, estas comparaciones sirven para demostrar la capacidad de comparación de la vacuna derivada de células con la vacuna producida en huevos eficaz y segura. Los métodos para someter a prueba la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos se conocen bien en la técnica y se realizan de manera rutinaria por contratistas comerciales (por ejemplo, BioReliance®, Rockville, MD). En la tabla 5 se recopila un resumen de los estudios analíticos que pueden realizarse.

Tabla 5: Estudios preclínicos para comparar vacunas producidas en células y huevos

<i>In vivo</i> (hurones)	<i>In vitro</i> *
Atenuación / Replicación Grado de replicación en las vías respiratorias superiores Cinética de replicación en las vías respiratorias superiores	Unión del virus Título de hemaglutinación Unión de diferentes ácidos siálicos
Inmunogenicidad Reactividad cruzada Cinética	Propiedades físicas Morfología mediante ME Partículas infecciosas : totales (genomas)
Infectividad Dosis requerida para la replicación detectable Dosis requerida para la respuesta de anticuerpos	Actividad de fusión pH óptimo temperatura óptima
	Secuencia genómica
	Actividad de neuraminidasa

20 Ejemplo 6:

Producción, pruebas y caracterización de un banco de células maestras

Para iniciar la generación de un banco de células maestras (MCB) a partir de uno o más de los preMCB descritos anteriormente (véanse los ejemplos 2-4) se clonan biológicamente a través de dilución limitante con el fin de garantizar que las células de producción se derivan de una única constelación genética. Entonces se seleccionan clones para determinar diversas propiedades fenotípicas, incluyendo el tiempo de duplicación y la tumorigenicidad relativa, así como la producción viral. En una prueba inicial de experimento de concepto, se obtuvieron cincuenta y cuatro clones de MDCK en medios que contenían FCS. Se realizaron pases de estos clones y cada uno se infectó con una baja multiplicidad de infección de ca A/New Caledonia/20/99. Varios días tras la infección, se eliminó el sobrenadante y se midió la cantidad de virus en el sobrenadante mediante TCID₅₀. Una minoría de los clones produjo títulos de virus relativamente altos, superiores a los producidos en las células parentales no clonadas. Se usan clones con propiedades biológicas y fisiológicas superiores para establecer un banco de células maestras (MCB).

El MCB se somete a prueba ampliamente para garantizar que no hay pruebas de agentes extraños. Por ejemplo, se realizan una o más de varias pruebas de PCR y/o específicas de anticuerpo para los agentes virales disponibles, tal como se muestran en la tabla 6, a continuación.

Tabla 6: Régimen de pruebas para un MCB

Pruebas generales	PCR* / Específicas de Ac
Esterilidad	VAA tipos 1 y 2
Micoplasmas	CMVH
Agentes extraños <i>in vitro</i> (múltiples líneas celulares)	VEB
Agentes extraños <i>in vivo</i>	VHS
PERT	Hepatitis B, C y E
Co-cultivo	VHH 6, 7 y 8
Cariología	VIH 1 y 2
Microscopía electrónica	VPH
Tumorigenicidad de células intactas (TP ₅₀)	VLTH I y II
Oncogenicidad de ADN celular	Polioma (virus BK y JC)
Oncogenicidad de lisado celular	Circovirus
Virus bovinos por 9CFR	Parvovirus canino
Virus porcinos por 9CFR	Moquillo canino
	Adenovirus
	SV40

5

Ejemplo 7:

Procedimiento y formulación del material de vacuna

10 Puede aplicarse el uso de tecnología de microportador sumamente aumentable a escala, similar a la usada para la producción de la vacuna de la polio aprobada en la actualidad a la producción de influenza en células MDCK. Perlas esféricas de dextrano apoyan el crecimiento excelente de células MDCK y en biorreactores de 2 a 10 l. Se encontró que células MDCK parentales crecidas en Mediv SF 103 pueden crecer en microportadores Cytodex 1 hasta una densidad de de 2×10^6 núcleos por ml en modo discontinuo tanto en matraces de agitación como en células MDCK que se han hecho crecer hasta $> 1 \times 10^6$ células/ml en biorreactores hasta una escala de 10 l (datos no mostrados).
 15 Series a escala piloto inicial demuestran que estas células MDCK pueden producir cepas de influenza para vacuna hasta un título alto en un procedimiento libre de suero y se encontró que los títulos son equivalentes o mayores que la productividad obtenida usando células crecidas en suero en matraces en T. Tal como se muestra en la figura 20A, las células MDCK crecidas en perlas de Cytodex en matraces de agitación de 250 produjeron altos títulos de las cepas de vacuna H1N1, H3N2 y B. Para la fabricación clínica, pueden producirse virus influenza en células MDCK a la escala de 20 l o 150 l, mientras que para la producción a escala comercial pueden utilizarse biorreactores de 2.500 l. La figura 20B explica resumidamente el procedimiento que puede usarse para la ampliación a escala de cultivos celulares a niveles de producción comerciales. En primer lugar se expande el banco de células de trabajo de manera secuencia de un matraz T-75 a matraces T-225, a matraces de agitación de 1 l, a biorreactores de 20 litros, luego de 300 litros que finalmente se expanden a un biorreactor de 2500 litros. Cuando se obtiene la densidad celular óptima, se inocula el cultivo con la cepa viral maestra. Entonces se recoge el virus a granel del sobrenadante del cultivo.
 25

El procedimiento de purificación para las vacunas contra la gripe basadas en cultivo celular tiene como modelo la purificación de vacunas contra la gripe basadas en huevos (véanse, por ejemplo, la publicación PCT WO 05/014862 y la solicitud de patente PCT PCT/USOS/035614 presentada el 4 de octubre de 2005). La purificación de los materiales de vacuna viral a partir de las células puede incluir cualquiera o todos los procedimientos siguientes
 30 homogeneización, centrifugación por clarificación, ultrafiltración, adsorción sobre sulfato de bario y elución, filtración de flujo tangencial, ultracentrifugación en gradiente de densidad, cromatografía y filtración con esterilización.

También pueden incluirse otras etapas de purificación. Por ejemplo, primero puede clarificarse medio bruto procedente de cultivos infectados mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente como para eliminar los desechos celulares y otra materia particulada grande, por ejemplo, durante entre 10 y 30 minutos. Alternativamente, se filtra el medio a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,8 µm para eliminar las células intactas y otra materia particulada grande. Opcionalmente, el sobrenadante de medio clarificado se centrifuga entonces para sedimentar los virus influenza, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Tras la resuspensión del sedimento de virus en un tampón apropiado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,0001 M) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, el virus puede concentrarse mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre sacarosa (60%-12%) o tartrato de potasio (50%-10%). Son adecuados o bien gradientes continuos o bien escalonados, por ejemplo, un gradiente de sacarosa de entre el 12% y el 60% en cuatro escalones del 12%. Los gradientes se centrifugan a una velocidad y durante un tiempo suficiente para que los virus se concentren en una banda visible para su recuperación. Alternativamente, y para la mayoría de las aplicaciones comerciales a gran escala, el virus se eluye de los gradientes de densidad usando un rotor de centrifuga zonal que funciona en modo continuo.

Una característica que puede incluirse en la purificación de los materiales de vacuna viral a partir de células es el uso de Benzonase[®], una endonucleasa no específica, inicialmente en el procedimiento. Aunque el ADN celular de MDCK no plantea un riesgo oncogénico basándose en estudios que evalúan la oncogenicidad del ADN celular, el tratamiento con Benzonase[®] eliminaría prácticamente cualquier posible o hipotético riesgo. En un procedimiento de purificación, tras el tratamiento con Benzonase[®], el material se clarifica mediante filtración de flujo directo (DFF) que también eliminará cualquier célula de mamífero intacta residual en el material a granel. El material a granel filtrado se concentra entonces mediante filtración de flujo tangencial (TFF) antes de las etapas de purificación adicionales. Los métodos de purificación incluyendo la cromatografía de afinidad, así como la cromatografía de intercambio iónico y/o hidroxipatita, que han funcionado bien para otros sistemas virales, son útiles para la producción de vacunas contra la gripe basadas en células. El material viral altamente purificado obtenido mediante el procedimiento desarrollado se utiliza entonces en la producción de material de vacuna. Por ejemplo, para su uso en una producción de vacunas atenuadas vivas (por ejemplo, FluMist[®]) el material viral puede someterse a un intercambio de tampón mediante filtración en una formulación final, seguido por una etapa de esterilización. Los tampones útiles para una formulación de este tipo pueden contener sacarosa 200 mM y un tampón fosfato o histidina de pH 7,0 – 7,2 con la adición de otros excipientes de aminoácido tales como arginina. Si es necesario para la estabilización, también pueden añadirse hidrolizados de proteínas tales como gelatina porcina. De manera ideal, el material de vacuna se formula para que sea estable durante un tiempo de almacenamiento prolongado. Un método que puede utilizarse para prolongar el tiempo de almacenamiento es el secado por pulverización, un procedimiento de secado rápido mediante el cual la alimentación líquida de la formulación alimentada se atomiza por pulverización en gotitas finas bajo una corriente de gas calentado seco. La evaporación de las gotitas finas da como resultado polvos secos compuestos por los solutos disueltos (véase por ejemplo, la publicación de patente estadounidense 2004/0042972). El secado por pulverización ofrece las ventajas de facilidad de ampliación a escala el coste de fabricación, en comparación con los procedimientos de liofilización convencionales. Alternativamente, el material de vacuna se formula para que sea estable como una formulación líquida estable en frigorífico usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos y composiciones para formular una vacuna contra la gripe atenuada estable en frigorífico en la solicitud de patente PCT PCT/US2005/035614 presentada el 4 de octubre de 2005.

Se incorporan etapas de caracterización en proceso en el esquema de purificación para monitorizar la producción. Las etapas de caracterización que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, ensayo de foco fluorescente (FFA, véase, por ejemplo, anteriormente) que usa un método de unión de anticuerpo individual y tinción fluorescente para determinar la infectividad del virus. Se usa la determinación del ADN y la proteína totales que puede realizarse usando numerosos métodos conocidos por el experto en la técnica para determinar el porcentaje de las impurezas iniciales restantes. La actividad específica de la preparación puede determinarse calculando la infectividad viral por cantidad de vacuna (por ejemplo, infectividad/mg).

Ejemplo 8:

50 Modelos animales preclínicos

El hurón es un modelo de animal robusto usado para evaluar la atenuación y la inmunogenicidad de vacunas contra la gripe atenuadas y cepas de vacunas componentes. Se compara el rendimiento de las cepas de influenza derivadas de células producidas a partir del MCB con el de las mismas cepas producidas en huevos. Las comparaciones uno contra uno de estos materiales en estudios controlados permiten un alto nivel de seguridad de la capacidad de comparación de estos productos virales.

