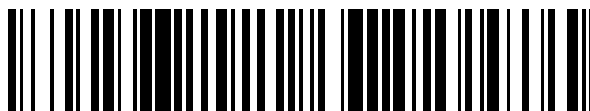


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 655**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2005** **E 12193096 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013** **EP 2578229**

54 Título: **Reducción de riesgos iatrogénicos potenciales asociados con antígenos de vacunas**

30 Prioridad:

09.09.2004 EP 04255471

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

04.12.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS GMBH
(100.0%)**

**Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

GREGERSEN, JENS PETER

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 432 655 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

Reducción de riesgos iatrogénicos potenciales asociados con antígenos de vacunas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a la producción y control de calidad de los antígenos de las vacunas contra el virus de la gripe.

10 Antecedentes de la técnica

Los virus de la gripe para uso en la preparación de vacunas para seres humanos se han desarrollado tradicionalmente en huevos de gallina embrionados, aunque las técnicas más modernas desarrollan el virus en cultivos celulares de mamífero, por ejemplo, en células Vero, células MDCK o células PER.C6. El cambio en el sustrato de crecimiento del virus ha proporcionado una oportunidad para una nueva evaluación reglamentaria de la seguridad de la vacuna antigripal. Por ejemplo, la contaminación con ADN de la célula hospedadora ha sido una objeción reglamentaria en las vacunas obtenidas a partir de células [1], pero no ha sido una objeción en el pasado para las vacunas desarrolladas en huevos.

Los principios de seguridad que rodean a las vacunas antigripales obtenidas a partir de huevos son, por lo tanto, diferentes de los que rodean a las vacunas desarrolladas en cultivos celulares, estando las vacunas obtenidas a partir de células bajo una vigilancia más atenta. Es un objeto de la invención abordar estos asuntos de seguridad diferentes, y en particular, el de proporcionar procedimientos para aumentar la seguridad del desarrollo de vacunas antigripales en un cultivo celular Vero.

Kweon y otros (Vaccine, 4 de Junio de 1999;17(20-21):2546-53.) menciona pruebas para agentes adventicios en un proceso para cultivar virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en células Vero. Merten (Cytotechnology, Julio de 2002;39(2)91-116) aborda la contaminación por virus en cultivos celulares.

30 Divulgación de la invención

Por definición, el uso de sustratos de células de mamífero para la producción de la vacuna antigripal implica el cultivo celular en condiciones que sean perfectamente adecuadas para el desarrollo y la replicación vírica. El inventor ha comprobado que estas condiciones aumentan el riesgo de que puedan desarrollarse patógenos diferentes del virus de la gripe en el cultivo celular, dando lugar, con ello, a la contaminación potencial del producto de vacuna final. Los ensayos de contaminación no son, por lo general, difíciles de llevar a cabo, pero un fabricante debe saber primero qué tipo de ensayos hay que realizar. El inventor ha identificado riesgos de contaminación específicos, y su trabajo indica que pueden llevarse a cabo ensayos adecuados durante la fabricación con el fin de garantizar la seguridad y calidad de las vacunas antigripales desarrolladas en cultivos celulares. Algunos de los contaminantes pueden ser inocuos en un producto de vacuna final, pero su presencia puede interferir con la propagación y purificación posterior del virus de la gripe, de ahí que su eliminación sea un asunto primordial para la calidad y reproducibilidad; otros contaminantes serían perjudiciales en una vacuna final, de ahí que su eliminación sea un asunto de seguridad primordial.

El riesgo de contaminación que surge del cocultivo viral no carece de precedentes (por ejemplo, ciertos lotes de las primeras vacunas del virus de la polio se contaminaron con virus de simio 40 ("SV40"), un virus de polioma), pero no existía ninguna divulgación previa sobre la identificación de riesgos específicos asociados con el cultivo celular para la producción de la vacuna antigripal humana. Los virus de la gripe desarrollados en cultivos celulares tienen un riesgo particular de contaminación debido a que las cepas usadas para la producción de la vacuna están cambiando cada año y, en consecuencia, han de establecerse nuevos cultivos cada año. Este cambio anual en los materiales de producción significa que cada nuevo año entraña un nuevo riesgo de contaminación, particularmente debido a que durante la preparación de virus sembrados por los fabricantes están implicados múltiples pases, aumentando así el riesgo de desarrollo paralelo de agentes patógenos accidentales.

La invención proporciona un proceso para preparar un antígeno de la vacuna en un cultivo de una línea celular Vero, que comprende un paso de probar para un patógeno seleccionado del grupo consistente de parvovirus canino, poliomavirus JC, y circovirus.

El inventor ha identificado agentes infecciosos que pueden desarrollarse en las condiciones usadas para el desarrollo del virus de la gripe en cultivos celulares, pero que no se desarrollan en huevos de gallina. Estos agentes infecciosos representan un nuevo riesgo de contaminación para las vacunas antigripales que nunca ha sido un problema para las vacunas antigripales tradicionales. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una vacuna antigripal a partir de virus de la gripe que se desarrolla en un cultivo de una línea de células de mamífero, que comprende una etapa en la cual se ensaya la vacuna y/o el cultivo para determinar la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea de células, pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados.

El inventor ha identificado igualmente agentes infecciosos que se desarrollan en algunos substratos de células usados para la producción de vacuna antigripal pero que no se desarrollan en otros. Estos agentes infecciosos son por lo tanto un riesgo de contaminación únicamente para ciertas vacunas antigripales. Por lo tanto la divulgación también proporciona un proceso para preparar una vacuna contra la gripe del virus de la gripe que ha sido cultivado en un cultivo de una primera línea celular mamífera, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se prueba para la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha primera línea celular pero que no se desarrolla en una segunda línea celular mamífera.

