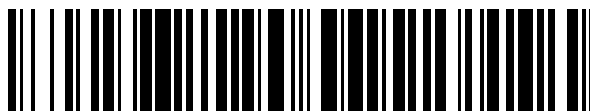


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 930**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06820022 .9**

96 Fecha de presentación: **03.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1942182**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **Línea celular vero adaptada para crecer en suspensión, procedimiento para su obtención y vacunas virales**

30 Prioridad:
04.10.2005 US 723377 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.08.2012

73 Titular/es:
ZELTEK S.A.
LISANDRO DE LA TORRE, 3124 - DPTO. 2
3000 SANTA FE, AR

72 Inventor/es:
DAELLI, Marcelo Gustavo;
FORNO, Angela Guillermina;
KRATJE, Ricardo;
ETCHEVERRIGARAY, Marina y
PAILLET, Cristian

74 Agente/Representante:
Paz Espuche, Alberto

ES 2 385 930 T3

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

DESCRIPCIÓN

LÍNEA CELULAR VERO ADAPTADA PARA CRECER EN SUSPENSIÓN, PROCEDIMIENTO PARA SU OBTENCIÓN Y VACUNAS VIRALES**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención versa acerca de una línea celular que puede ser cultivada en un cultivo libre de suero fetal bovino (FCS) y en suspensión sin un portador, y acerca de la producción de vacunas virales usando dicha línea celular. Más en particular, la presente invención se refiere al establecimiento de una línea celular que puede ser desarrollada en un cultivo libre de proteínas y en suspensión, sin la necesidad de que las células se adhieran a ningún portador, y a un procedimiento para producir vacunas virales con dicha línea celular. La presente invención se relaciona, además, con los virus obtenidos usando el procedimiento de la invención y con las vacunas formuladas con dichos virus.

Antecedentes de la invención

15 Para la producción de vacunas virales se usan huevos de gallina, cerebros de ratón, células primarias o líneas celulares establecidas para propagar el virus (Principles of Virology. Molecular Biology, pathogenesis and control, 2001). Estas técnicas convencionales tienen varios problemas:

- 1) El uso de huevos de gallina requiere la gestión de la crianza de pollos, debiendo ajustarse la gestión de los huevos fertilizados a una programación de producción de vacunas, y procedimientos laboriosos, que incluyen una exhaustiva purificación para eliminar por completo componentes derivados de las proteínas del huevo (Tree et al., 2001).
- 2) Las líneas celulares requieren, en general, la adición de suero fetal bovino como un factor de crecimiento celular. Por lo tanto, existe un riesgo asociado de contaminación con agentes de infección y priones y, además, el FCS de alta calidad es muy caro, un hecho que suma un coste considerable a la vacuna.
- 3) Entre las líneas celulares establecidas en las que pueden propagarse diversos tipos de virus, las células Vero (células epiteliales de riñón del mono verde africano) se usan de forma generalizada para la producción de vacunas de alta calidad para seres humanos y animales (Butler et al., 2000; Franzzati-Gallina et al., 2001; patente estadounidense nº 4.664.912; Montagnon, 1989; Montagnon et al., 1981). Además, las células Vero son las únicas células recomendadas para preparar virus para la producción de vacunas mediante genética inversa en el documento: "WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics". 2005.6, página 3.

30 Sin embargo, la células Vero tienen una tendencia a adherirse a las superficies. Así, el uso de células Vero para cultivos a gran escala, debido a la necesidad de reactores con una superficie muy grande o a la necesidad de introducción de portadores celulares en el cultivo, resulta sumamente costoso.

El suero fetal bovino se usa a menudo para la propagación de líneas celulares de mamíferos. Sin embargo, cuando se usan células de mamífero para la producción de proteínas recombinantes o la producción de virus, existe una presión creciente a eliminar el suero del procedimiento de fabricación. Algunas de las razones motivadoras para implementar una tecnología de cultivo celular libre de suero son el coste del suero, la variabilidad entre lotes de suero y la calidad del suero, inquietudes regulatorias relativas a los agentes biológicos en el suero y la preocupación de eliminar las proteínas del suero en el tratamiento corriente abajo. También existe una necesidad reconocida, por razones de reducción de costos y de aumento de escala del proceso, del uso de líneas celulares adaptadas al desarrollo en suspensión. Existe una necesidad urgente de desarrollar procedimientos más económicos para la producción de vacunas de calidad a bajo costo para hacerlas disponibles en el mundo entero.

