

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 726**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.1997** **E 09011476 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013** **EP 2172543**

54 Título: **Procedimiento para la replicación de virus de la gripe en cultivo celular y los virus de la gripe que pueden obtenerse por el procedimiento**

30 Prioridad:

**01.04.1996 DE 19612967**

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

**23.12.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS GMBH  
(100.0%)  
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76  
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**GRÖNER, ALBRECHT y  
VORLOP, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 435 726 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la replicación de virus de la gripe en cultivo celular y los virus de la gripe que pueden obtenerse por el procedimiento.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para hacer una vacuna para administración a humanos o animales en cultivo celular en suspensión a una temperatura en el intervalo de 32° C a 34° C.

10 Mancini y col. (Rev. Farm. Bloquím. Univ. Sao Paulo, Vol. 29(2) 1993; 89-95) desvela experimentos en los que se evaluó la diferencia de tripsina en la multiplicación de virus de la gripe en células MDCK. En estos experimentos las células que son cultivadas adherentemente se incubaron a 35 °C después de que se añadiera el virus de la gripe.

15 Todas las vacunas de la gripe que se han usado desde los años 40 hasta la actualidad como vacunas permitidas para el tratamiento de seres humanos y animales consisten en una o más cepas del virus que se han replicado en huevos de gallina embrionados. Estos virus se aislaron del fluido alantoideo de huevos de gallina infectados y se usan sus antígenos como vacuna como partículas del virus intactas o como partículas del virus disgregadas por detergentes y/o disolventes, denominada vacuna escindida, o como proteínas del virus definidas aisladas, denominada vacuna de subunidad. En todas las vacunas permitidas, los virus se inactivan por procedimientos conocidos por el experto en la materia. Incluso la replicación de virus atenuados vivos, que se ensaya en vacunas experimentales, se lleva a cabo en huevos de gallina embrionados.

25 El uso de huevos de gallina embrionados para producción de vacunas es costoso, laborioso y consume tiempo. Los huevos, de poblaciones sanas de gallinas controladas por veterinarios, deben incubarse antes de la infección, habitualmente durante 12 días. Antes de la infección, los huevos tienen que seleccionarse con respecto a embriones vivos, puesto que solo estos huevos son adecuados para replicación del virus. Después de la infección los huevos se incuban de nuevo, habitualmente durante 2 a 3 días. Los embriones aun vivos en este momento se sacrifican por frío y el fluido alantoideo se obtiene después a partir de los huevos individuales por aspiración. Por medio de procedimientos de purificación laboriosos, se separan sustancias del huevo de la gallina que conducen a efectos secundarios no deseados de los virus y se concentran los virus. Puesto que los huevos no son estériles (sin patógenos), es necesario adicionalmente retirar y/o inactivar pirógenos y todos los patógenos que posiblemente están presentes. Para aumentar la producción de virus, la replicación de los virus de la gripe en los huevos de gallina como norma se lleva a cabo a temperaturas reducidas (aproximadamente 34 °C). Incluso los virus que provocan enfermedades respiratorias pueden replicarse en cultivo celular. Aquí también, en algunos casos, se emplean temperaturas reducidas (aproximadamente de 33 °C), que, sin embargo, no tienen efecto en la calidad de una vacuna que pueda obtenerse, sino que favorecen únicamente la replicación.

40 Pueden replicarse virus de otras vacunas tales como, por ejemplo, virus de la rabia, virus de las paperas, sarampión y rubéola, virus de la polio y virus de FSME en cultivos celulares. Puesto que los cultivos celulares que se originan de bancos celulares ensayados están sin patógenos y, a diferencia de los huevos de gallina, son un sistema de replicación de virus definido que (teóricamente) está disponible en cantidades casi ilimitadas, hacen posible una replicación de virus económica en ciertas circunstancias incluso en el caso de virus de la gripe. La producción de vacuna económica se consigue también posiblemente en tanto que el aislamiento y purificación del virus de un medio de cultivo celular estéril definido parece más sencilla que del fluido alantoideo que contiene proteína en gran medida.