La divulgación también proporciona un proceso para preparar una vacuna contra la gripe de virus de la gripe que ha sido cultivado en un cultivo de una línea celular mamífera, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se tratan para eliminar y/o inactivar un agente infeccioso que puede desarrollarse en la línea celular pero no se desarrolla en huevos de gallina embrionados. De manera similar, la divulgación proporciona un proceso para preparar una vacuna contra la gripe de virus de la gripe que ha sido cultivada en un cultivo de una primera línea celular mamífera, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se tratan para eliminar y/o inactivar un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha primera línea celular pero no se desarrolla en una segunda línea celular mamífera. Después de la eliminación y/o inactivación, la vacuna/cultivo puede ser probado para la presencia del agente infecciosos, por ejemplo para verificar que ha sido eliminado/inactivado.

La divulgación también proporciona una vacuna contra la gripe que ha sido obtenida por un proceso de la invención. La invención también proporciona una vacuna contra la gripe que se puede obtener por un proceso de la invención.

La divulgación también proporciona una vacuna contra la gripe que ha sido cultivada en un cultivo de una línea celular mamífera, en donde se ha confirmado que la vacuna está libre de la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea celular pero no se desarrolla en huevos de gallina embrionados. De manera similar, la invención proporciona una vacuna contra la gripe que ha sido cultivada en un cultivo de una primera línea celular mamífera, en donde se ha confirmado que la vacuna está libre de la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha primera línea celular pero no se desarrolla en una segunda línea celular mamífera.

La divulgación también proporciona una vacuna contra la gripe en la que el reovirus mamífero no es detectable por RT-PCR (por ejemplo usando la técnica RT-PCR basada en L1 divulgada en la referencia 16, usando cebadores L1.rv5, L1.rv6, L1.rv7, LV1.rv8 como se enseña). No habiéndose desarrollado en huevos, la vacuna estará libre de ovoalbúmina y de ADN de pollo.

La línea de células de mamífero

Las vacunas antigripales de la invención se desarrollan en una línea celular Vero y no en huevos embrionados.

Estas líneas celulares se encuentran ampliamente disponibles, por ejemplo, en la colección del American Type Cell Culture (ATCC) [10], o en el Coriell Cell Repositories [11]. Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587

Agentes infecciosos que no se desarrollan en huevos de gallina embrionados

El inventor ha identificado una variedad de patógenos que pueden desarrollarse en líneas celulares de mamífero (en particular, tanto en células MDCK como en células Vero) usadas para la preparación de virus de la gripe para la producción de vacunas, pero que no se desarrollan en huevos de gallina. El ensayo de contaminación por estos patógenos no era necesario para las vacunas preparadas sobre el substrato de huevo tradicional, pero el inventor ha comprobado que el control de calidad de las vacunas debería incluir ensayos para uno o más de estos patógenos con el fin de garantizar el cumplimiento de las normas de seguridad más exigentes. Los patógenos son los siguientes:

- *Pneumovirinae*, tales como los del género *Pneumovirus*, incluyendo el virus sincitial respiratorio (RSV).
- *Morbilivirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como el virus del sarampión.
- *Enterovirus* de la familia *Picornaviridae*, tal como el virus Coxsackie, virus ECHO y enterovirus, aunque algunos virus Coxsackie (por ejemplo, B3, B4) se ha visto que no se desarrollan en células MDCK.
- *Reoviridae* de mamífero, en particular ortoreovirus (por ejemplo, reovirus de mamífero) y rotavirus. Los reovirus pueden mostrar desarrollo no limitado en células Vero y MDCK, y en consecuencia, el ensayo de los mismos es de particular importancia. Los rotavirus comparten los requisitos de proteasa de los virus de la gripe con el fin de desarrollarse en cultivos celulares y este paralelismo podría dar lugar de manera inconsciente a la activación de rotavirus contaminantes.

En los casos en los que estos patógenos tienen cepas diferentes con hospedadores diferentes (por ejemplo, RSV humano y RSV bovino), el ensayo incluirá típicamente a las cepa(s) de interés que puedan infectar a humanos.

El ensayo para estos agentes es particularmente importante para cepas víricas obtenidas a partir de técnicas genéticas inversas, ya que los virus sembrados para la fabricación de virus experimentarán múltiples pases en los cultivos de células de mamífero durante los procedimientos de genética inversa, aumentando, con ello, el riesgo de contaminación por agentes infecciosos accidentales.

Agentes infecciosos que no se desarrollan en huevos, pero que se desarrollan en diferentes líneas celulares de mamífero

El inventor ha identificado una variedad de patógenos que no se desarrollan en huevos de gallina, que no se desarrollan en células MDCK, pero que se desarrollan en células Vero. El ensayo de contaminación por estos patógenos no era necesario para las vacunas preparadas en el sustrato de huevo tradicional y no es necesario para las vacunas preparadas en células MDCK, pero el inventor ha comprobado que el control de calidad de las vacunas desarrolladas en células Vero debería incluir ensayos para uno o más de estos patógenos con el fin de garantizar las normas de seguridad más exigentes. Los patógenos son los siguientes:

- *Metapneumovirus*, de la familia *Paramyxoviridae*, tal como metapneumovirus humano (HMPV).
- *Rubellavirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus de las paperas, el cual se desarrolla en células Vero.
- *Togaviridae*, tal como *Rubellavirus*.
- *Coronaviridae*, tal como el coronavirus SARS y otros coronavirus humanos. Estos virus muestran altas tasas de desarrollo en células Vero, mostrando el virus SARS desarrollo no limitado, y en consecuencia, el ensayo para estos es de particular importancia.
- *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*, tales como las cepas M de Rhinovirus.
- Virus de varicella Zoster (VZV), también conocido como virus 2 de herpes humano 5 (HHV3). El VZV puede mostrar desarrollo no limitado en células Vero y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- *Polyomaviridae*, tales como el virus de polio SV-40, el virus de polio BK, y el virus de polio JC. Estos virus de polio pueden mostrar desarrollo no limitado en células Vero (en particular, en células BK) y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- *Circovirus* porcino.
- *Picornavirus* porcino, tales como el virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV) y el virus Teschen-Talfan.
- Bacterias *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*. Estas bacterias pueden desarrollarse en células Vero y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- *Parvovirus*, tales como parvovirus canino (CPV) o parvovirus porcino.