Con el fin de evaluar la capacidad de las dos vacunas para infectar o para lograr una “toma” en el hurón, se anestesia ligeramente a los animales y se les inocular por vía intranasal con las preparaciones virales producidas o bien a partir de células o bien a partir de huevos. Se recoge material de lavado nasal en varios puntos de tiempo tras la inoculación y se evalúa la cantidad de virus mediante uno de varios métodos disponibles con el fin de evaluar la cinética y el grado de replicación viral en las vías respiratorias superiores de los animales. Se realizan experimentos con un intervalo de dosis y se incluyen múltiples cepas y diferentes mezclas trivalentes para generalizar la

5 infectividad relativa de las cepas crecidas en cultivo celular con respecto a las cepas producidas en huevos. Estos mismos estudios también se usan para evaluar la inmunogenicidad de las cepas influenza, una propiedad que está asociada de manera inherente a la capacidad del virus para iniciar la infección. Se extrae sangre de los animales y se recogen lavados nasales en diversos puntos (semanas) tras la inoculación; estas muestras se usan para evaluar los anticuerpos séricos y las respuestas de IgA nasales a la infección. Se usará la culminación de estos datos, la infectividad, los anticuerpos séricos y las respuestas de anticuerpos en la mucosa para comparar y evaluar la infectividad relativa de la vacuna producida por células con respecto a la vacuna producida por huevos. Se prevé que el resultado más probable es que las cepas de vacuna producidas por células y huevos tengan infectividad e inmunogenicidad similares. Si la vacuna derivada de células parece ser más infectiva o más inmunogénica que el producto derivado de huevos, se realizarán estudios adicionales que evalúen la posibilidad de una dosificación inferior.

15 Se realizan varios estudios de inmunogenicidad y replicación en el modelo de hurón para evaluar las vacunas derivadas de cultivo celular con una única dosis humana unitaria. La infección con cepas *ca/ts/att* generalmente provoca respuestas de anticuerpos fuertes y rápidas en hurones. Además, se someten a prueba de manera rutinaria cepas *ca/ts/att* individuales y se muestra que expresan el fenotipo atenuado (*att*) mediante la replicación a títulos relativamente altos en la nasofaringe pero a niveles indetectables en el pulmón de estos animales. También se evalúa el efecto del crecimiento en cultivo celular en estas características biológicas. Sin embargo, es poco probable que se observe alguna diferencia, puesto que el fenotipo *att* es una parte integral de la composición genética de estas cepas. Se evalúa la cinética de crecimiento y la reactividad cruzada de estas cepas tras la administración de una única dosis humana en estos animales. Vacunas atenuadas vivas generadas a partir de material derivado de huevos provoca anticuerpos séricos y reaccionan de manera cruzada con múltiples cepas dentro de un linaje genético; y se espera que una vacuna derivada de células tenga la misma capacidad.

25 Esta evaluaciones de comparación proporcionarían un entendimiento significativo sobre las posibles diferencias bioquímicas y/o biofísicas en el producto vírico primario y demuestran el efecto de estas diferencias epigenéticas sobre el rendimiento de las cepas *ca/ts/att* medido en primer lugar realizando pases del virus en estudios con animales o células humanas. Basándose en la información de secuencias hasta la fecha, no se espera ningún efecto sobre el rendimiento inmunogénico de las cepas *ca/ts/att* que resulta de la producción en células MDCK.

30 Los hurones constituyen un modelo de animal bien documentado para la gripe y se usan de manera rutinaria para evaluar el fenotipo de atenuación y la inmunogenicidad de cepas *ca/ts/att*. En general, se usan animales de 8-10 semanas de edad para evaluar la atenuación; normalmente, los diseños de estudio evalúan n=3-5 animales por grupo de prueba o control. Los estudios de inmunogenicidad se evalúan en animales desde las 8 semanas hasta los 6 meses de edad y generalmente requieren n=3-5 animales por grupo de artículo de prueba o control. Estos números proporcionan suficiente información para obtener comparaciones válidas estadísticamente o importantes desde el punto de vista observacional entre los grupos. Durante la mayoría de los estudios, pueden observarse signos similares a los de la gripe, pero esto no es probable. Los hurones no presentan signos de disminución de apetito o peso, secreción nasal u ocular; la observación de signos de enfermedad de tipo gripe es una parte necesaria del estudio y no están justificadas intervenciones tales como la administración de analgésicos. Otros signos de malestar, tal como úlceras abiertas o pérdida de peso significativa, darían como resultado la disposición apropiada del animal tras la discusión con el veterinario responsable.

40

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n de medio que comprende SF de Taub, l3pidos e hidrolizado de trigo, en la que SF de Taub es una mezcla 50:50 de DMEM y F12 de Ham complementada con hormonas, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, prostaglandina E1 25 ng/ml, hidrocortisona 50 nM, triyodotironina 5 pM, Na₂SeO₃ 10 nM, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM.
2. Formulaci3n de medio seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) MediV SF103; es decir, medio SF de Taub, concentrado de l3pidos a una concentraci3n final de 1X y peptona de trigo E1 2,5 g/l,

en la que SF de Taub es una mezcla 50:50 de DMEM y F12 de Ham complementada con hormonas, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, prostaglandina E1 25 ng/ml, hidrocortisona 50 nM, triyodotironina 5 pM, Na₂SeO₃ 10 nM, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM;
 - (b) MediV SF104; es decir, MediV SF103 con EGF 0,01 µg/ml; y
 - (c) MediV SF105; es decir, MediV SF103 sin transferrina pero con EGF 0,01 µg/ml, y citrato de amonio f3rrico:tropolona o sulfato de amonio f3rrico:tropolona a una raz3n de entre 10 a 1 y 70 a 1.
3. M3todo de mantenimiento de la naturaleza no tumorig3nica de una c3lula animal que comprende cultivar dicha c3lula animal en una formulaci3n de medio seg3n la reivindicaci3n 2.
4. Procedimiento para preparar una l3nea celular MDCK no tumorig3nica, adherente que puede cultivarse en medio libre de suero y que puede infectarse por virus influenza, que comprende las etapas:
 - a. adaptar c3lulas MDCK a crecer en un medio libre de suero seleccionado del grupo que consiste en: SF de Taub que comprende l3pidos e hidrolizado de trigo; SF de Taub que comprende l3pidos, hidrolizado de trigo y EGF; y SF de Taub que comprende l3pidos, hidrolizado de trigo, EGF, tropolona, pero que carece de transferrina,

en el que SF de Taub es una mezcla 50:50 de DMEM y F12 de Ham complementada con hormonas, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, prostaglandina E1 25 ng/ml, hidrocortisona 50 nM, triyodotironina 5 pM, Na₂SeO₃ 10 nM, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM;
 - b. mantener las condiciones de crecimiento; y
 - c. establecer un banco de c3lulas.
5. Composici3n de cultivo celular que comprende c3lulas MDCK no tumorig3nicas obtenidas mediante un procedimiento seg3n la reivindicaci3n 4 y un medio libre de suero seleccionado de
 - (a) SF de Taub que comprende l3pidos e hidrolizado de trigo;
 - (b) SF de Taub que comprende l3pidos, hidrolizado de trigo y EGF; y
 - (c) SF de Taub que comprende l3pidos, hidrolizado de trigo, EGF, tropolona, pero que carece de transferrina,

en la que SF de Taub es una mezcla 50:50 de DMEM y F12 de Ham complementada con hormonas, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, prostaglandina E1 25 ng/ml, hidrocortisona 50 nM, triyodotironina 5 pM, Na₂SeO₃ 10 nM, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM.
6. Composici3n de cultivo celular seg3n la reivindicaci3n 5, en la que dichas c3lulas MDCK no tumorig3nicas se derivan de la l3nea celular MDCK (ATCC CCL34).
7. Composici3n de cultivo celular seg3n la reivindicaci3n 5, en la que dichas c3lulas MDCK no tumorig3nicas se derivan de la l3nea celular MDCK-S (ATCC PTA-6500).
8. Composici3n de cultivo celular seg3n la reivindicaci3n 5, en la que dichas c3lulas MDCK no tumorig3nicas son MDCK-SF103 (PTA-6503).
9. Procedimiento para la producci3n de virus influenza que comprende:
 - a. infectar las c3lulas MDCK de la composici3n de cultivo celular seg3n la reivindicaci3n 5, 6 u 8;
 - b. incubar dicha composici3n de cultivo celular; y
 - c. aislar los virus influenza de dicha composici3n de cultivo celular.

10. Procedimiento para la producción de una composición inmunogénica que comprende realizar un procedimiento según la reivindicación 9 y formular polipéptidos de un virus influenza obtenido de ese modo en un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