Se han realizado muchos desarrollos para obtener líneas celulares Vero en suspensión para obtener un virus para la fabricación de vacunas (US 4.664.912, US 4.525.349, US 5.719.051; Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Franzzati-Gallina NM. J Biotechnol., 14 de diciembre de 2001, 92(1):67-72). Sin embargo, estos documentos describen, en general, el uso de portadores y microportadores para obtener suspensiones de líneas celulares Vero dependientes del anclaje.

En el estado de la técnica, nunca se ha documentado una línea celular Vero para obtener un virus para la fabricación de vacunas, adaptada al desarrollo en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia (portadores o microportadores), adaptada al desarrollo en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino y capaz de desarrollarse en un medio libre de proteínas. Por otra parte, hay referencia a líneas celulares Vero que pueden desarrollarse en suspensiones que forman agregados celulares ("The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media". Cytotechnology. 1992; 10(2):169-74. Litwin J.). Litwin describe un procedimiento para cultivar células Vero en suspensión como agregados celulares en medios libres de suero. Sin embargo, los agregados celulares son difíciles de infectar con virus y, por lo tanto, no son adecuados para la producción de vacunas (como puede leerse en la solicitud de patente US 2005153419-A). No hay informe alguno de células Vero que puedan desarrollarse en suspensión como células individuales sin formar agregados en cultivos de alta densidad.

Para obviar las desventajas de la técnica anterior tal como se expone en lo que antecede, la presente invención ha establecido ahora una línea celular Vero novedosa que puede ser cultivada sin FCS, sin proteína y en suspensión comprendiendo células aisladas en ausencia de agregados celulares. Esta línea celular puede ser usada en la producción a gran escala de vacunas en reactores estándar de fermentación en ausencia de materiales de soporte para su adherencia (sin la necesidad de ningún tipo de soporte celular, tal como portadores o microportadores en el medio de cultivo). Para los expertos en la técnica, las suspensiones de células individuales tienen ventajas conocidas con respecto a la suspensión de agregados; por ejemplo, mejora de la eficiencia en los sistemas de producción de virus que implican biorreactores de alta densidad. La presente invención también establece un procedimiento para producir una vacuna viral cultivando células Vero en suspensión sin FCS y luego infectando las células con el virus que va a usarse en la producción de la vacuna. La vacuna así producida es de bajo costo y tiene un perfil de alta seguridad.

Resumen de la invención

La línea celular Vero, tema de la presente invención, útil para la producción de virus para la formulación de vacunas, está adaptada al desarrollo en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un cultivo libre de suero fetal bovino. Además, esta línea celular está adaptada para desarrollarse en un cultivo libre de proteínas. Esta línea celular también está adaptada para desarrollarse en una suspensión como células aisladas, en ausencia de agregados celulares. Específicamente, esta línea celular está depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania) con el nombre sVero p66 y cuyo número asignado por la Autoridad Internacional de Depósito es DSM ACC2791.

En otra realización preferente de esta invención, se da a conocer un procedimiento para obtener un virus para la formulación de vacunas, que es constituyente de otro propósito de esta invención, comprendiendo las etapas siguientes:

- a. desarrollar una línea celular Vero adaptada para desarrollarse en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y, preferentemente, en ausencia de proteínas hasta una concentración de 11×10^5 a 30×10^6 células por ml de medio de cultivo;
- b. infectar la línea celular de la etapa "a" con dicho virus con una multiplicidad óptima de infección (M.O.I.) de 0,001 a 10; y
- c. recoger el virus producido durante la infección, preferentemente por centrifugación.

En realizaciones preferentes de esta invención, dicho virus se selecciona del grupo que comprende el virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 y el VIH-2; el virus de la poliomielitis; el virus de la hepatitis A, el virus de Coxsackie humano; el rinovirus; el ecovirus; el virus de la encefalitis equina; el virus de la rubéola, los virus del dengue, el virus de la encefalitis, el virus de la fiebre amarilla, los coronavirus, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la rabia, el virus del Ébola, los virus paragripales, el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus sincitial respiratorio, el virus de la gripe, el virus Hanta, los bunyavirus, el virus de la fiebre hemorrágica, el reovirus, el rotavirus, los parvovirus, el virus del papiloma, el poliomavirus, los adenovirus, los virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, el virus de la varicela-zóster, el citomegalovirus (CMV), el virus de la viruela, el virus vacuna, los poxvirus, el virus de la fiebre porcina africana y el agente no clasificado de la hepatitis delta y los agentes de las hepatitis no A y no B. Preferentemente, dicho virus se selecciona del grupo que comprende el virus de la poliomielitis, el virus de la rabia, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la hepatitis A y el virus de la gripe.