50 El aislamiento y replicación de virus de la gripe en huevos conduce a una selección de ciertos fenotipos, la mayoría de los cuales difiere del aislado clínico. A diferencia de esto está el aislamiento y replicación de los virus en cultivo celular, en el que no se produce selección dependiente de pase (Oxford, J.S. y col., J. Gen. Virology 72 (1991), 185 189; Robertson, J.S. y col., J. Gen. Virology 74 (1993) 2047 - 2051). Para una vacuna eficaz, por lo tanto, la realización de virus en cultivo tisular también va a preferirse a partir de este aspecto que de huevos. Se sabe que los virus de la gripe pueden replicarse en cultivos celulares. Además de células embrionarias de gallinas y células de hámster (BHK 21- F Y HKCC), células MDBK y en particular células MDCK se han descrito como células adecuadas para la replicación *in Vitro* de virus de la gripe (Kilbourne, E. D., en: Influenza, páginas 89 - 110, Plenum Medical Book Company- Nueva York y Londres, 1987). Un prerrequisito para una infección exitosa es la adición de proteasas al medio de infección, preferentemente tripsina o serina proteasa similares, puesto que estas proteasas escinden extracelularmente la proteína precursora de hemaglutinina [HAo] a hemaglutinina activa [HA1 y HA2]. Solamente la hemaglutinina escindida conduce a la adsorción de los virus de la gripe en células con asimilación de virus posterior en la célula (Tobita, K. y col., Med. Microbiol. Immunol., 162 (1975), 9 - 14; Lazarowitz, S.G. & Choppin, p.w., Virology, 68 (1975) 440 - 454; Klenk, H.-D. y col., Virology 68 (1975) 426 - 439) Y de este modo a un ciclo de replicación adicional del virus en el cultivo celular.

65 La Patente US 4 500 513 describe la replicación de virus de la gripe en cultivos celulares en células que crecen de forma adherente. Después de la proliferación celular, el medio nutriente se retira y se añade medio nutriente fresco a las células, teniendo lugar la infección de las células con virus de la gripe simultáneamente o poco después. Un tiempo dado después de la infección, se añade proteasa (por ejemplo tripsina) para obtener una replicación de virus

5 óptima. Los virus se recogen, purifican y procesan para proporcionar vacuna inactivada o atenuada. La replicación de virus de la gripe económica como un prerrequisito para la producción de vacunas no puede conseguirse, sin embargo, usando la metodología descrita en la patente mencionada, puesto que el cambio de medio, la infección posterior así como la adición de tripsina que se lleva a cabo más tarde, necesitan que se abran los recipientes de cultivo celular individuales varias veces y es por lo tanto muy laboriosa. Además, aumenta el peligro de contaminación del cultivo celular por microorganismos no deseables y virus con cada manipulación de los recipientes de cultivo. Una alternativa más rentable es proliferación celular en sistemas fermentadores conocidos por el experto en la materia, creciendo las células de forma adherente en micro vehículos. El suero necesario para el crecimiento de las células en los micro vehículos (habitualmente suero de ternero fetal), sin embargo, contiene inhibidores de tripsina, de modo que incluso en este procedimiento de producción es necesario un cambio de medio a medio sin suero para conseguir la escisión de la hemaglutinina de la gripe por tripsina y por lo tanto una replicación de virus adecuadamente alta. De este modo esta metodología también requiere la apertura de los recipientes de cultivo varias veces y por lo tanto trae consigo el aumento de peligro de contaminación.

15 La presente invención se basa por lo tanto en el objeto de realizar procedimientos disponibles que hagan posible una aplicación de virus de la gripe simple y económica en cultivo celular y conduzca a una vacuna altamente eficaz.