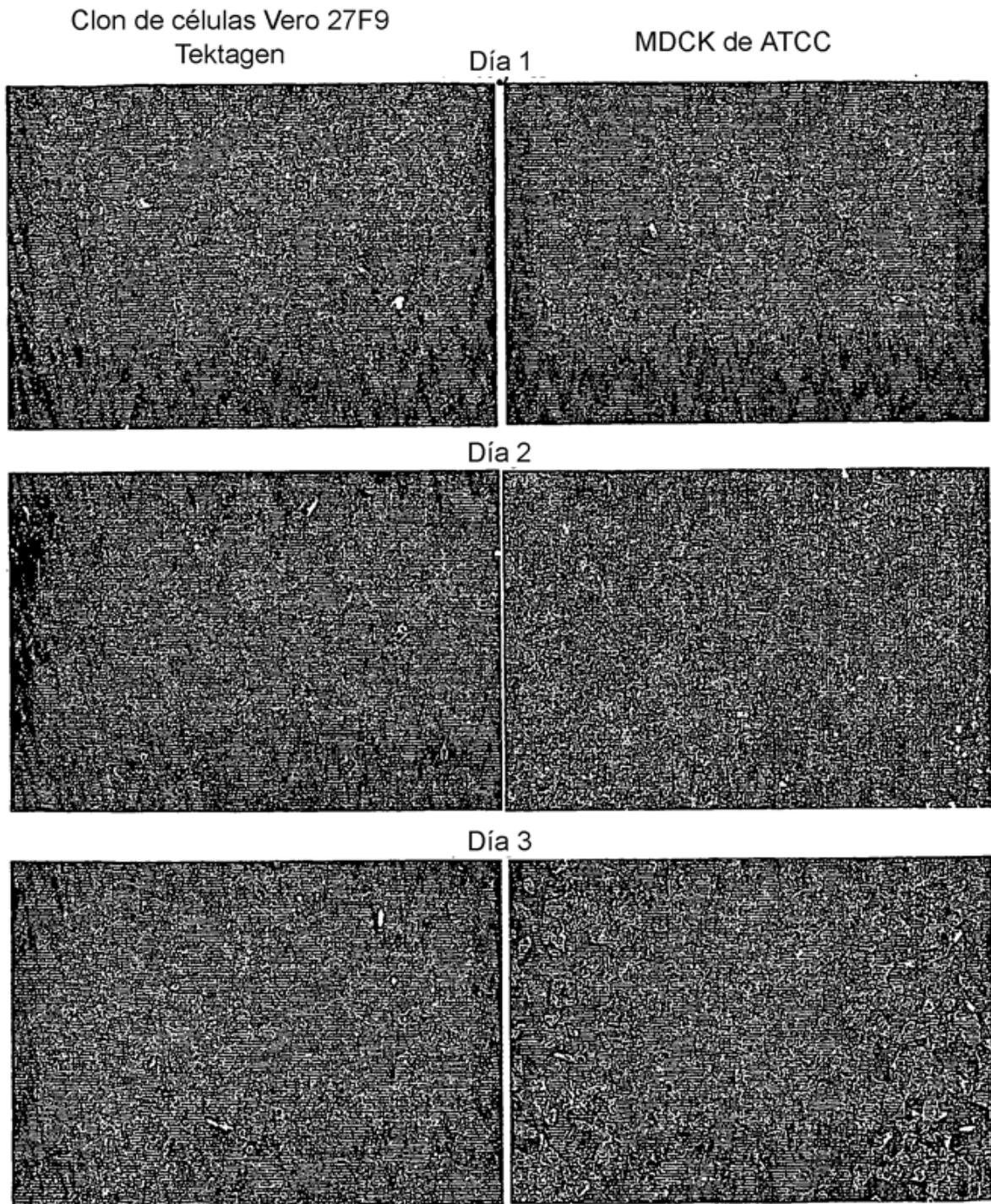


Fig. 1A

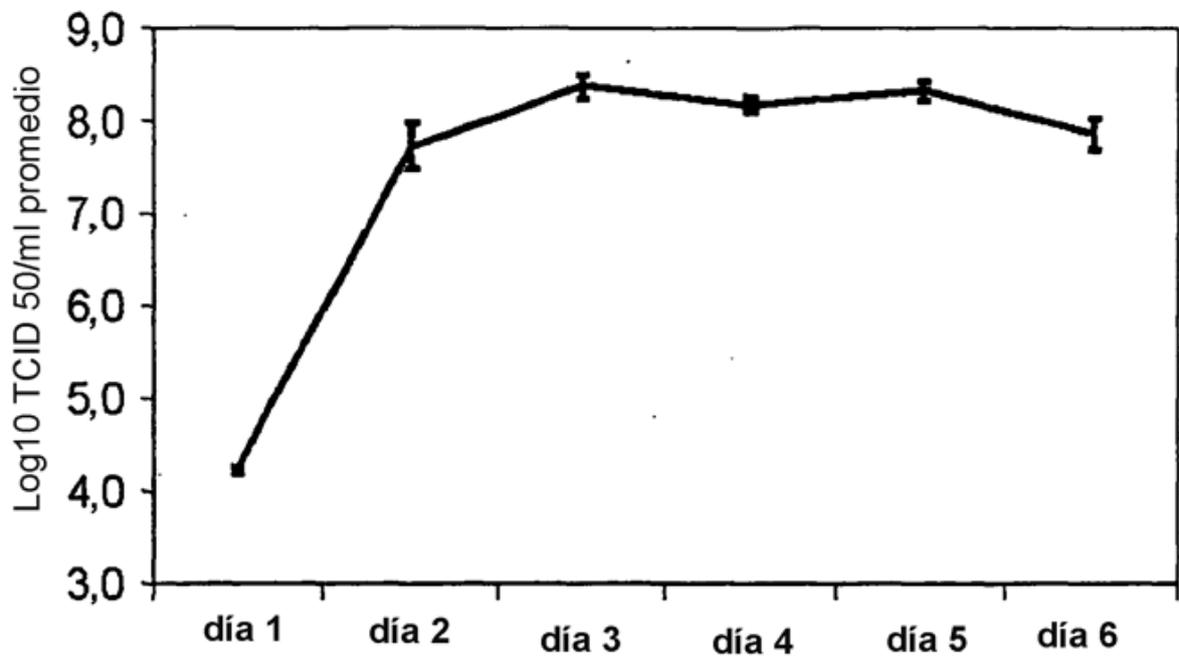


Fig. 1B

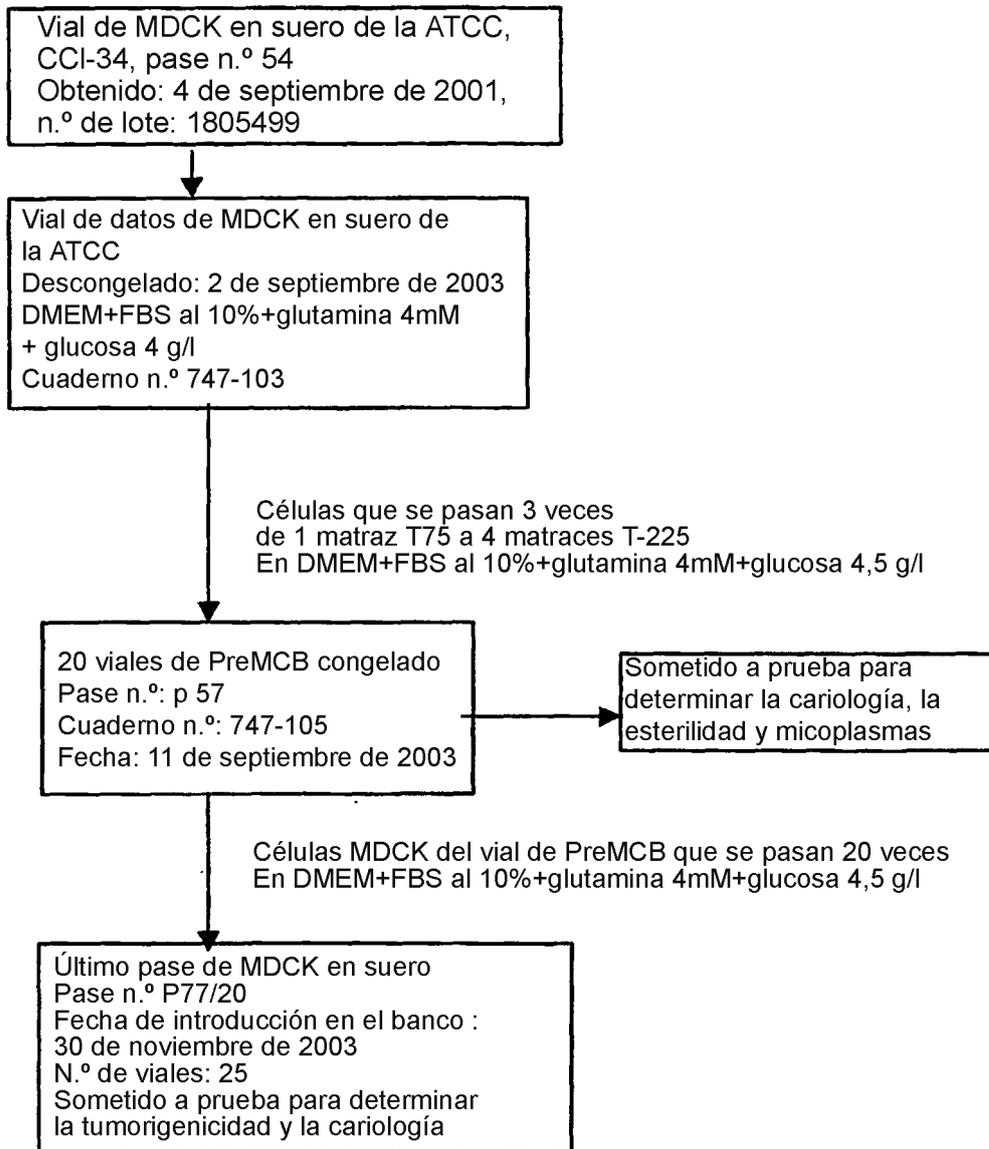