Descripción del dibujo

La FIG. 1 muestra el desarrollo de células Vero E6 AGS según la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La línea celular Vero, tema de la presente invención, útil para la producción de virus para la formulación de vacunas, está adaptada al desarrollo en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia (portadores o microportadores) y en un cultivo libre de suero fetal bovino. Además, esta línea celular está adaptada para desarrollarse en un cultivo libre de proteínas. Esta línea celular también está adaptada para desarrollarse en una suspensión como células aisladas, en ausencia de agregados celulares. Específicamente, dicha línea celular está depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania) con el nombre sVero p66 y cuyo número asignado por la Autoridad Internacional de Depósito es DSM ACC2791.

El procedimiento para obtener dicha línea celular Vero adaptada al desarrollo en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un cultivo libre de suero fetal bovino y libre de proteínas comprende las etapas siguientes:

- a. adaptar una línea celular Vero dependientes del anclaje, preferentemente la línea celular Vero E6 (paso 26, Banco Argentino de Células), a un cultivo con un bajo contenido de suero fetal bovino por medio de un ajuste gradual del cultivo desde una concentración elevada de suero fetal bovino del 7 al 15% hasta un cultivo de baja concentración de suero fetal bovino del 0 al 3%, preferentemente al 2%;

- 5 b. aplicar la línea celular Vero obtenida en la etapa previa "a" a un cultivo en suspensión del mismo medio de cultivo de suero fetal bovino a baja concentración del 0 al 3%, preferentemente al 2%, durante tiempo suficiente, al menos 30 días, para que dicha línea celular se adapte a desarrollarse en suspensión en ausencia de materiales de soporte para su adherencia. Eso se logra con un paso abrupto de las células de matraces de Thiele a matraces de agitación, sin ningún portador, y sustituyendo gradualmente la complementación del suero restante por medios libres de suero que contienen proteínas y factores de crecimiento. Durante la fase inicial de la adaptación del cultivo en suspensión, las células tienden a formar agregados de 2-30 células, especialmente a densidades celulares mayores de $1 \cdot 10^6$ células/ml; y
- 10 c. adaptar dicha línea celular obtenida en la etapa "b" para que se desarrolle en un medio libre de suero fetal bovino y libre de proteínas. Después de varios pasos y de sustituir el medio de la etapa "b" por medios libre de proteínas, no se observa ninguna acumulación celular y se considera que la línea celular Vero E6 está adaptada para el desarrollo en un cultivo en suspensión en medios libres de proteínas y ese clon celular se denomina "Vero E6 AGS".

15 Se ha demostrado que las células Vero E6 AGS mantienen un tiempo medio de duplicación de 24 horas en un cultivo de crecimiento continuo a lo largo de un periodo de al menos un mes y que han conservado la susceptibilidad a ser infectadas por varios virus.

Además, no hubo diferencia alguna en la respuesta celular (medida por la viabilidad y el tiempo de duplicación) al desarrollo en medios con baja concentración de proteínas y de factores del crecimiento y en el desarrollo en medios libres de proteínas (medios libres de proteínas).

20 La línea celular Vero E6 AGS ha sido depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania) con el nombre sVero p66 y cuyo número, asignado por la Autoridad Internacional de Depósito, es DSM ACC2791.

Cultivo e infección en suspensión

25 Las células se mantienen en suspensión en cultivos de 30 a 1.000 ml matraces de agitación de vidrio de 50 a 1.500 ml (Techne, Reino Unido) agitados a 50-80 rpm en una incubadora de CO₂ al 5% a 33-37°C.

Durante el mantenimiento celular, los cultivos son mantenidos en fase exponencial diluyendo las células aproximadamente cada dos días para mantener densidades celulares entre $1 \cdot 10^5$ células/ml y $12 \cdot 10^5$ células/ml. Para los experimentos de infección, las células de crecimiento exponencial son centrifugadas y resuspendidas en nuevos medios de cultivo con una densidad celular de $1 \cdot 10^6$ células/ml.