En los casos en los que estos patógenos tienen cepas diferentes con hospedadores diferentes (por ejemplo, RSV humano y RSV bovino), el ensayo incluirá típicamente a las cepa(s) de interés que puedan infectar a humanos.

El ensayo para virus no humanos (por ejemplo, virus aviar y porcino) es particularmente importante únicamente cuando los materiales aviares o porcinos de interés se han usado en la preparación vírica, por ejemplo, si las cepas fueron inicialmente aisladas a partir de cerdos o aves, o si se usaron pases de huevos durante el desarrollo inicial, o si se usó tripsina de porcino en los cultivos celulares, etc.

Agentes infecciosos que se desarrollan en huevos y líneas celulares mamíferas

El inventor ha identificado también patógenos que, al contrario que los descritos anteriormente, se desarrollan tanto en líneas celulares mamíferas como en huevos de gallina. Un proceso de la invención puede implicar un paso de pruebas para tales patógenos, pero este paso será también parte del control de calidad mejorado de los virus cultivados en huevos de gallina. Estos patógenos incluyen:

- Virus parainfluenza (PIV), miembros de *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, incluyendo PIV-1, PIV-2 y PIV-3
- El *Herpesviridae*, como virus 1 y 2 del herpes simples.
- El *Adenoviridae*, como los adenovirus, incluyendo adenovirus humano y simio.
- *Mycoplasma*.
- *Circovirus* aviares.
- *Reoviridae* aviar, en particular orthoreovirus, como reovirus aviares que pueden desarrollarse en líneas celulares mamíferas.

El inventor ha identificado también patógenos que se desarrollan en huevos de gallina y en células Vero, pero no o es improbable que crezcan en células MDCK. Un proceso de la invención puede implicar un paso de probar tales patógenos, pero este paso sería también parte del control de calidad mejorado de los virus cultivados en huevos de gallina, y el paso no es necesario si se usa un sustrato de MDCK. Estos patógenos incluyen:

- *Birnaviridae*, como el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (también conocido como virus gumboro).

La prueba para agentes que se desarrollan en tanto huevos como líneas celulares es importante para las cepas virales derivadas después de múltiples pasos en huevos, por ejemplo virus de inóculo para la fabricación de virus.

- 5 Como estos patógenos se desarrollan en huevos entonces la prueba para su presencia también puede ser usada para virus preparados de virus cultivados en huevos. Por lo tanto la invención no está limitada a vacunas cultivadas en cultivo celular, sino que también puede ser usada para vacunas basadas en huevo "tradicionales".

Procedimientos de ensayo

- 10 Los procedimientos para la detección de la presencia de patógenos en cultivos celulares y en productos biofarmacéuticos se encuentran disponibles de manera rutinaria. Generalmente, los procedimientos se basan en la detección inmunoquímica (inmunoensayo, transferencia Western, ELISA, etc.) y/o la detección de ácido nucleico (métodos de hibridación, tales como la transferencia Southern o la transferencia por ranuras, PCR, etc.). Como una alternativa, es posible ensayar la presencia de un patógeno mediante inoculación convencional de cultivos celulares
- 15 (es decir, ensayo de si el material conduce a la producción del patógeno contaminante cuando se cultiva en condiciones adecuadas).

- 20 Los procedimientos pueden detectar un único patógeno (por ejemplo, virus) o pueden detectar múltiples patógenos (por ejemplo, varios virus). Cuando un ensayo detecta múltiples patógenos (por ejemplo, "X", "Y" o "Z"), en ese caso, puede dar un resultado específico (por ejemplo, el virus "Y" está presente) o puede dar un resultado general (por ejemplo, está presente uno de "X", "Y" o "Z"). Los procedimientos pueden ser cuantitativos, semicuantitativos o cualitativos. Pueden usarse procedimientos de detección en tiempo real.

- 25 Las directrices generales para la detección de un patógeno (por ejemplo, virus) de interés pueden encontrarse en la referencia 14. En el siguiente párrafo, se muestran varios ensayos más específicos, y el experto en la materia podrá encontrar o preparar fácilmente un ensayo para la detección de la presencia de cualquier patógeno elegido.

- 30 La referencia 15 divulga un ensayo PCR de transcripción inversa múltiple (RT-PCR), referida como "m-RT-PCRELISA", para la detección de nueve patógenos de las vías respiratorias en un único ensayo, concretamente: enterovirus, virus de la gripe tipo A y tipo B, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza tipo 1 y tipo 3, adenovirus, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*. En la referencia 16 se divulga un procedimiento RT-PCR para la detección de reovirus de mamífero. La referencia 17 divulga un ensayo RT-PCR en tiempo real para la detección del metaneumovirus humano procedente de todos los linajes genéticos conocidos. La referencia 18 divulga un único ensayo RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio humano (HRSV), virus de parainfluenza humano 1, 2, y 3 y de la gripe A y B. La referencia 19 divulga un ensayo RT-PCR múltiple para detectar y diferenciar el virus del sarampión, el virus de la rubéola y el parvovirus B19. En la referencia 20 se divulga un ensayo RT-PCR en tiempo real para detectar rinovirus humano con discriminación exacta de otros virus procedentes de la familia *Picornaviridae*. La referencia 21 divulga un ensayo RT-PCR múltiple con conjuntos de cebador anidados dirigidos a regiones conservadas de la hemaglutinina del virus parainfluenza humano, la proteína inoculada de coronavirus humano y los genes de poliproteína de enterovirus y rinovirus humanos, que permite la detección y determinación del tipo de manera rápida, sensible y simultánea de los cuatro tipos de virus parainfluenza (1, 2, 3, 4AB), el coronavirus humano 229E y OC43 y la detección genérica de enterovirus y rinovirus. En la referencia 22 se divulga la detección de SVDV mediante RT-PCR. En la referencia 23 se divulga un ensayo RT-PCR cuantitativo de una sola etapa para el coronavirus SARS. La referencia 24 divulga un ensayo PCR en tiempo real de discriminación alélica TaqMan para el VZV. En la referencia 25 se divulga un ensayo PCR múltiple para la detección simultánea y rápida de virus de la pseudorrabia, el parvovirus y el circovirus. En la referencia 26 se divulga un ensayo PCR de sonda FRET en tiempo real para la detección del virus de polioma SV-40. En la referencia 27 se divulga un ensayo para la detección y diferenciación simultánea del virus de polioma humano JC y BK mediante un procedimiento PCR-ELAHA rápido y sensible. En la referencia 28 se divulga la detección de circovirus porcino en líneas celulares humanas mediante PCR y ensayos de inmunofluorescencia indirecta. En las referencias 29 y 30 se divulgan procedimientos PCR para la detección de birnavirus.
- 40
- 45
- 50