Fig. 2

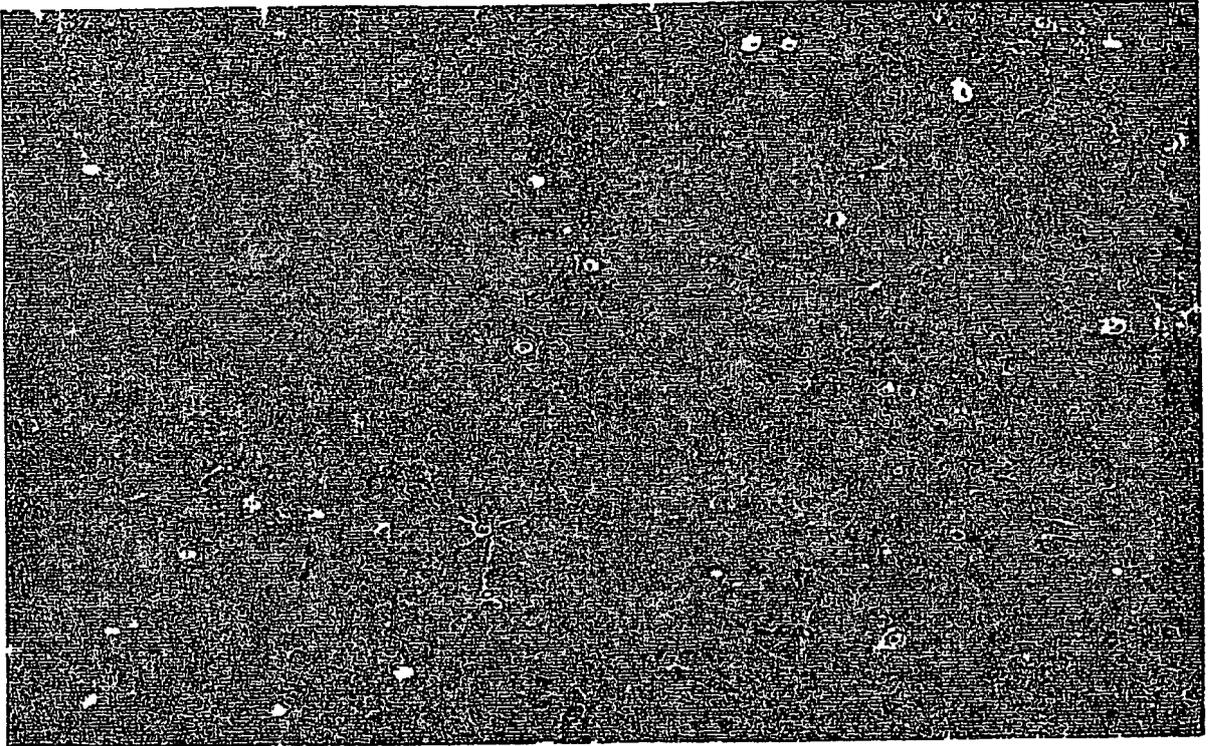


Fig. 3

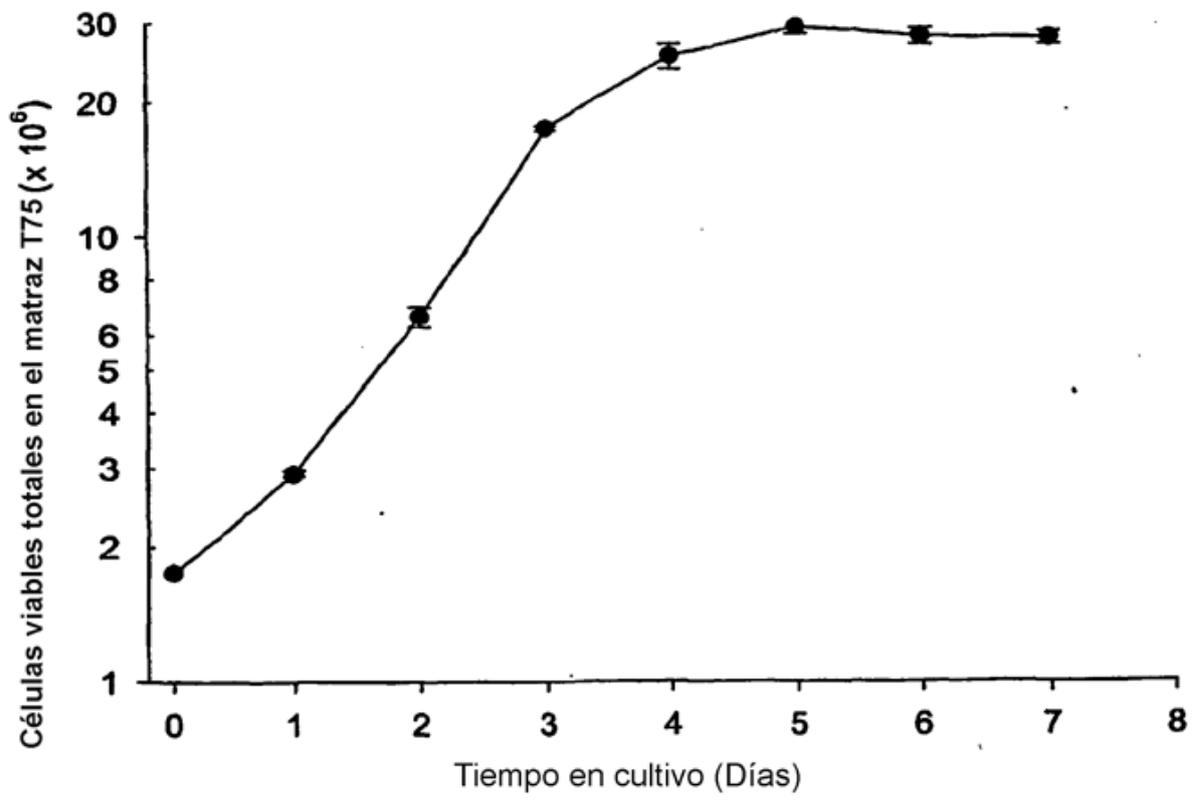
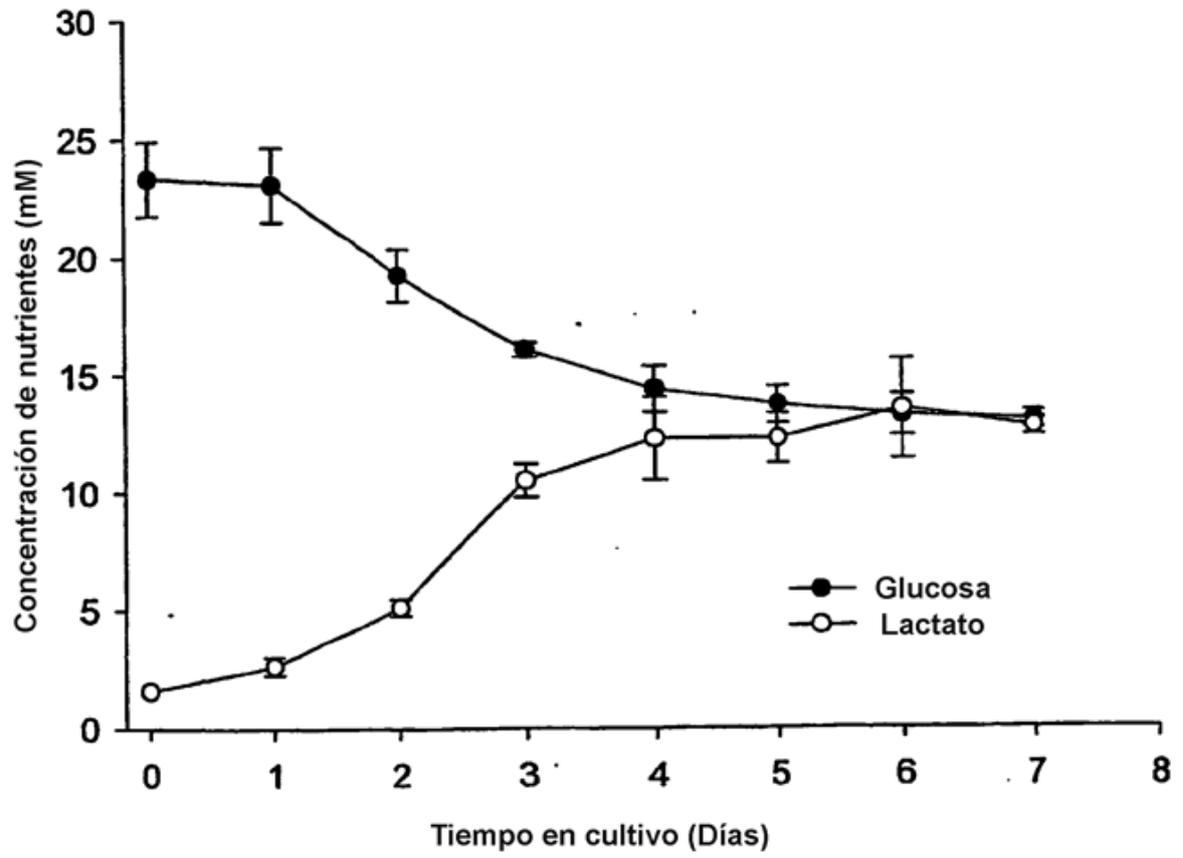