30 La infección se inicia añadiendo virus concentrados a los cultivos con una multiplicidad óptima de infección (M.O.I.) de 0,001 a 10. Se transfiere una parte alícuota de 500-1.500 mu.l de suspensión celular en tubos estériles en diferentes momentos después de la infección. Las diferentes partes alícuotas son almacenadas a -80°C para análisis ulteriores. Se recuperan las partículas virales del total de las muestras congeladas por medio de 3 ciclos de congelación-descongelación.

35 Según la presente invención, las células se desarrollan individualmente en suspensión y son debidamente infectadas por virus diferentes, produciendo una cosecha de partículas antigénicas virales adecuadas para la producción de vacunas.

40 Los virus que pueden producirse mediante la aplicación de la presente invención están seleccionadas del grupo que comprende el virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 y el VIH-2; el virus de la poliomieltis; el virus de la hepatitis A, el virus de Coxsackie humano; el rinovirus; el ecovirus; el virus de la encefalitis equina; el virus de la rubéola, los virus del dengue, el virus de la encefalitis, el virus de la fiebre amarilla, los coronavirus, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la rabia, el virus del Ébola, los virus paragripales, el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus sincitial respiratorio, el virus de la gripe, el virus Hanta, los bunyavirus, el virus de la fiebre hemorrágica, el reovirus, el rotavirus, los parvovirus, el virus del papiloma, el poliomavirus, los adenovirus, los virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, el virus de la varicela-zóster, el citomegalovirus (CMV), el virus de la viruela, el virus vacuna, los poxvirus, el virus de la fiebre porcina africana y el agente no clasificado de la hepatitis delta y los agentes de las hepatitis no A y no B. Preferentemente, el virus de la poliomieltis, el virus de la rabia, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la hepatitis A y el virus de la gripe.

50 Los virus que pueden ser obtenidos según la presente invención son útiles para la formulación de vacunas usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de formulación de vacunas. Dichos virus o los antígenos virales son concentrados y purificados usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como centrifugación y cromatografía. Las vacunas que pueden ser obtenidas por medio de la presente invención comprenden dichos virus o antígenos virales, al menos un diluyente y, opcionalmente, adyuvantes, excipientes y agentes quimioterapéuticos conocidos en la técnica. Si es necesario, dichos virus experimentarán un proceso de atenuación o inactivación.

55 La presente invención será descrita ahora con más detalle por medio de los siguientes ejemplos de aplicación, que muestran formas preferentes para poner en práctica esta invención. Sin embargo, dichos ejemplos son

proporcionados únicamente con fines de ilustración, para entender mejor la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

5 Más específicamente, se preparó la línea celular Vero de la presente invención usando los siguientes procedimientos:

Se usaron células Vero de la línea Vero E6 (paso 26, Banco Argentino de Células) como material de partida. Las células fueron cultivadas en un matraz de cultivo monocapa de 25 cm² que contenía medio MEM (GIBCO BRL, EE. UU.) complementado con FCS al 10%. La incubación se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Después de una expansión suficiente de las células, las células fueron cultivadas en el medio anterior, que contenía un medio libre de suero en un 20%, y subcultivadas tras confirmarse que no había ninguna anomalía en las células. Tras el subcultivo y la expansión suficiente de las células, el medio de cultivo fue sustituido con un medio que contenía un medio libre de suero en un 40% y subcultivado tras confirmarse que no había ninguna anomalía en las células. El procedimiento se repitió hasta que el contenido del medio libre de suero era del 80% (2% FCS). En este punto, las células fueron tripsinadas e inoculadas (2,5·10⁵ células/ml) en un matraz de agitación (Techne, Reino Unido) que contenía el mismo medio. La agitación se realizó a 50 rpm y la incubación se produjo a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Las células eran transferidas a un medio nuevo según la evolución del pH del cultivo. Después de 90 días del inicio del procedimiento de adaptación, las células fueron sembradas en un medio que contenía un volumen de MEM complementado con un 0,2% de FCS y medio volumen de medio libre de suero ExCell™ 302 CHO (JRH Biosciences, EE. UU.) complementado con 2 mM de glutamina. El periodo de duplicación en este medio fue de aproximadamente 24 horas, con una viabilidad del 98-100%, después de una semana de la transferencia. Las células se agrupaban en conglomerados de menos de diez células cuando la concentración celular era superior a 1,5·10⁶ células/ml. En este punto, la mitad del volumen de MEM fue sustituida con el medio SMIF-6 (GIBCO BRL, EE. UU.) libre de proteínas. Después de esto, se hizo que disminuyera la proporción del medio ExCell™ 302 CHO libre de suero y, 120 días después del inicio del procedimiento de adaptación, las células Vero (Vero E6) se desarrollaban en suspensión en el medio de SMIF-6 libre de proteínas al 100%. Estas células recibieron el nombre de "Vero E6 AGS", por tratarse de células Vero E6 adaptadas para desarrollarse en suspensión como células aisladas sin agregados celulares sin portadores.