20 Este objeto se consigue por la provisión de las realizaciones indicadas en las reivindicaciones de la patente.

25 Se ha descubierto sorprendentemente que por la replicación de los virus de la gripe en células infectadas a temperaturas reducidas, se obtienen virus que tienen una eficacia sensiblemente superior como vacuna que los virus que se obtienen por replicación a 37 °C. La replicación a 37 °C, la temperatura usada habitualmente para la replicación de gripe en el cultivo celular, ciertamente conduce a rendimientos de virus comparativamente altos en un tiempo corto. Sin embargo, los virus introducidos de este modo tienen una eficacia baja como vacuna en comparación con virus que se preparan por el procedimiento de acuerdo con la invención.

30 Las células que se usan en el procedimiento de acuerdo con la invención para la replicación de virus de la gripe pueden ser en principio cualquier tipo deseado de células que pueden ser cultivadas en cultivo celular y que pueden ser infectadas por virus de la gripe. En una realización preferida, las células son células de vertebrados, en particular células de ave y en este contexto preferiblemente células de gallina, por ejemplo células de embrión de gallina (células CEF).

35 En una realización preferida adicional, las células son células mamíferas, por ejemplo células de hámster, ganado, mono o perro. Preferiblemente se usan, células de riñón o líneas celulares derivadas de estas. Ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres EHK21-F o HKCC. Las células de mono posibles son, por ejemplo, células VERO, y las células posibles de ganado son la línea celular MDBK. Un ejemplo de una línea celular de riñón adecuada es la línea celular MDCK (ATCC CCL34 MDCK (NBL-2)) de riñones de perro.

40 En el contexto de la presente invención, se estableció una línea celular adicional a partir de la línea celular de riñón canina MDCK, adaptándose dicha línea celular adicional a crecimiento en suspensión en medio sin suero y hace posible por lo tanto una replicación de virus y cultivo eficaz y particularmente simple. Esta línea celular, MDCK 33016, se usa preferentemente particularmente en el procedimiento de acuerdo con la invención. Se depositó con el número de depósito DSM ACC 2219 el 7 de junio de 1995 de acuerdo con los requisitos de la Convención de Budapest para el reconocimiento de la deposición de Microorganismos para fines de patente en la Colección alemana de Microorganismos (DSM) en Brunswick (Repubblica Federal de Alemania), que se reconoce como el sitio de deposición Internacional.

50 Para cultivar las células en el procedimiento de acuerdo con la invención, pueden usarse los procedimientos habituales conocidos por el experto en la materia para el cultivo celular, en particular los que ya se conocen para la replicación de virus de la gripe en cultivo celular. Llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención usando células que crecen en suspensión, en particular las que pueden cultivarse en medio sin suero, hace posible una aplicación de virus particularmente simple y eficaz. El cultivo de las células en suspensión puede en este caso llevarse a cabo tanto en el procedimiento discontinuo como en el sistema de perfusión, por ejemplo en un fermentador de recipiente agitado, usando los sistemas de retención celular conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, filtros de centrifugación y similares.

60 El cultivo de las células se lleva a cabo como norma a un pH regulado que está preferentemente en el intervalo de pH 6,6 a pH 7,8, en particular en el intervalo de pH 6,8 a pH 7,3.

Además, el valor de pO<sub>2</sub> puede regularse ventajosamente y está por lo tanto como norma entre 25 % y 95 %, en particular entre 35 % y 60 % (basándose en la saturación de aire).

65 La infección de las células cultivadas en suspensión se llevan a cabo preferentemente cuando las células en el procedimiento discontinuo han alcanzado una densidad celular de aproximadamente 8 a 25 x 10<sup>5</sup> células/ml o de

aproximadamente  $5$  a  $20 \times 10^6$  células/mi en el sistema de perfusión. Si se usan células que crecen de forma adherente, la densidad celular óptima para la infección depende de la línea celular particular.

5 La infección de las células con virus de la gripe se lleva a cabo preferentemente a una m.o.i (multiplicidad de infección) de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 0,5.