Fig. 4

**Fig. 5**

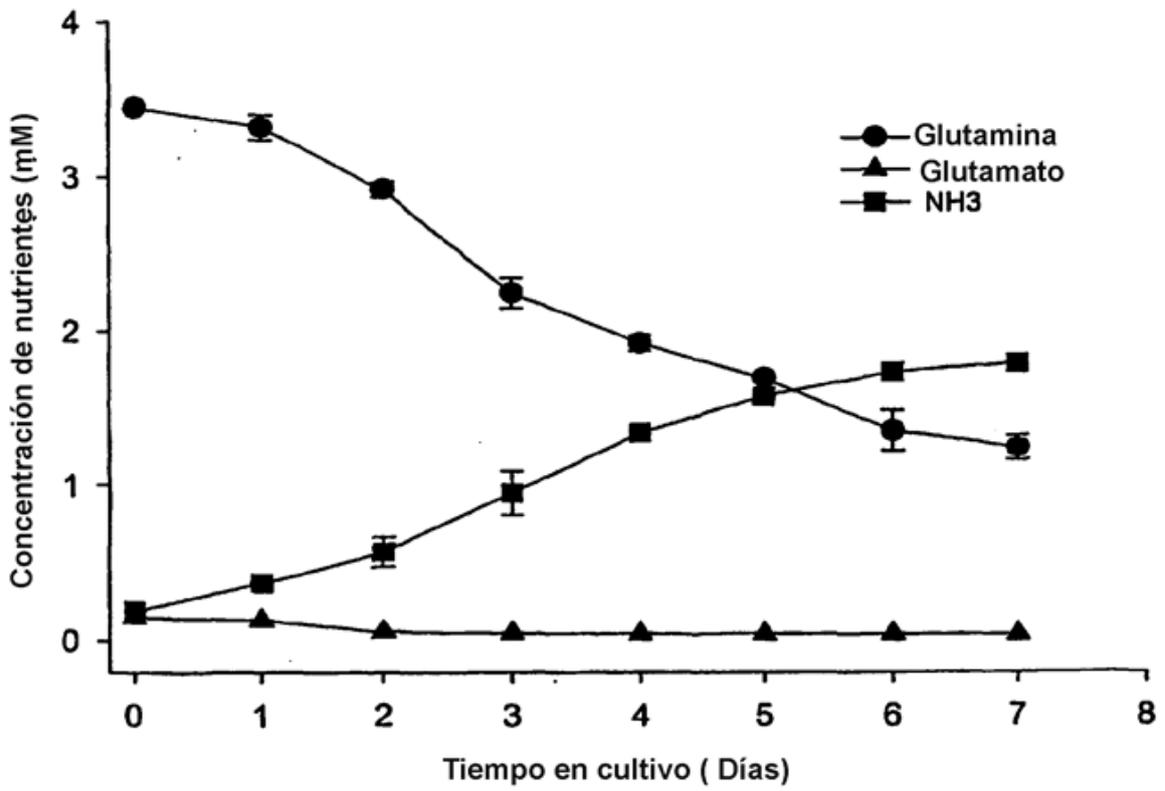


Fig. 6

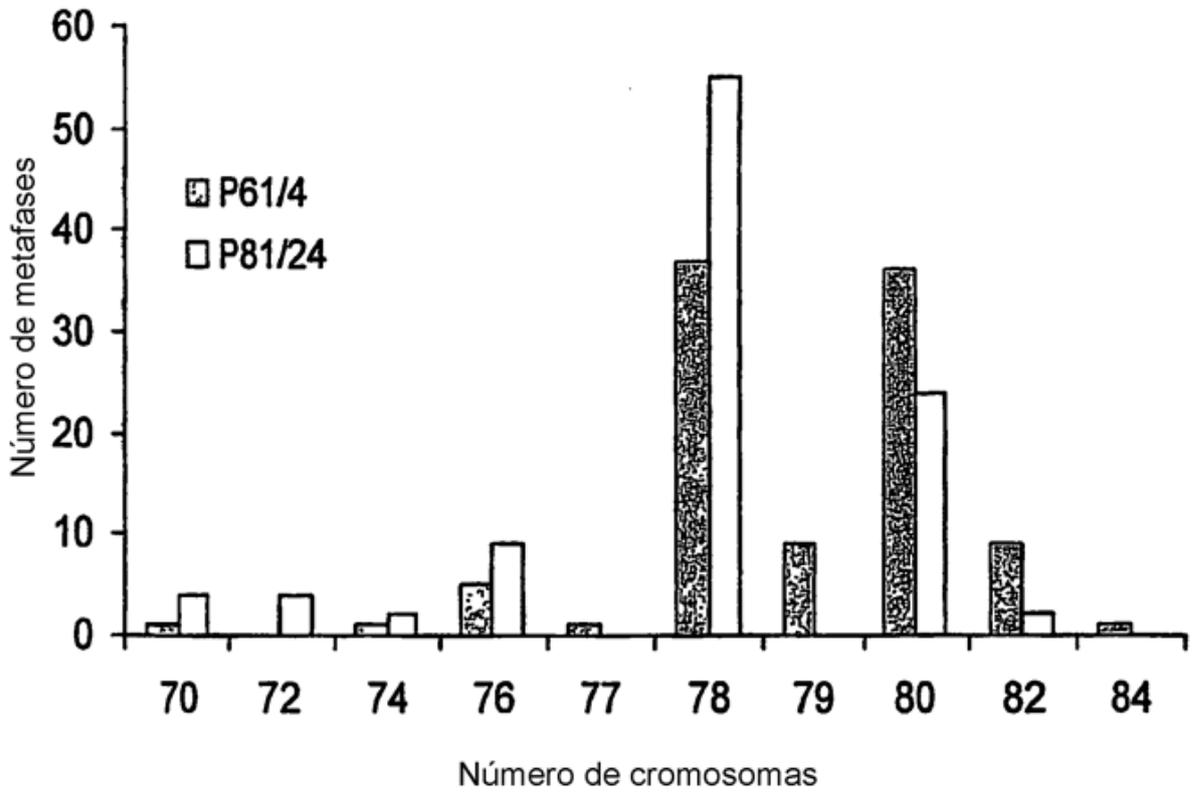


Fig. 7

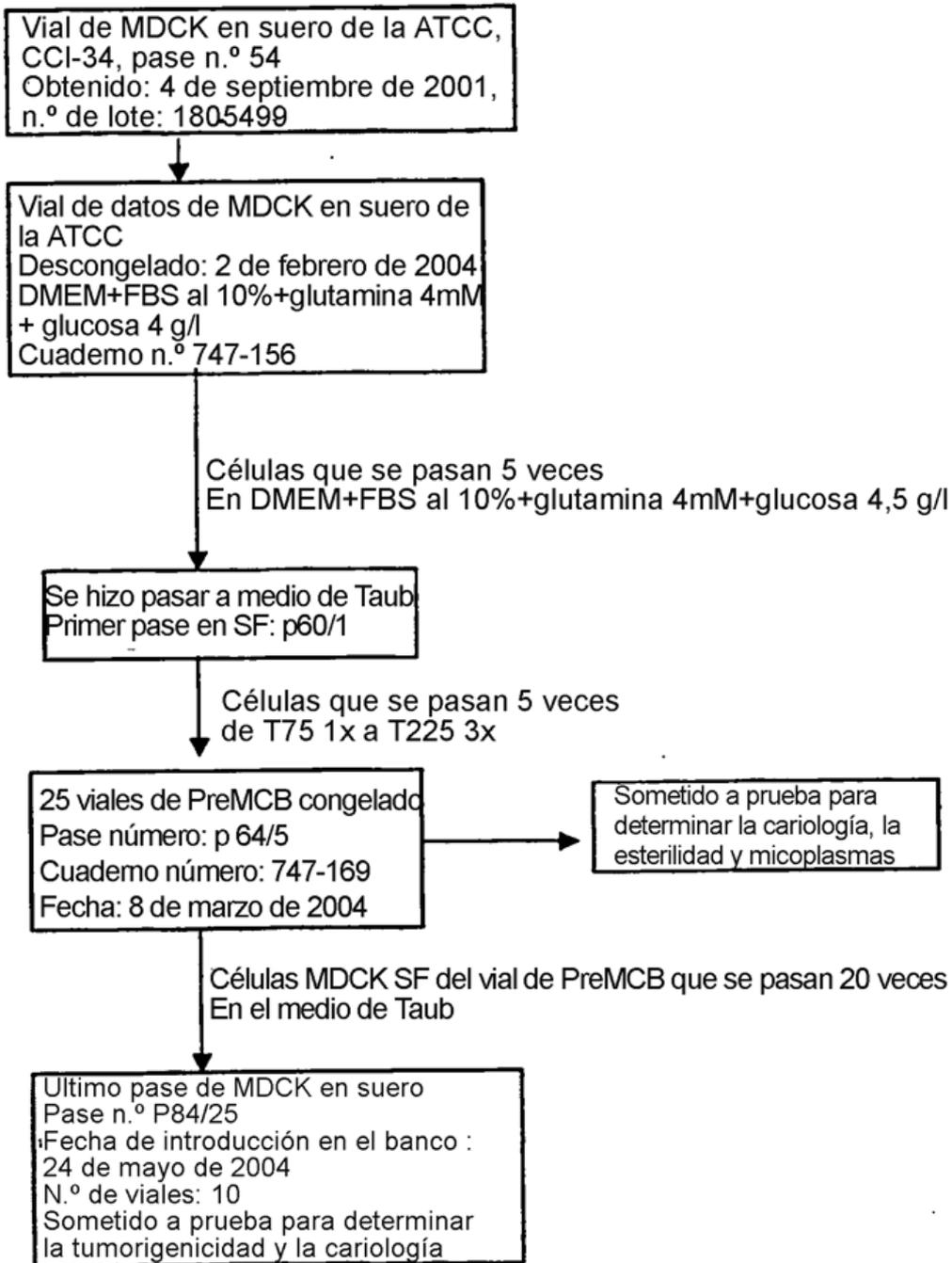


Fig. 8