Para su almacenamiento, las células Vero E6 AGS en periodo de desarrollo exponencial fueron centrifugadas a 1000 rpm y el granulado celular se suspendió en una solución que contenía un 45% del medio acondicionado SMIF-6, un 45% del medio SMIF-6 nuevo y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta suspensión celular fue fraccionada en criotubos (tubos criogénicos), cada uno de los cuales contenía 1 ml de la suspensión y fue congelada en etapas de: 1 hora a 4°C, 1 hora a -20°C en atmósfera de nitrógeno y, por fin, en nitrógeno líquido a -196°C.

Ejemplo 2

Susceptibilidad de las células Vero E6 AGS a la infección viral

35 La susceptibilidad de las células Vero E6 AGS a la infección viral fue estudiada usando el virus de la estomatitis vesicular (VEV, cepa Indiana: ATCC VR-1238). La titulación del virus se llevó a cabo usando células Vero E6 (paso 31). Para esto, se sembraron 4·10⁴ células en cada pocillo de una placa de titulación de 96 pocillos (GREINER, ALEMANIA). Después de 3 horas de incubación a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂, las células fueron infectadas con diferentes cantidades de una suspensión viral. Después de 24 horas, se estimó el título viral como la máxima disolución viral con capacidad de producir efecto citopático en el 100% de las células.

Para la producción de virus, se sembraron 3,2·10⁵ células Vero E6 AGS en un matraz de agitación que contenía medio SMIF-6 y fueron infectadas con 0,01 unidades citopáticas/ml de suspensión viral. La Tabla 1 muestra que después de 48 horas todas las células habían muerto por el virus. El título viral en el sobrenadante fue de 1 unidad citopática/ml. Este resultado indica que, como media, las células Vero E6 AGS son capaces de amplificar 100 veces el virus sembrado en las condiciones dadas aquí como un ejemplo.

TABLA 1

Tiempo tras la infección (horas)	% de células viables	Título viral (unidades citopáticas/ml)
0	97	0,0001
24	37	SD
48	0	0,01

Ejemplo 3

Se estudió la relación entre la densidad celular y la producción viral usando la línea celular Vero E6 AGS y el virus VEV. Para esto, se cultivaron células Vero E6 AGS en suspensión hasta una densidad de 0,75·10⁶ o 5·10⁶ células/ml y fueron infectadas con el virus VEV con una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 0,1.

Medio de cultivo: SMIF 6
 Aditivos: FCS 2%
 Condiciones de cultivo: 37°C, 5% CO₂
 Rotación del agitador centrífugo: 50 rpm
 Densidad celular al comienzo del cultivo: aproximadamente 1·10⁵ células/ml
 Virus: VEV
 MOI: 0,1

Se tomaron muestras 20 horas después de la infección y se midió la titulación viral según un procedimiento de recuento de placa.

La disolución de muestra que produce efecto citopático en el 50% de los cultivos inoculados contiene 1 dosis infectiva de cultivos tisulares al 50% (DICT₅₀). La determinación de este valor fue según el procedimiento de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938).

La Tabla 2 muestra que los títulos virales se elevaron de una forma aproximadamente proporcional a la densidad celular.