- 55 El procedimiento de detección de la invención puede llevarse a cabo en cualquier fase(s) durante la fabricación de la vacuna, a partir del virus sembrado y/o el sustrato de células y/o el medio de cultivo, mediante las fases de infección vírica y de desarrollo, mediante la recolección de virus, mediante cualquier procesamiento vírico (por ejemplo, corte y/o extracción de la proteína de superficie), mediante la formulación de la vacuna y, finalmente, el envasado de la vacuna. Por lo tanto, el ensayo usado de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en los materiales usados para crear el cultivo vírico, en el propio cultivo vírico y en el material extraído y obtenido a partir del cultivo vírico. El ensayo no necesita llevarse a cabo en todas y cada una de las vacunas o cultivos, pero puede usarse a intervalos apropiados como parte del control de calidad normal. Es particularmente útil cuando se cambia la producción de vacuna para las nuevas cepas recomendadas cada año por las autoridades sanitarias, en cuya fase se establecen nuevos cultivos que deben ser sometidos a un nuevo control de calidad. Los ensayos de la invención se llevan a cabo de manera ventajosa en virus sembrados usados para la fabricación de vacunas
- 60

- 65 En los procedimientos de la invención, las líneas celulares Vero usadas para desarrollar virus de la gripe pueden cultivarse en cualquier medio adecuado, por ejemplo, en medios sin suero, en medios sin proteína, etc. En la

referencia 2 se divulgan procedimientos para el cultivo sin suero de virus de la gripe, y en la referencia 31 se divulgan procedimientos para el cultivo sin proteínas. No obstante, un medio "sin proteína" puede incluir una o más proteasas (por ejemplo, tripsina) que pueden ser necesarias para la propagación del virus de la gripe. Un medio sin suero puede incluir suplementos de suero.

También se prefiere que la vacuna se haya desarrollado en un cultivo sin la adición de material bovino, garantizando, de esta forma, que el cultivo está libre de cualquier contaminación posible de BSE y de virus bovinos. Los medios que no incluyen componentes asociados con ninguna encefalopatía espongiforme transmisible son los preferidos.

La vacuna antigripal

La presente invención se refiere al control de calidad de antígenos de la vacuna, por ejemplo de vacunas antigripales. La vacuna puede estar en la forma de un virus vivo o, preferiblemente, un virus inactivado. Típicamente, los virus inactivados implican el tratamiento con un producto químico, tal como formalina o β -propiolactona. Cuando se usa un virus inactivado, la vacuna puede ser un virus completo, un virus fraccionado o subunidades víricas. Los virus fraccionados se obtienen mediante el tratamiento de viriones con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, etc.) para producir preparaciones de subviriones. Las vacunas de subunidades comprenden los antígenos de superficie de la hemaglutinina y neuraminidasa del virus de la gripe. Los antígenos del virus de la gripe pueden estar presentes igualmente en la forma de virosomas [32].

Las vacunas antigripales de la invención pueden estar basadas en cualquier cepa(s) adecuada. Típicamente, las vacunas incluyen antígenos de al menos una cepa de virus de la gripe A y/o al menos una cepa de virus de la gripe B. Las cepas recomendadas para vacunas cambian de una temporada a otra. En el período interpandémico actual, típicamente, las vacunas incluyen típicamente dos cepas de virus de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de virus de la gripe B, y se prefieren las vacunas trivalentes. La invención es también adecuada para la preparación de virus a partir de cepas pandémicas, tales como las cepas H5 o H7, es decir cepas a las cuales la población humana no ha sido inmunológicamente expuesta. Las vacunas en situaciones pandémicas pueden ser monovalentes, o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal suplementada con una cepa pandémica.

El virus o tipos de virus de la gripe usados en los procedimientos de la invención pueden ser cepas reordenadas, y/o pueden haberse obtenido mediante técnicas genéticas inversas. El virus o tipos de virus pueden estar atenuados. El virus o tipos de virus pueden ser sensibles a la temperatura. El virus o tipos de virus pueden estar adaptados al frío.

En los casos en los que una vacuna incluye más de una cepa del virus de la gripe, típicamente, las diferentes cepas se desarrollan por separado y se mezclan después de que los virus se han recolectado y se han preparado los antígenos. Por lo tanto, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa de mezclado de antígenos procedentes de más de una cepa de virus de la gripe. El ensayo para patógenos puede llevarse a cabo antes o después de dicho mezcla.

Típicamente, la vacuna se preparará para administración a un paciente mediante inyección (por ejemplo, inyección subcutánea o inyección intramuscular), aunque se conocen otras vías de administración para vacunas antigripales, por ejemplo, intranasal [33-35], oral [36], intradérmica [37,38], transcutánea, transdérmica [39], etc.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Las vacunas antigripales se recomiendan actualmente para uso en inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6 meses. Las exigencias de seguridad son más elevadas para las vacunas pediátricas, particularmente debido a que los sujetos inmunológicamente no expuestos reciben, típicamente, dos dosis de vacunas en un corto período de tiempo (por ejemplo, con 1 a 2 meses de intervalo).