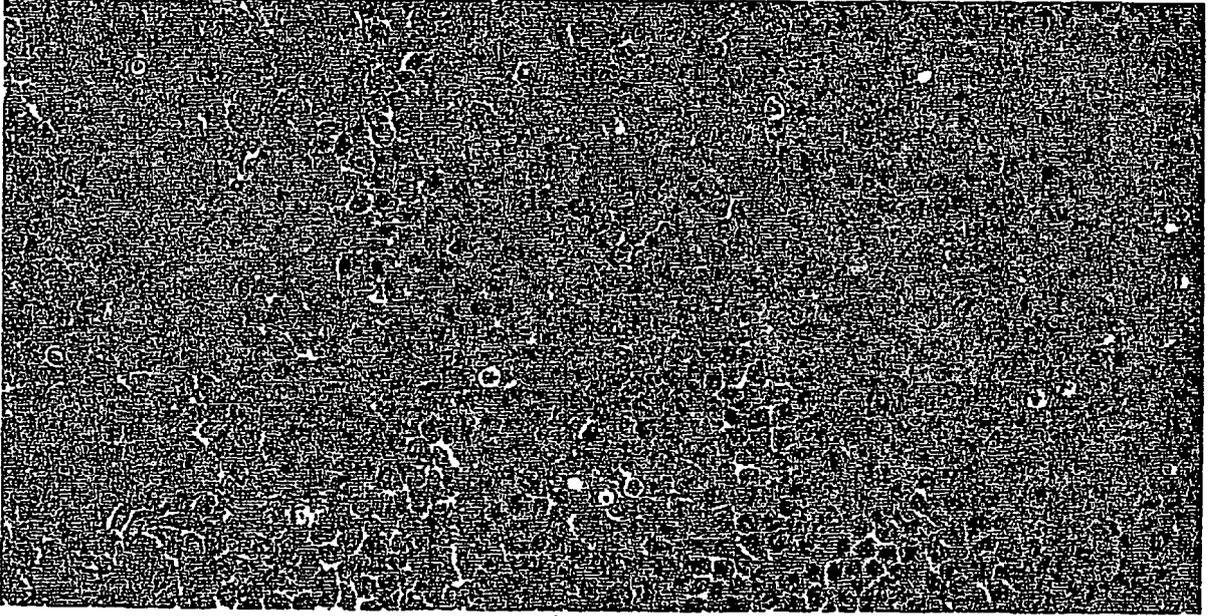


Fig. 9

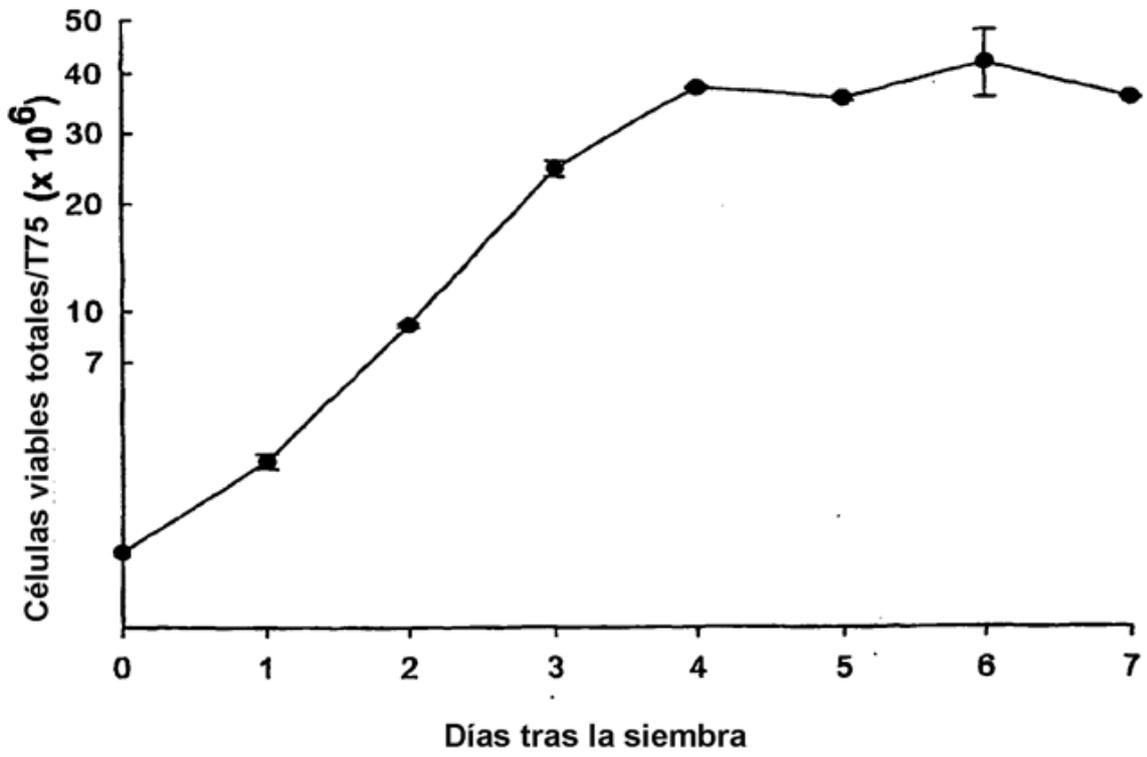


Fig. 10

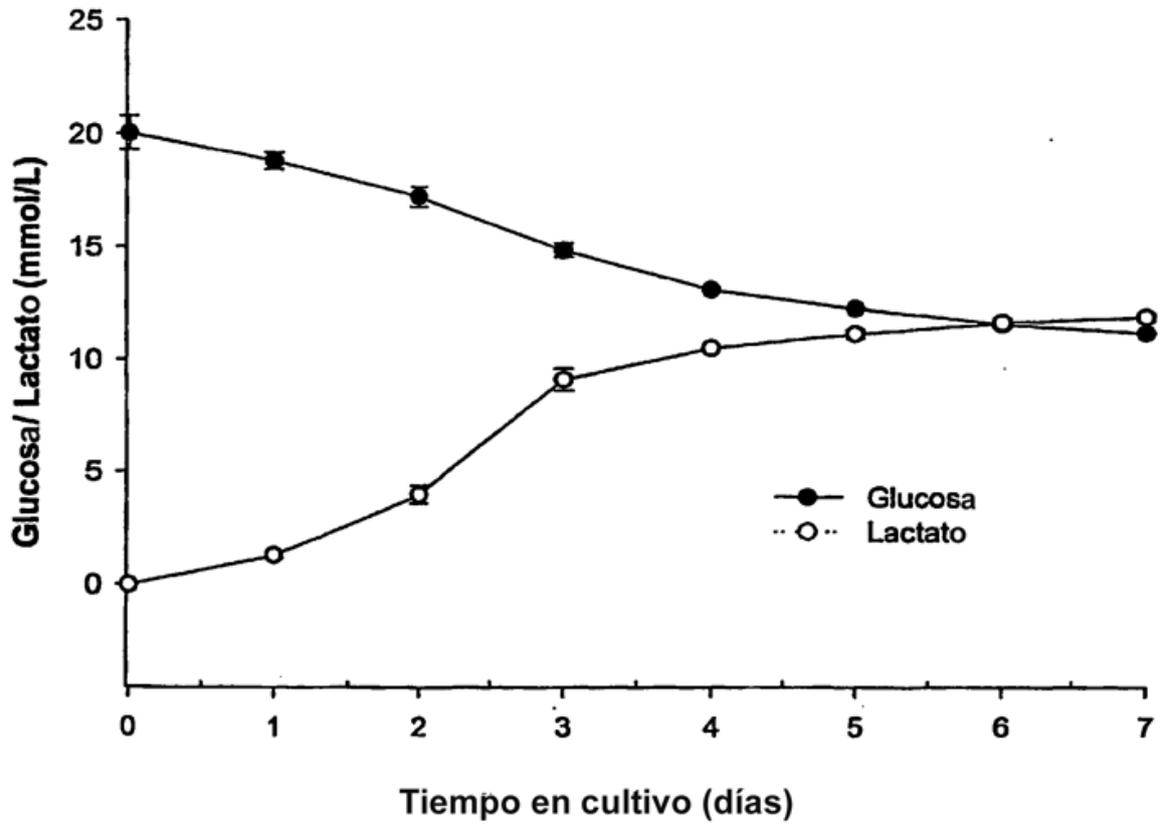
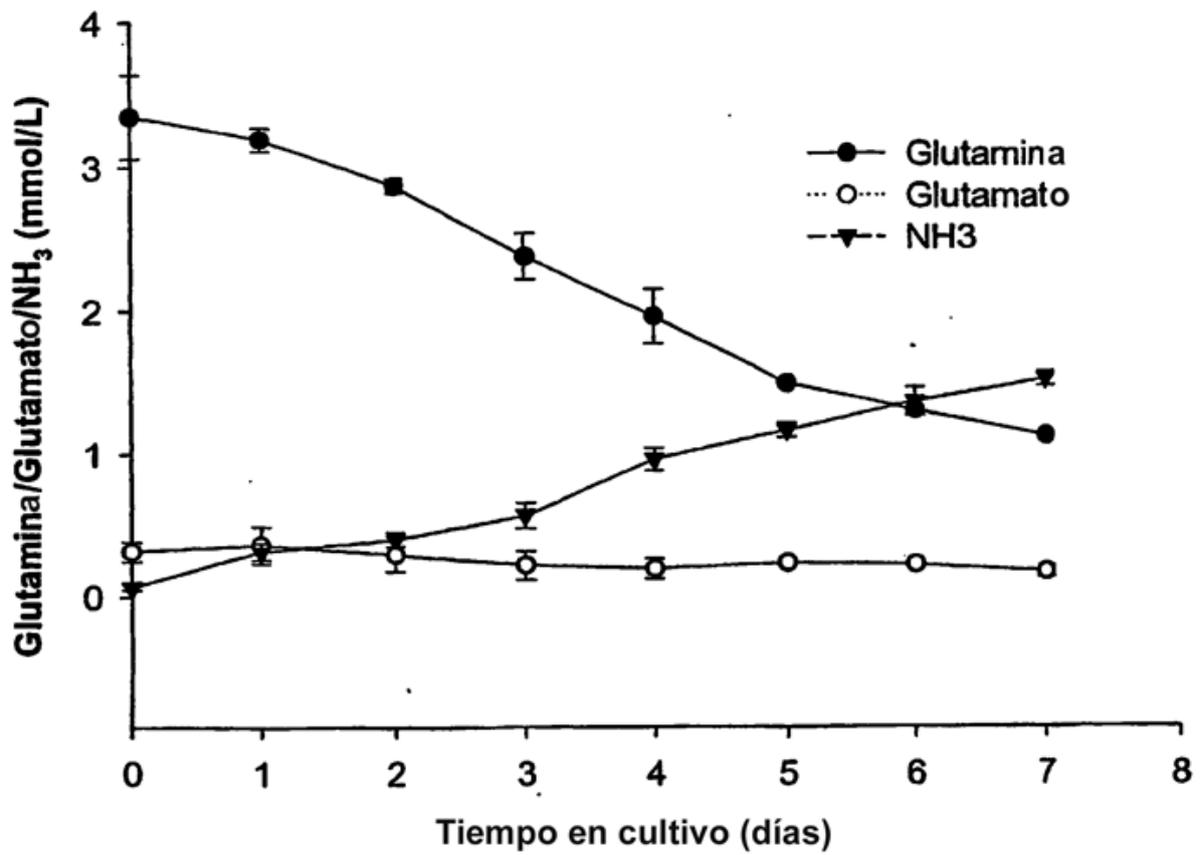