TABLA 2

Densidad celular (células/ml)	Título viral (DICT ₅₀ /ml)	Título viral/densidad celular (DICT ₅₀ /célula)
0,75·10 ⁶	4,64·10 ⁸	618
2,44·10 ⁶	3,16·10 ⁹	1295

Ejemplo 4

Se usó Vero E6 AGS para propagar el herpes simple (VHS):

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

Densidad celular en el momento de la infección: 2,0·10⁵
 MOI: 0,002
 Escala de cultivo: matraz de agitación de 100 ml
 Medio de cultivo: SMIF 6 y SMIF 6 / FCS 2%
 Rotación del agitador centrífugo: 50 rpm
 Condiciones de cultivo: 37°C, 5% CO₂
 Duración del cultivo: 2 días

La Tabla 3 muestra que se produjo el virus VHS, un virus de ADN, usando Vero E6 AGS en suspensión en ausencia de microportadores y en un medio de cultivo libre de proteínas. Se observó una suspensión de células individuales aisladas sin agregados celulares. También se observa que la titulación viral es ligeramente superior en el experimento realizado en ausencia de FCS.

TABLA 3

Medio de cultivo	Título del VHS (DICT ₅₀ /ml)
SMIF 6	5,88·10 ⁸
SMIF 6 + FCS (2%)	4,64·10 ⁸

Ejemplo 5

Se usó Vero E6 AGS para propagar el virus de la poliomielitis (VOP tipo I, cepa Sabin). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

Densidad celular en el momento de la infección: 3,0·10⁵
 MOI: 1
 Escala de cultivo: matraz de agitación de 100 ml
 Medio de cultivo: SMIF 6 y SMIF 6 / FCS 2%
 Rotación del agitador centrífugo: 50 rpm
 Condiciones de cultivo: 34°C, 5% CO₂
 Duración del cultivo: 1 día

TABLA 4

Medio de cultivo	Título del VOP (DICT ₅₀ /ml)
SMIF 6	2,5·10 ⁸
SMIF 6 + FCS (2%)	1,8·10 ⁸

Referencias

Documentos de patentes

1.	US 4.664.912	Wiktor et al.	mayo de 1987
2.	US 6.825.036	Makizumi et al.	3 de septiembre de 2002
3.	US 6.656.719	Gould et al.	21 de octubre de 1998
4.	US 6.656.720	Groner et al.	12 de julio de 2002
5.	US 6.146.873	Kistner et al.	15 de octubre de 1997
6.	US 6.008.036	Fanget et al.	22 de mayo de 1998
7.	US 5.824.536	Webster et al.	17 de junio de 1996
8.	US 5.719.051	Mundt et al.	13 de diciembre de 1994
9.	US 4.783.407	Provost et al.	30 de septiembre de 1985
10.	US 4.664.912	Wiktor et al.	1 de octubre de 1984
11.	BR 0002694	Gallina Neuza Frazatti	19 de junio de 2000
12.	US 4.525.349	Montagnon et al.	29 de diciembre de 1981
13.	US 20050019928	Rasty, Siyamak et al.	17 de agosto de 2004
14.	US 20040137013	Katinger, Hermann et al.	3 de octubre de 2003
15.	US 20010001709	Lau, Allan S.	13 de diciembre de 2000
16.	US 2005013419	Liu, Zhong et al.	14 de julio de 2005

Monografias

5	1.	Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Frazatti-Gallina NM, et al. <i>Vaccine</i> . 9 de diciembre de 2004; 23 (4):511-7.R
	2.	Rabies virus production in high Vero cell density cultures on macroporous microcarriers. Yokomizo AY. <i>Biotechnol Bioeng</i> . 5 de marzo de 2004; 85(5):506-15.
	3.	Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. Trabelsi K J <i>Biotechnol</i> . 24 de enero de 2006; 121(2):261-71.
10	4.	Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. Choi Y. <i>Vaccine</i> . 16 de mayo de 2003; 21(17-18):1867-73.
	5.	High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. Liu CC, <i>Vaccine</i> . 2 de agosto de 2006.
15	6.	Immunogenicity and protective efficacy in monkeys of purified inactivated Vero-cell SARS vaccine. Qin E, <i>Vaccine</i> . 13 de febrero de 2006; 24(7):1028-34.
	7.	The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media. Litwin J. <i>Cytotechnology</i> . 1992; 10(2):169-74.
	8.	Studies on the efficiency of measles virus antigen production using Vero cell culture in a microcarrier system. Mendonca RZ. <i>Braz J Med Biol Res</i> . Julio de 1994; 27(7):175-87.
20	9.	Preparation and evaluation of Vero-cell infectious bursal disease vaccine in Pakistan. Rasool MH, Hussain I. <i>Vaccine</i> . 5 de abril de 2006; 24(15):2810-4.
	10.	Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. Putnak R. <i>J Infect Dis</i> . Diciembre de 1996; 174(6):1176-84.
25	11.	Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. Promising results. Montagnon B. <i>Dev Biol Stand</i> . 1983; 55:37-42.
	12.	A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor. Sun MB. <i>World J Gastroenterol</i> . 1 de septiembre de 2004; 10(17):2571-3.
30	13.	Development of a novel influenza vaccine derived from a continuous cell line. Kistner O. <i>ALTEX</i> . 2001; 18(1):50-4.
	14.	Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. Merten OW. <i>Adv Exp Med Biol</i> . 1996; 397:141-51.
	15.	Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. Kistner O. <i>Dev Biol Stand</i> . 1999; 98:101-10.
35	16.	Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures. Merten OW. <i>Dev Biol Stand</i> . 1999; 98:23-37.
	17.	Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Frazzati-Gallina NM. <i>J Biotechnol</i> . 14 de diciembre de 2001; 92(1):67-72.
40	18.	A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. SrivastavaAK. <i>Vaccine</i> . 14 de agosto de 2001; 19(31):4557-65.
	19.	Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. Kistner O. <i>Vaccine</i> . Mayo-junio de 1998; 16(9-10):960-8.
	20.	Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. Montagnon BJ. <i>Rev Infect Dis</i> . Mayo-junio de 1984; 6 Suppl 2:S341-4.
45	21.	Application of a serum-free medium for the growth of Vero cells and the production of reovirus. Butler M. <i>Biotechnol Prog</i> . Septiembre-octubre de 2000; 16(5):854-8.

22. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. Y Choi. *Vaccine*, 16 de mayo de 2003; 21(17-18): 1867-73.
23. Cell aggregate suspension culture for large-scale production of biomolecules. Tolbert WR, Hitt MM, Feder J. *In Vitro*. Junio de 1980; 16(6):486-90.
- 5 24. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. Genari SC. *Cell Biol Int*. 1998; 22(4):285-94.
25. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Neuza M. Frazatti-Gallina. *Vaccine*, volumen 23, número 4, 9 de diciembre de 2004, páginas 511-517.
- 10 26. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Neuza M. Frazzati-Gallina. *Journal of Biotechnology*, volumen 92, número 1, 15 de noviembre de 2001, páginas 67-72.
27. Protein-free culture of Vero cells: a substrate for replication of human pathogenic viruses. Jindrich Cinatl, Jr. *Cell Biology International*, volumen 17, número 9, septiembre de 1993, páginas 885-896.
- 15 28. Butler, M; Burgener, A.; Patrick, M; Berry, D.; Moffatt, D.; Huzel, N.; Bernabé, N. y Coombs, K. (2000). Application of a serum-free medium for the growth of Vero Cells and production of reovirus. *Biotechnol. Progr.*, 16, 854-858.
29. Frazzati-Gallina, N. M.; Paoli, R. L.; Mourao-Fuches, R. M.; Jorge, S. A. C y Pereira, C. A. (2001). Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *J Biotechnol.*, 92, 67-72.
- 20 30. Montagnon, B. J.; Fanget, B.; Nicolas, A. J. (1981). Large-scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Dev. Biol. Stand.*, 47, 55-64.
31. Montagnon, B. J. (1989) Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. *Dev. Biol. Stand.*, 70, 27-47.
- 25 32. Tree, J. A.; Richardson, C., Fooks, A. R.; Clegg, J. C.; Looby, D. (2001) Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine*, 19, 3441-3450.
33. Reed, L. J., Muench, H. (1938), A simple method of estimating fifty percent end points. *J. Hyg.*, 27, 493-497.
- 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una línea celular VERO adaptada para desarrollarse en suspensión, en ausencia de materiales de soporte, para su adherencia y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino, siendo dicha línea la línea depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania) con el nombre sVero p66 y cuyo número asignado por la Autoridad Internacional de Depósito es DSM ACC2791.
2. La línea celular de la reivindicación 1, estando adaptada la línea celular para desarrollarse en un medio de cultivo libre de proteínas.
3. La línea celular de la reivindicación 1 en la que dicha suspensión comprende células aisladas en ausencia de agregados celulares.
- 10 4. La línea celular de la reivindicación 1, siendo dicha línea útil para la producción de virus para la formulación de vacunas.
5. Un procedimiento para producir virus para formular vacunas, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 15 a. desarrollar la línea celular VERO adaptada para desarrollarse en suspensión de la reivindicación 1 hasta una concentración celular de 1×10^5 a 30×10^6 células por ml de medio de cultivo;
 - b. infectar la línea celular de la etapa "a" con dicho virus con una multiplicidad óptima de infección de 0,001 a 10; y
 - c. recoger la producción de virus producida durante la infección.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicha línea celular VERO adaptada para desarrollarse en suspensión de la reivindicación 1 está adaptada para desarrollarse en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino y libre de proteínas.
7. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicho virus está seleccionado del grupo que comprende el virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 y el VIH-2; el virus de la poliomielitis; el virus de la hepatitis A, el virus de Coxsackie humano; el rinovirus; el ecovirus; el virus de la encefalitis equina; el virus de la rubéola, los virus del dengue, el virus de la encefalitis, el virus de la fiebre amarilla, los coronavirus, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la rabia, el virus del Ébola, los virus paragripales, el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus sincitial respiratorio, el virus de la gripe, el virus Hanta, los bunyavirus, el virus de la fiebre hemorrágica, el reovirus, el rotavirus, los parvovirus, el virus del papiloma, el poliomavirus, los adenovirus, los virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, el virus de la varicela-zóster, el citomegalovirus (CMV), el virus de la viruela, el virus vacuna, los poxvirus, el virus de la fiebre porcina africana y el agente no clasificado de la hepatitis delta y los agentes de las hepatitis no A y no B.
 - 25 8. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicho virus es el virus de la poliomielitis.
 9. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicho virus es el virus de la rabia.
 10. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicho virus es el virus de la hepatitis A.
 11. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicho virus es el virus de la fiebre amarilla.
 - 30 12. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicho virus es el virus de la gripe.
 13. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicha etapa "c" comprende una centrifugación.