Las vacunas pueden incluir un adyuvante. Los adyuvantes que se han usado en vacunas antigripales incluyen sales de aluminio [40,41], quitosano [42], oligodesoxinucleótidos CpG, tales como CpG 7909 [43], emulsiones de aceite en agua, tal como MF59 [44], emulsiones de agua en aceite [45], toxina termolábil 5 de *E. coli* [34,46] y sus mutantes destoxificados [47-48], lípido monofosforilo A [49] y su derivado 3-o-desacetilado [50], mutantes de toxina pertussis [51], dipéptidos muramilo [52], etc.

La hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en las vacunas antigripales inactivadas y las dosis de vacuna están normalizadas con referencia a las concentraciones de HA, típicamente medidas mediante un ensayo de inmunodifusión radial único (SRID). Típicamente, las vacunas contienen aproximadamente 15 μ g de HA por cepa, aunque también se usan dosis más bajas, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas. Se han usado dosis fraccionadas tales como 1/2 (es decir, 7,5 μ g de HA por cepa), 1/4 y 1/8 [40,53]. Por lo tanto, las vacunas pueden incluir entre 1 y 20 μ g de HA por cepa de virus de la gripe, preferiblemente, por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, etc.

Las vacunas pueden incluir conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna esté sustancialmente libre de materia mercurial (es decir, menos de 5 µg/ml), por ejemplo, libre de tiomersal [54,55]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas.

Preferiblemente, las vacunas contienen menos de 10 ng (preferiblemente menos de 1 ng y más preferiblemente menos de 100 pg) de ADN de la célula hospedadora residual por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades trazas de ADN de la célula hospedadora. El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación convencionales, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación del ADN de la célula hospedadora residual puede aumentarse mediante tratamiento con nucleasa, por ejemplo, mediante el uso de Benzonase™ DNase [1]. Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula hospedadora por 15 µg de hemaglutinina son las preferidas, como las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula hospedadora por 0,25 ml de volumen. Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula hospedadora por 50 µg de hemaglutinina son más preferidas, como las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula hospedadora por 0,5 ml de volumen.

Estas diferentes características de las vacunas pueden obtenerse incluyendo etapas adecuadas en los procedimientos de la invención. Así, las etapas específicas incluyen: una etapa de inactivación; una etapa de mezclado de tres cepas de virus para obtener una vacuna trivalente; una etapa de formulación de la vacuna para inyección; una etapa de administración de la vacuna a un paciente; una etapa de combinación de la vacuna con el adyuvante; una etapa de medición del contenido de HA; una etapa de ajuste del contenido de HA, por ejemplo, por dilución; una etapa de adición de un conservante; una etapa de eliminación de los ácidos nucleicos de la célula hospedadora residuales; etc.

Agentes accidentales preferidos para ensayo

Las realizaciones preferidas de la divulgación implican agentes accidentales, y particularmente virus, que se han encontrado en muestras respiratorias, ya que estos es más probable que se encuentren presentes en aislados clínicos iniciales de virus de la gripe. Los patógenos respiratorios incluyen: RSV, PIV-3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus ("virus huérfano entérico respiratorio"), etc. El virus herpes simple puede encontrarse también en muestras respiratorias.

En los casos en los que una vacuna ha sido tratada con detergente (por ejemplo, una vacuna fraccionada o una subunidad de vacuna), entonces esta etapa de tratamiento ofrece un grado de seguridad extra, puesto que puede también destruir los virus contaminantes. Sin embargo, si el contaminante no tiene envuelta, entonces, el tratamiento con detergente habitualmente no tendrá efecto sobre la vacuna y, por tanto, no mejora por sí mismo la seguridad. Por lo tanto, el ensayo para los patógenos siguientes es particularmente importante, ya que no tienen envuelta: *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Adenoviridae*, *Polyomaviridae*.

La resistencia a detergentes de estos virus combinada con su alto desarrollo en células Vero indica que es particularmente importante ensayar los enterovirus humanos, los *Reoviridae* humanos, los *Adenoviridae* y los *Polyomaviridae* cuando se usa un substrato de células Vero. Igualmente, los *Reoviridae* de mamíferos se desarrollan en altas tasas en células MDCK. Estos virus se encuentran igualmente entre los más resistentes a la inactivación.

Otros biológicos

Además de ser útil para probar las vacunas contra la gripe, la invención también puede ser usada para otros biológicos, como proteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos [56], factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, receptores, hormonas, antígenos de vacunas, antígenos de diagnóstico, etc.

Generalidades

El término "comprende" abarca "incluye", así como "constituido", por ejemplo, una composición que "comprende" X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x, significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente sin" Y puede estar completamente libre de Y. En casos necesarios, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

En los capítulos 17 y 18 de la referencia 57 puede encontrarse información general adicional sobre vacunas antigripales, incluyendo cepas, líneas celulares para desarrollo, dosis, combinaciones, formulaciones, etc. En el capítulo 46 de la referencia 14 pueden encontrarse detalles adicionales sobre virus de la gripe, incluyendo detalles de su ciclo de vida durante el desarrollo vírico.