Fig. 11

**Fig. 12**

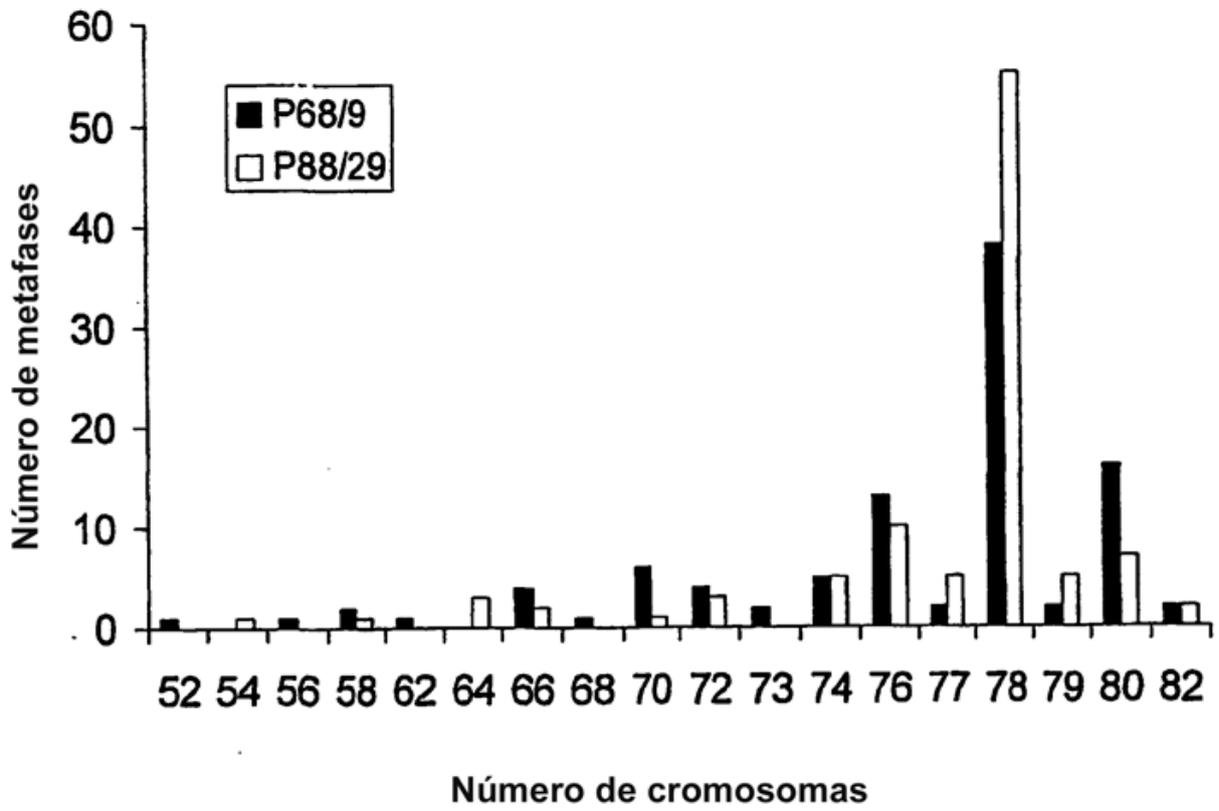


Fig. 13

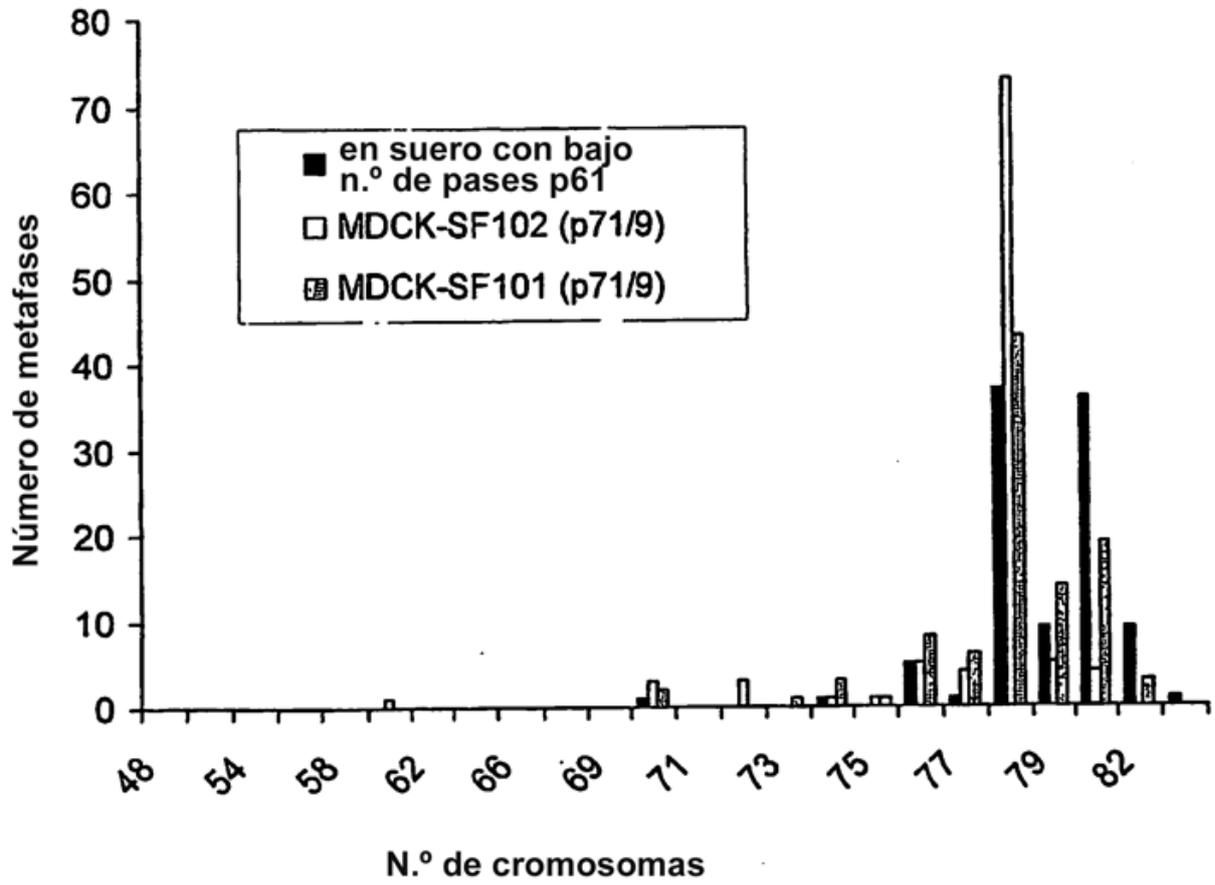


Fig. 14

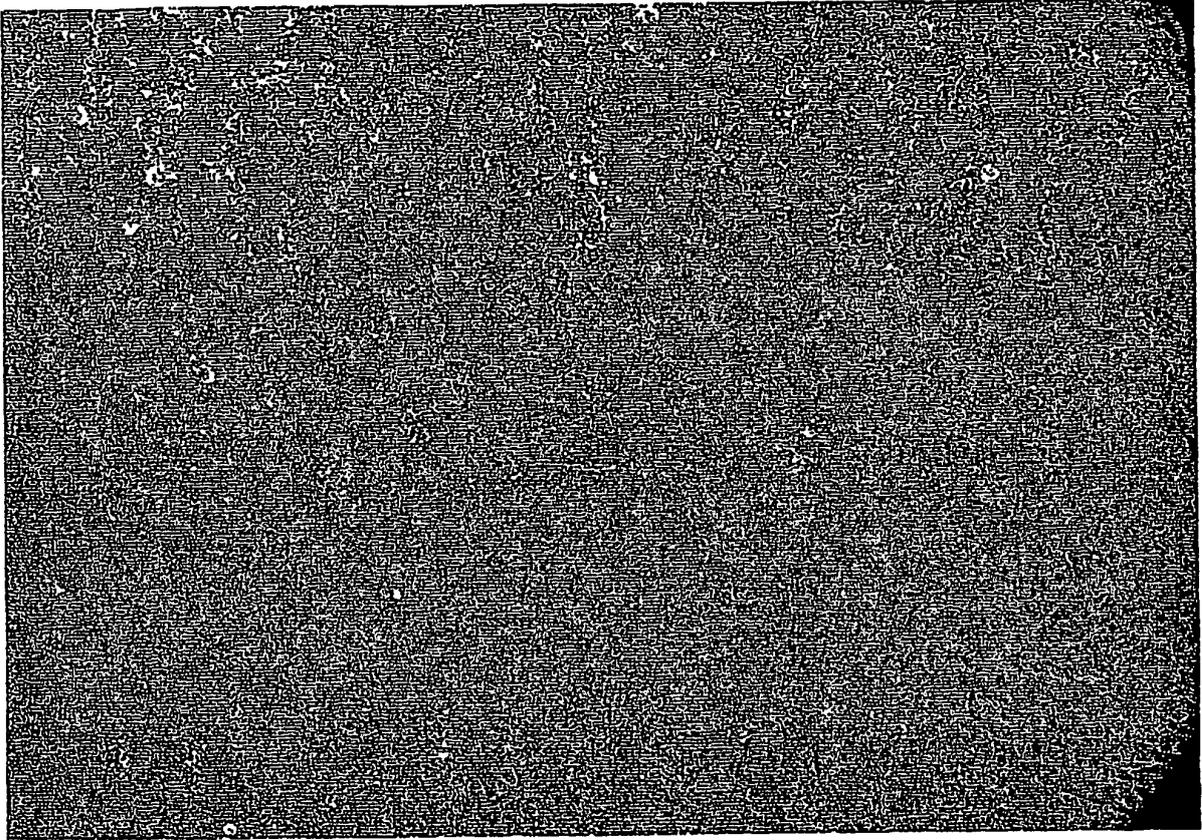


Fig. 15

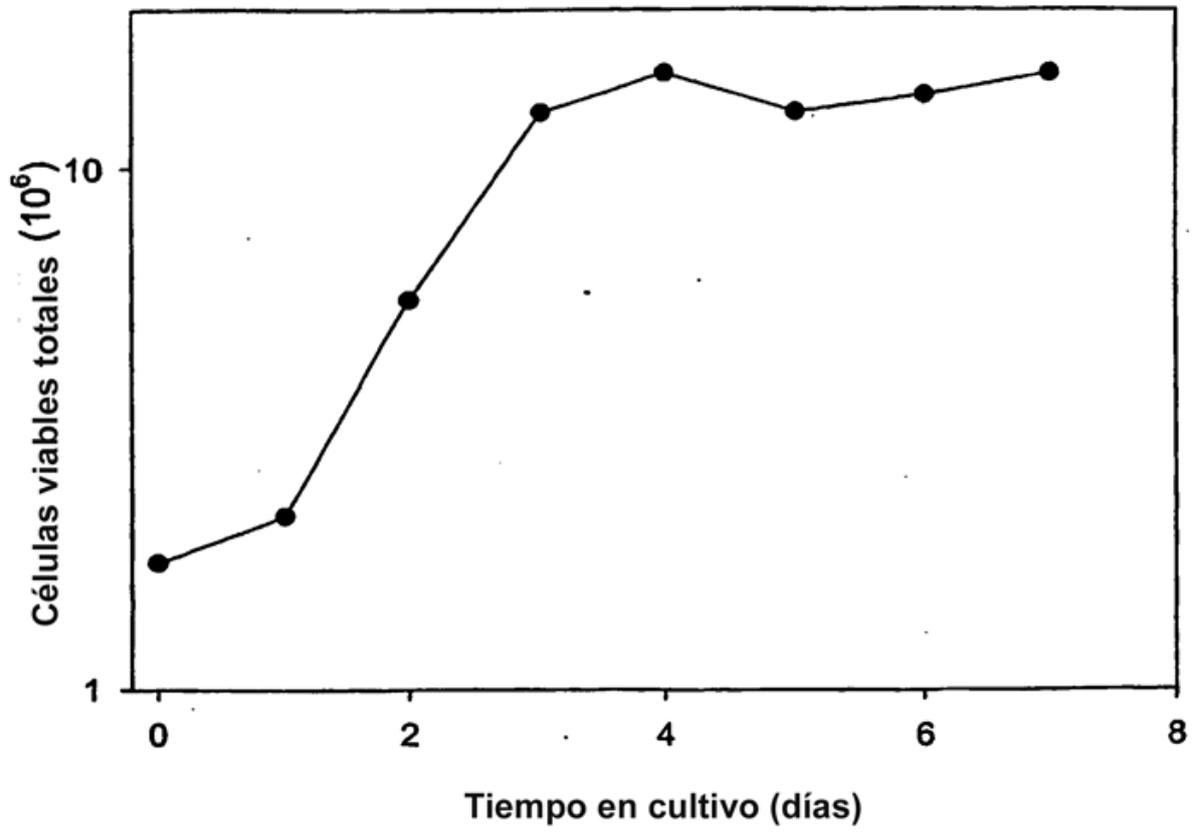
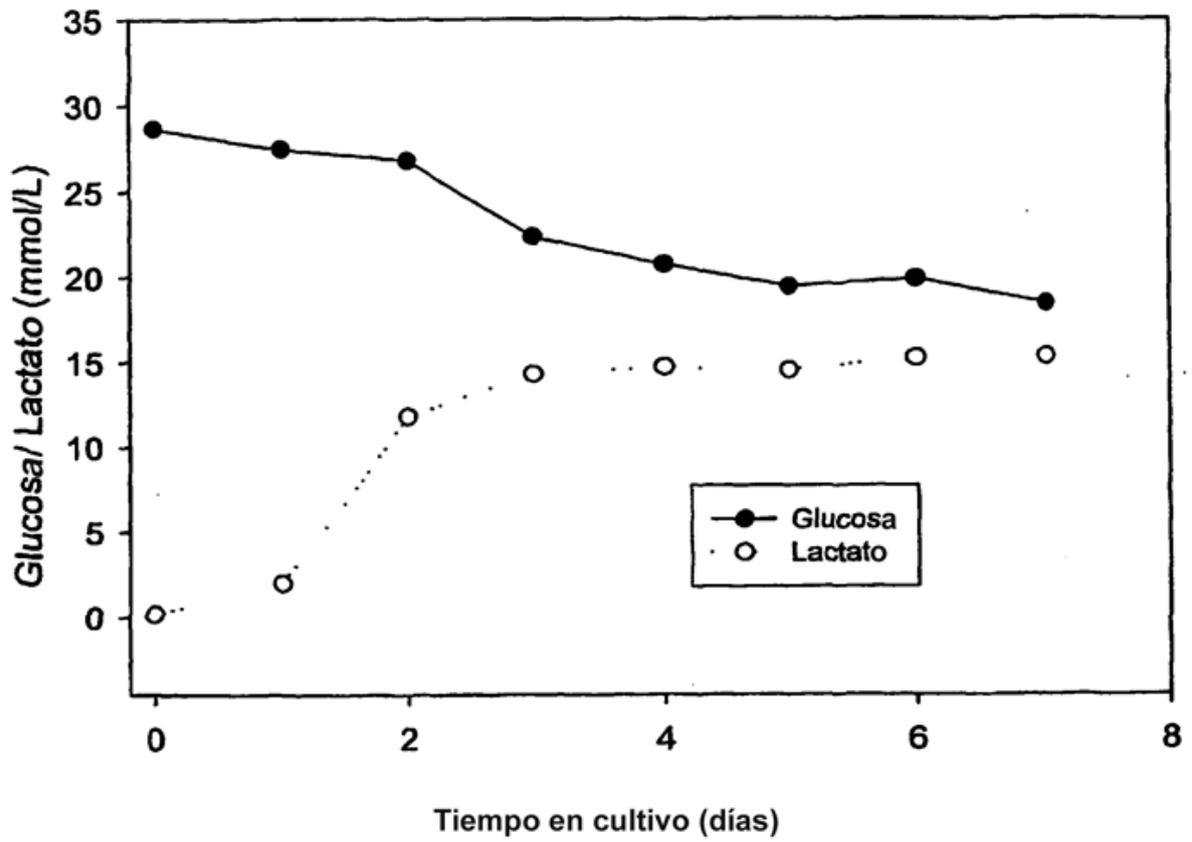