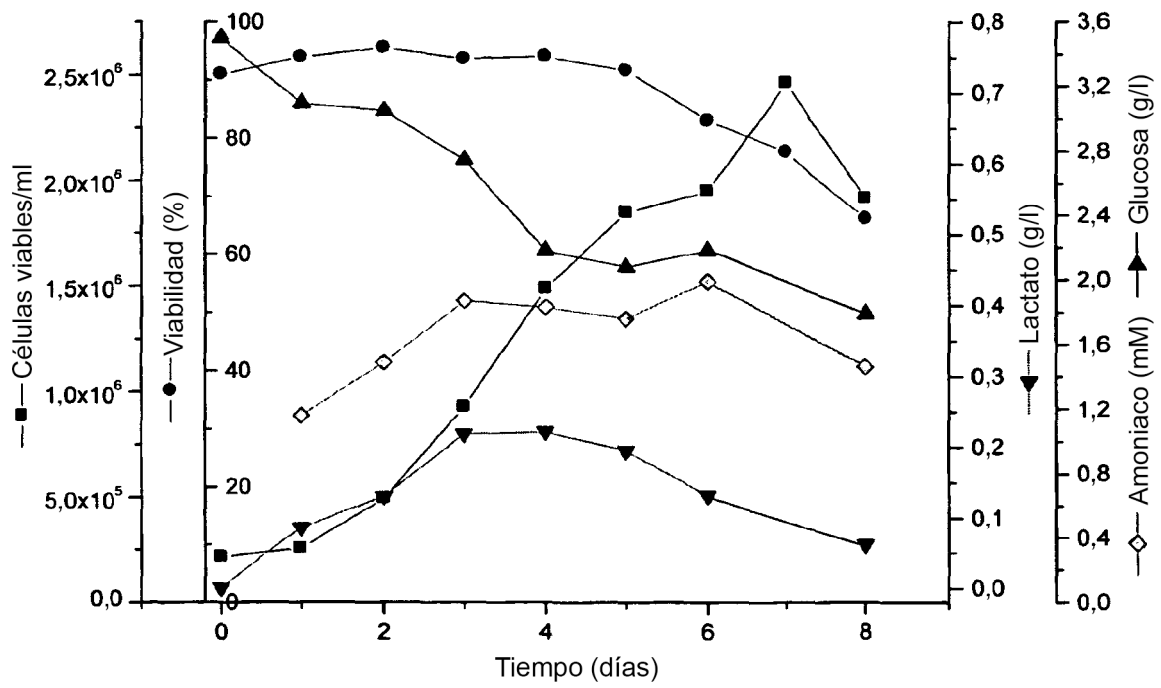


Figura 1