La divulgación además proporciona las siguientes realizaciones:

- 5 1. Un proceso para preparar una vacuna contra la gripe del virus de la gripe que ha sido cultivado en un cultivo de una línea celular mamífera, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se prueba para la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea celular pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados.
- 10 2. Un proceso para preparar una vacuna contra la gripe del virus de la gripe que ha sido cultivado en un cultivo de una línea celular mamaria, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se trata para eliminar y/o inactivar un agente infeccioso que puede desarrollarse en la línea celular pero no se desarrolla en los huevos de gallina embrionados.
- 15 3. El proceso de la realización 1 o la realización 2, en el que la línea celular mamífera es una línea celular MDCK, una línea celular Vero, o una línea celular PER.C6.
- 20 4. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que el agente infeccioso es seleccionado del grupo consistente de: *Pneumovirinae*; *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Enterovirus* de la familia *Picornaviridae*; *Reoviridae* mamífero; y *Birnaviridae*.
- 25 5. El proceso de la realización 4, en el que el agente infeccioso es seleccionado del grupo consistente de: virus sincitial respiratorio; virus del sarampión; virus de Coxsackie; ecovirus; enterovirus; orthoreovirus; rotavirus; y virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa.
- 30 6. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que la línea celular mamífera es una línea celular Vero, y en el que el agente infeccioso es seleccionado del grupo consistente de: *Metapneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Togaviridae*; *Coronaviridae*; *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*; virus zoster de la varicela; *Polyomaviridae*; circovirus porcinos; picornavirus porcinos; bacteria *Chlamydia*; y *Parvovirus*.
- 35 7. El proceso de la realización 6, en el que el agente infeccioso es seleccionado del grupo consistente de: metapneumovirus humano; virus de las paperas; *Rubellavirus*; coronavirus SARS; cepas M de Rinovirus; poliomavirus SV-40; poliomavirus BK; poliomavirus JC; virus de la enfermedad vesicular porcina; virus Teschen-Talfan; *C.trachomatis*; *C. pneumoniae*; *C.psittaci*; parvovirus canino; y parvovirus porcinos.
- 40 8. El proceso de cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se prueba para la presencia de un patógeno seleccionado del grupo consistente de: virus de parainfluenza; *Herpesviridae*; *Adenoviridae*; Micoplasma; circovirus aviares; y *Reoviridae* aviar.
- 45 9. Un proceso para preparar una vacuna contra la gripe del virus de la gripe que ha sido cultivado en un cultivo de una primera línea celular, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se prueba para la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha primera línea celular pero que no se desarrolla en una segunda línea celular mamífera.
- 50 10. Un proceso para preparar una vacuna contra la gripe del virus de la gripe que ha sido cultivado en un cultivo de una primera línea celular, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se trata para eliminar y/o inactivar un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha primera línea celular pero no se desarrolla en una segunda línea celular mamífera.
- 55 11. El proceso de la realización 9 o la realización 10, en el que (a) la primera línea celular mamífera es seleccionada del grupo consistente de: una línea celular MDCK, una línea celular Vero, o una línea celular PER.C6; (b) la segunda línea celular mamífera es seleccionada del grupo consistente de: una línea celular MDCK, una línea celular Vero, o una línea celular PER.C6; y (c) la primera y la segunda líneas celulares mamíferas son diferentes.
- 60 12. El proceso de cualquiera de las realizaciones 9 a 11, en el que la primera línea celular es un línea celular Vero; y en el que el agente infeccioso es seleccionado del grupo consistente de: *Metapneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Togaviridae*; *Coronaviridae*; *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*; virus zoster de la varicela; *Polyomaviridae*; circovirus porcinos; picornavirus porcinos; bacteria *Chlamydia*; *Parvovirus*; y *Birnaviridae*.
- 65 13. El proceso de la realización 12, en el que el agente infeccioso es seleccionado del grupo consistente de: metapneumovirus humano; virus de las paperas; *Rubellavirus*; coronavirus SARS; cepas M del Rinovirus; poliomavirus SV-40; poliomavirus BK; poliomavirus JC; virus de la enfermedad vesicular porcina; virus Teschen-Talfan; *C.trachomatis*; *C. pneumoniae*; *C.psittaci*; parvovirus canino; parvovirus porcinos; y virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa.

14. El proceso de cualquiera de las realizaciones 9 a 13, comprendiendo además un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se prueba para la presencia de un patógeno seleccionado del grupo consistente de: virus de parainfluenza; *Herpesviridae*; *Adenoviridae*; *Mycoplasma*; circovirus aviares; y *Reoviridae* aviar.
- 5 15. El proceso de la realización 2 o la realización 10, que comprende un paso adicional en el que, después de la mencionada eliminación y/o inactivación, la vacuna y/o cultivo se prueba para la presencia del mencionado agente infeccioso.
- 10 16. Un proceso para preparar una vacuna contra la gripe del virus de la gripe que ha sido cultivado en un cultivo de una línea celular mamífera o en huevos de gallina, que comprende un paso en el que la vacuna y/o el cultivo se prueba para la presencia de un patógeno seleccionado del grupo consistente de: virus de parainfluenza; *Herpesviridae*; *Adenoviridae*; *Mycoplasma*; circovirus aviares; *Reoviridae* aviar; y *Birnaviridae*.
- 15 17. El proceso de la realización 16, en el que el patógeno es seleccionado del grupo consistente de: PIV-1; PIV-2; PIV-3; virus 1 del herpes simple; virus 2 del herpes simple; adenovirus humano; adenovirus simio; orthoreovirus; y virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa.
- 20 18. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el cultivo se prueba por detección inmunoquímica y/o detección de ácidos nucleicos.
- 25 19. El proceso de la realización 18, en el que la detección es por ELISA y/o PCR (incluyendo RT-PCR).
- 30 20. Una vacuna contra la gripe que ha sido cultivada en un cultivo de una línea celular mamífera, en donde se ha confirmado que la vacuna está libre de la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea celular pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados.
- 35 21. Una vacuna contra la gripe que ha sido cultivada en un cultivo de una primera línea celular mamífera, en donde se ha confirmado que la vacuna está libre de la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha primera línea celular pero no se desarrolla en una segunda línea celular mamífera.
- 40 22. La vacuna de la realización 18 o la realización 19, en donde la vacuna fue cultivada en un cultivo de una línea celular MDCK, una línea celular Vero, o de una línea celular PER.C6.
- 45 23. Una vacuna contra la gripe en la que el reovirus mamífero es indetectable por RT-PCR.
- 50 24. La vacuna de la realización 23, que está libre de ovoalbúmina y de ADN de pollo.
- 55 25. Una vacuna contra la gripe obtenida o obtenible por el proceso de cualquiera de las realizaciones 1 a 17.
- 60 26. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 25, que es una vacuna de virus vivo.
27. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 25, que es una vacuna de virus inactivado.
28. La vacuna de la realización 27, que es una vacuna de virus completo, una vacuna de virus dividido, o una vacuna de subunidad de viral.
29. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 28, que es una vacuna contra la gripe trivalente.
30. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 29, que incluye una cepa del virus de la gripe pandémica.
31. La vacuna de la realización 30, que incluye una cepa del virus de la gripe H5 o H7.
32. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 31, que es para la administración a un paciente por inyección, por una vía intranasal, por una vía oral, por una vía intradérmica, por una vía transcutánea, o por una vía transdérmica.
33. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 32, que es para inmunización pediátrica.
34. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 33, que incluye 1-20 µg de de hemaglutinina del virus de la gripe por cepa.
35. La vacuna de cualquiera de las realizaciones 20 a 34, que incluye un adyuvante.