Fig. 16

**Fig. 17**

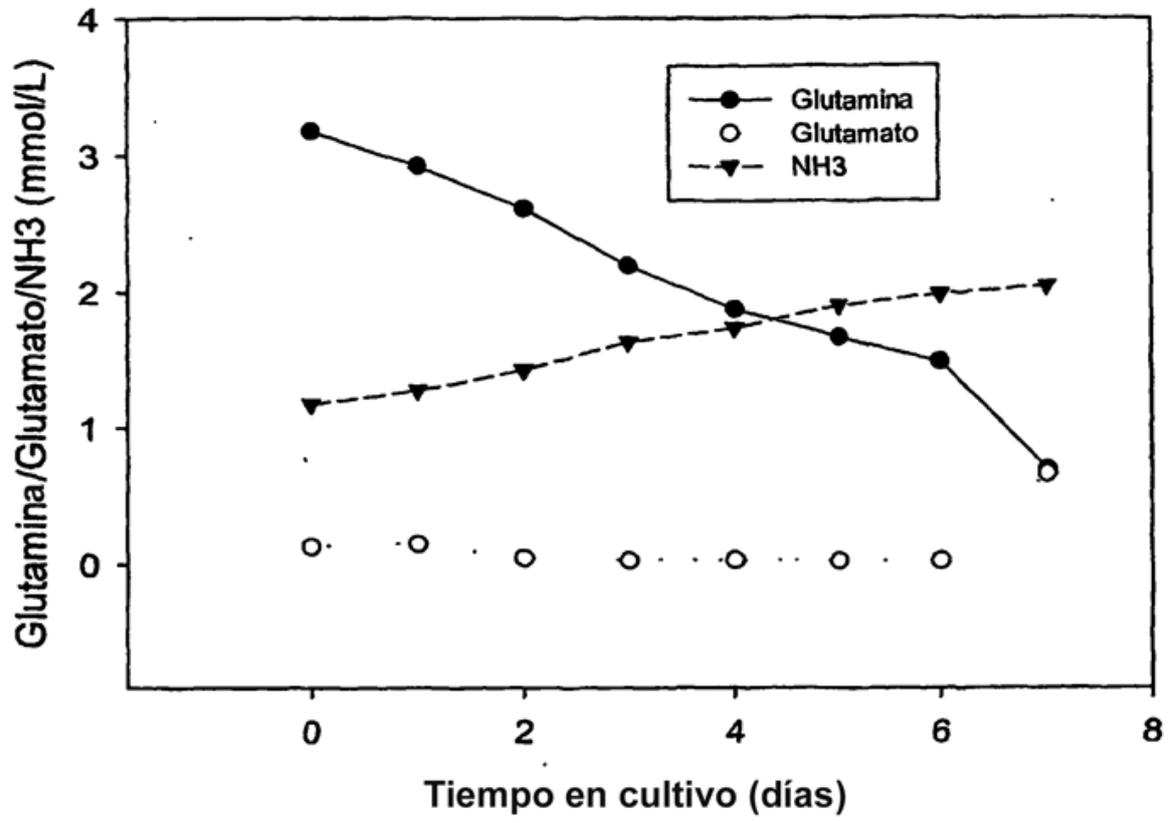


Fig. 18

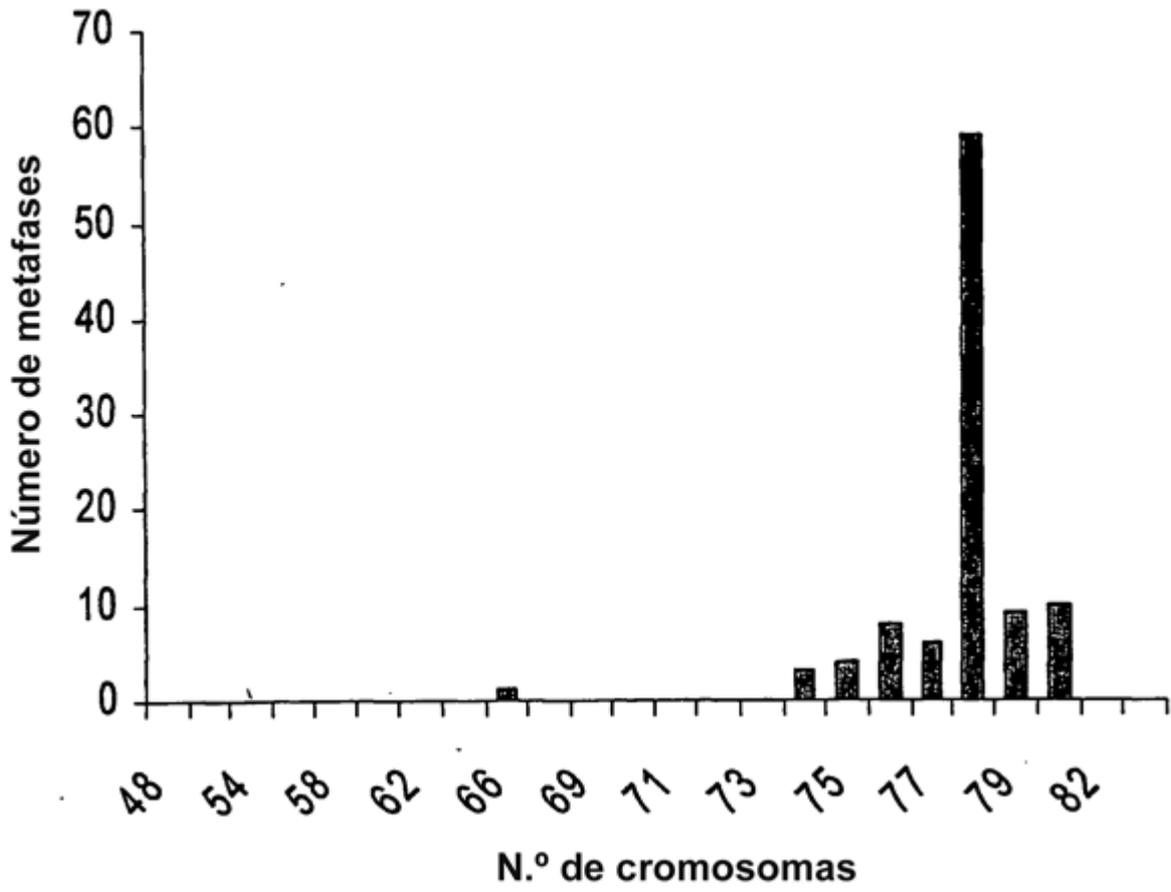


Fig. 19

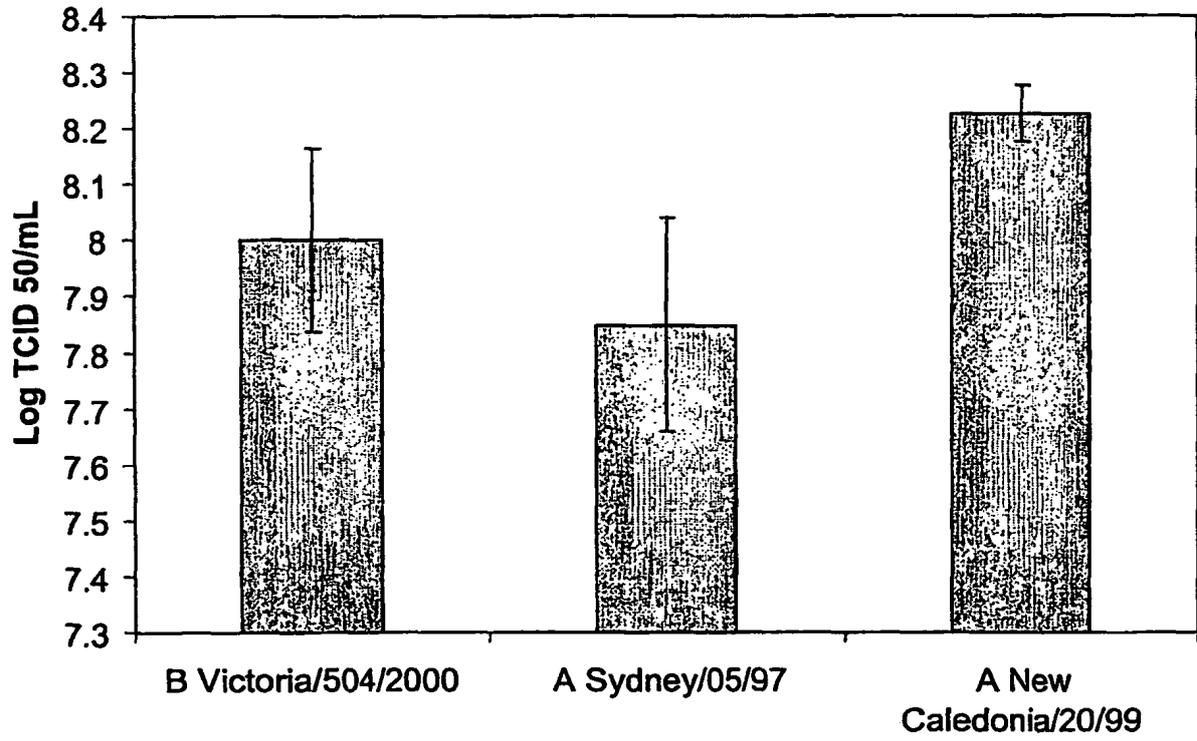


Fig. 20A

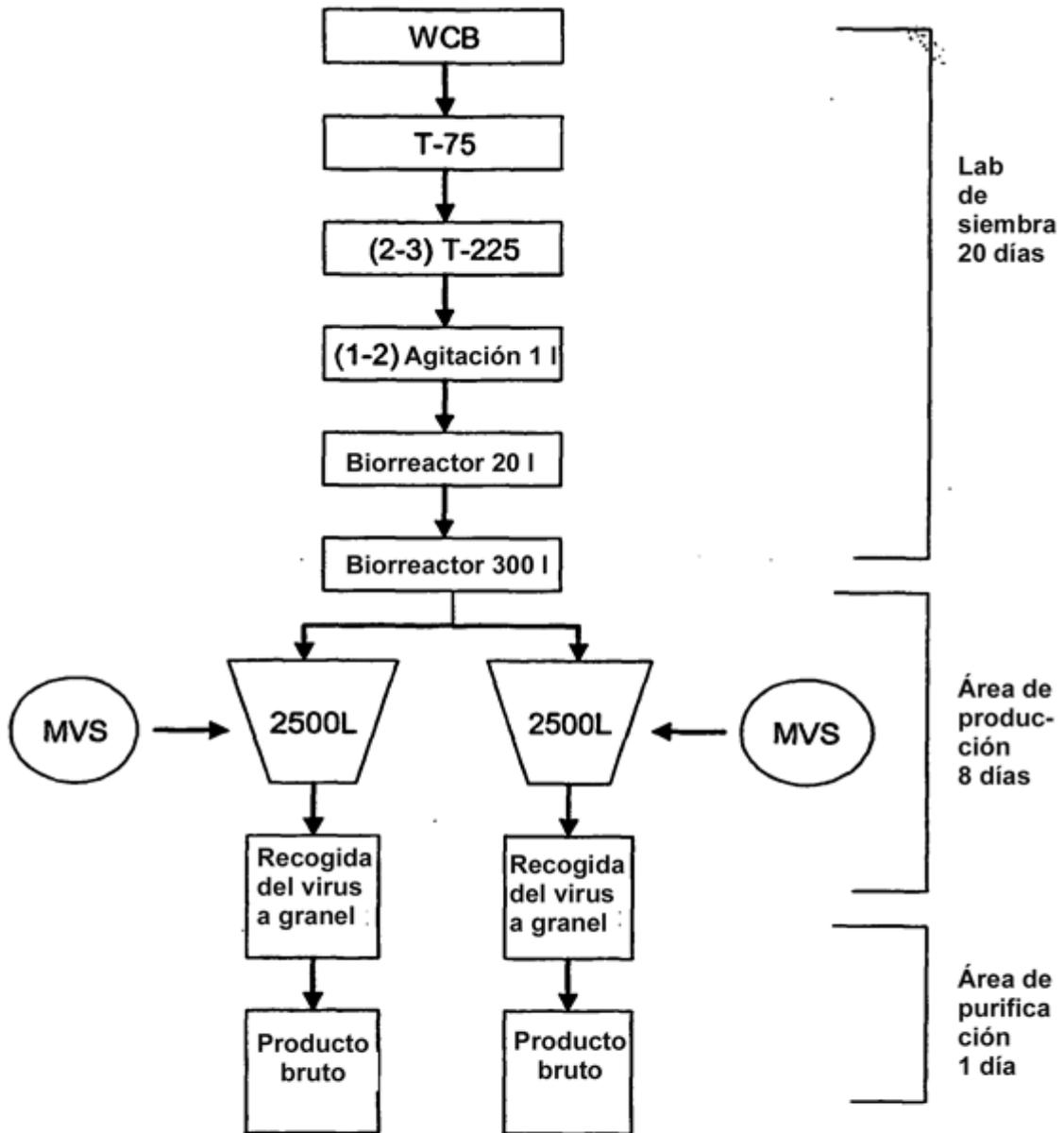


Fig. 20B