Modos para llevar a cabo la invención

Células MDCK

El inventor tiene amplia experiencia en el desarrollo de virus de la gripe en células MDCK en cultivo sin suero para la preparación de vacunas. El autor ha comprobado que las células son también hospedadores adecuados para otros agentes patógenos y, por tanto, se ha ensayado la capacidad de otros patógenos para desarrollarse en las mismas condiciones (específicamente, cultivo de MDCK 33016, depositado como DSM ACC2219, en medio sin suero, tal como se divulga en la referencia 2).

Cuando se ensaya para determinar la replicación del virus activo o el desarrollo en células MDCK, los ensayos para los virus sincitiales respiratorios RSV-A2 y RSV-B fueron negativos. Se detectaron cepas de virus parainfluenza PI-3 y SV-5. Los ensayos para coronavirus humano 229E y SARS fueron negativos, así como los ensayos para el virus de la polio I, virus ECHO 6, virus coxsackie A16 y virus coxsackie B3. Los ensayos de rinovirus Tipo Ib, 37 y NL.9501841 fueron negativos. Los ensayos para reovirus Reo3 fueron positivos, así como los ensayos para el virus del herpes simple HSV-1. Los ensayos para adenovirus humano 1, 5 y 6 fueron negativos. Los ensayos para SV-40 fueron negativos, y los títulos de inóculo se mantuvieron estables durante 14 días. Los ensayos de parvovirus canino y de virus diminuto del ratón fueron negativos, al igual que el del virus del sarcoma de Rous. El ensayo de *Mycoplasma hyorhinis* fue negativo. El ensayo de *Chlamydia trachomatis* fue negativo, aunque no puede excluirse un nivel muy pequeño de desarrollo durante los días 3-5 después de la infección.

La investigación adicional reveló que las células MDCK pueden soportar el desarrollo del virus de la estomatitis vesicular (Indiana), virus vaccinia, virus coxsackie B5, reovirus 2, adenovirus humano tipos 4 y 5, exantema vesicular de virus porcino y virus de la hepatitis canina infecciosa [58].

De entre los virus que podrían desarrollarse en células MDCK, los virus de parainfluenza, el virus del herpes simple y los adenovirus pueden desarrollarse también en huevos de gallina embrionados. Por el contrario, los reovirus humanos (y reovirus de otros mamíferos) no se desarrollan fácilmente en huevos. Si se usa MDCK como un sistema de cultivo celular para la producción de virus de la gripe, entonces, el ensayo de control de calidad debería comprobar la contaminación por reovirus humano. El inventor estima que las concentraciones de reovirus podrían incrementarse en 5 log o más durante pases repetidos en cultivos de suspensión de MDCK, mientras que las concentraciones de un virus, tal como el adenovirus disminuirían en 6 a 10 log. Las concentraciones del virus herpes simple deberían igualmente comprobarse, ya que es posible el desarrollo de HSV en al menos 8 log. De manera similar, se ha observado el desarrollo de PIV-3 en 8 log después de 1 semana de cultivo.

Células Vero

Tras los trabajos de ensayo en células MDCK, se investigó la replicación de patógenos en células Vero. Las células Vero sirven de soporte para el desarrollo de patógenos tales como: neumovirus, tales como RSV-A y RSV-B; metaneumovirus humano (HMPV); morbilivirus, tal como el virus del sarampión; paramixovirus, tales como el virus de las paperas y el virus parainfluenza; virus de la rubéola; coronavirus humano y aviar; picornavirus, tales como enterovirus, virus ECHO y virus coxsackie y virus SVDV y Teschen-Talfan porcinos; reovirus de mamífero y aviar; virus del herpes, tales como HSV-1 y HSV-2; adenovirus de simio y humano; virus zoster de varicela (VZV); virus de polioma, tales como JC, BK y SV-40; birnavirus, tal como gumbovirus; circovirus porcino; parvovirus canino y *Chlamydia*.

De entre estos patógenos, los siguientes no se desarrollan en huevos de gallina y, por lo tanto, existen nuevos riesgos de contaminación de las vacunas antigripales cuando se usan células Vero como sustrato: RSV; HMPV; virus del sarampión; virus de la rubéola; coronavirus humanos; enterovirus; reovirus; VZV; virus de polioma; picornavirus porcinos; parvovirus y circovirus. Muchos de estos patógenos no se desarrollan en células MDCK, lo que muestra que MDCK es un sustrato más seguro para la producción de vacuna antigripal. Los virus emergentes, tales como coronavirus SARS se desarrollan en células Vero, pero no en células MDCK. De manera similar, VZV se desarrolla en células Vero, pero no en huevos de gallina ni en células MDCK. La vacunación con una vacuna antigripal obtenida a partir de células Vero que haya sido contaminada inadvertidamente con este coronavirus o con VZV podría dar lugar a un brote iatrogénico de SARS y/o varicela, lo cual sería desastroso tanto para la población como para la reputación de las vacunas. Sin embargo, habiendo identificado estos riesgos pueden establecerse los mecanismos de control de calidad apropiados.

Además de las células Vero, las células PER.C6 soportan el desarrollo de adenovirus [59,60]. En base a características víricas conocidas, puede esperarse también que las células PER.C6 soporten el desarrollo de al menos virus de parainfluenza y de reovirus.

Se entenderá que la invención se ha descrito anteriormente a modo de ejemplo solamente y se pueden hacer modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito de la invención.

REFERENCIAS

- [1] Documento US patent 5948410.
- [2] Documento WO97/37000.
- 5 [3] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
- [4] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240-7.
- [5] Tree et al. (2001) Vaccine 19:3444-50.
- [6] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.
- 10 [7] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.
- [8] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.
- [9] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.
- [10] <http://www.atcc.org/>
- [11] <http://locus.umdj.edu/>
- 15 [12] Documento WO03/076601.
- [13] Documento WO2005/042728.
- [14] Knipe & Howley Fields Virology (4th edition, 2001). ISBN 0-7817-1832-5.
- [15] Puppe et al. (2004) J Clin Virol 30:165-74.
- [16] Leary et al. (2002) J Clin Microbiol 40:1368-75.
- 20 [17] Maertzdorf et al. (2004) J Clin Microbiol 42:981-6.
- [18] Erdman et al. (2003) J Clin Microbiol 41:4298-303
- [19] Mosquera Mdel et al. (2002) J Clin Microbiol 40:111-6.
- [20] Deffernez et al. (2004) J Clin Microbiol 42:3212-3218.
- [21] Coiras et al. (2004) J Med Virol 72:484-95.
- 25 [22] Reid et al. (2004) J Virol Methods 116:169-76.
- [23] Poon et al. (2004) J Clin Virol 30:214-7.
- [24] Campsall et al. (2004) J Clin Microbiol 42:1409-13.
- [25] Huang et al. (2004) Vet Microbiol 101:209-14.
- [26] Mayall et al. (2003) J Clin Pathol 56:728-30.
- 30 [27] Whiley et al. (2004) J Med Virol 72:467-72.
- [28] Hattermann et al. (2004) Xenotransplantation 11:284-94.
- [29] Novoa et al. (1995) Vet Res 26:493-8.
- [30] Blake et al. (1995) J Clin Microbiol 33:835-9.
- [31] Documento WO96/15231.
- 35 [32] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74-91.
- [33] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566-77.
- [34] Zurbruggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
- [35] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.
- [36] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425-9.
- 40 [37] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247-50.
- [38] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234-8.
- [39] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830-6.
- [40] Hehme et al. (2004) Virus Res 103:163-71.
- [41] Documento US patent 6372223.
- 45 [42] Documento US patent 6534065.
- [43] Cooper et al. (2004) Vaccine 22:3136-43.
- [44] Frey et al. (2003) Vaccine 21:4234-7.
- [45] Bozkir & Hayta (2004) Drug Target 12:157-64.
- [46] Guebre-Xabier et al. (2003) J Virol 77:5218-25.
- 50 [47] Peppoloni et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-93.
- [48] Pine et al. (2002) J Control Release 85:263-70.
- [49] Baldrige et al. (2000) Vaccine 18:2416-25.
- [50] Documento WO94/19013.
- [51] Documento EP-A-0721782.
- 55 [52] Documento 5 US patent 5292506.
- [53] Documento WO01/22992.
- [54] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
- [55] WO02/097072.
- [56] Adamson (1998) Dev Biol Stand 93:89-96.
- 60 [57] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein) 4th edition, 2004. ISBN 0-7216-9688-0.
- [58] ATCC catalog information for MDCK (CCL 34).
- [59] Goossens et al. (2001) Arthritis Rheum 44: 570-7.
- [60] Fallaux et al. (1998) Hum Gene Ther 9:1909-17.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un proceso para preparar un antígeno de la vacuna en un cultivo de una línea celular Vero, que comprende un paso de prueba para un patógeno seleccionado del grupo consistente de parvovirus canino, poliomavirus JC, y circovirus.
- 10 **2.** El proceso de la reivindicación 1, en donde el patógeno es circovirus porcino.
- 10 **3.** El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que se prueba la vacuna y/o el virus de inóculo y/o el sustrato celular y/o el medio de cultivo.
- 15 **4.** El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el proceso se realiza en material usado para crear un cultivo viral; o en cultivo viral; o un material extraído o derivado del cultivo viral.
- 15 **5.** El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso en el que el virus de inóculo y/o el antígeno de la vacuna y/o el cultivo se prueban para la presencia de un patógeno seleccionado del grupo consistente de; virus de parainfluenza; *Herpesviridae*; *Adenoviridae*; *Mycoplasma*; circovirus aviare; y *Reoviridae* aviar.
- 20 **6.** El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que el cultivo se prueba por detección inmunoquímica y/o detección de ácidos nucleicos.
- 25 **7.** El proceso de la reivindicación 6, en el que la detección es por ELISA y/o PCR (incluyendo RT-PCR).
- 25 **8.** El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que la prueba se realiza en una de las etapas siguientes: infección viral, etapas de crecimiento, cosecha viral; procesamiento viral; división; extracción de la proteína de la superficie, formulación de la vacuna; envase de la vacuna.
- 30 **9.** El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que la prueba se realiza como parte del control de calidad normal.
- 30 **10.** El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que el antígeno de la vacuna es del virus de la gripe.
- 35 **11.** El proceso de la reivindicación 10, en el que el antígeno de la vacuna es un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe sensible a la temperatura o un virus de la gripe adaptado al frío.
- 35 **12.** El proceso de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, comprendiendo además un paso de mezclar antígenos de más de una cepa de la gripe.