10 La adición de una proteasa que provoca la escisión de la proteína precursora de hemaglutinina [HA<sub>0</sub>] y por lo tanto la adsorción de los virus a las células puede llevarse a cabo de acuerdo con la invención poco antes, simultáneamente con o poco después de la infección de las células con virus de la gripe. Si la adición se lleva a cabo simultáneamente con la infección, la proteasa puede añadirse directamente al cultivo celular a infectar o, por ejemplo, como un concentrado junto con el inoculado de virus. Si se usa un medio que contiene suero para el cultivo, este debería retirarse antes de la adición de proteasa. La proteasa es preferentemente una serina proteasa y particularmente preferentemente tripsina.

15 Si se usa tripsina, la concentración final añadida en el medio de cultivo es ventajosamente de 1 a 200 µg/ml, preferentemente de 5 a 50 µg/ml y particularmente preferentemente de 5 a 30 µg/ml.

20 Después de la infección, el cultivo de células infectadas se cultiva adicionalmente para replicar los virus, en particular hasta que pueda detectarse un efecto citopático máximo o una cantidad máxima de antígeno de virus.

25 En una realización preferida del procedimiento, la recogida y aislamiento de los virus de la gripe replicados se lleva a cabo de 2 a 10 días, preferentemente de 3 a 17 días, después de la infección. Para hacer esto, por ejemplo, las células o restos celulares se separan del medio de cultivo por medio de procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo por separadores o filtros. Después de esto la concentración de los virus de la gripe presentes en el medio de cultivo se lleva a cabo por procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, centrifugación del gradiente, filtración, precipitación y similares.

30 Los virus de la gripe que pueden obtenerse por un procedimiento de acuerdo con la invención puede formularse por procedimientos conocidos para proporcionar una vacuna para administración a seres humanos o animales. Como ya se ha explicado anteriormente, los virus de la gripe de este tipo tienen una mayor eficacia como vacunas que los virus de la gripe que se obtienen por replicación a 37 °C en cultivo celular. La inmunogenicidad o eficacia de los virus de la gripe obtenidos como vacunas puede determinarse por procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo por medio de la protección transmitida en el experimento de exposición o como titulaciones de anticuerpo de anticuerpos neutralizadores del virus.

35 La determinación de la cantidad de virus o antígeno producida puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la determinación de la cantidad de hemaglutinina por procedimientos conocidos por el experto en la materia. Se sabe, por ejemplo, que la hemaglutinina escindida se une a eritrocitos de diversas especies, por ejemplo a eritrocitos de gallinas. Esto hace posible una cuantificación sencilla y rápida de los virus producidos o del antígeno formado por procedimientos de detección apropiados.

40 Por medio de experimentos de comparación en modelos animales, se demostró que los virus de la gripe de acuerdo con la invención producen una titulación apreciablemente superior de anticuerpos neutralizadores que los virus replicados a 37 °C y por lo tanto transmiten una protección sensiblemente mejor contra infección por virus de la gripe. En experimentos con ratones como modelo animal, la titulación de anticuerpos neutralizadores fue, por ejemplo, mayor en al menos un factor de 42, semanas después de la vacunación que la titulación de anticuerpos neutralizadores después de la inoculación con virus de la gripe que se habían replicado a 37 °C. 4 semanas después de la inoculación, la titulación de anticuerpos neutralizadores era mayor en al menos un factor de 17 y en algunos casos hasta 27 veces mayor. Si se llevara a cabo una revacunación, la titulación de anticuerpos neutralizadores podría ser mayor en un factor de más de 60 cuando se usan virus de la gripe de acuerdo con la invención en comparación con virus de la gripe que se habían replicado a 37 °C. En consecuencia, la tasa de supervivencia de animales en un experimento de exposición usando una administración de 1000 LD<sub>50</sub> (dosis letal al 50 %) puede aumentarse de 1/10 a al menos 8/1, preferentemente a 9/10 y particularmente preferentemente a 10/10 (100 %).

55 Las vacunas que contienen virus de la gripe que pueden obtenerse del procedimiento de acuerdo con la invención pueden contener opcionalmente los aditivos habituales para vacunas, en particular sustancias que aumentan la respuesta inmune, es decir los denominados adyuvantes, por ejemplo hidróxidos de diversos metales, constituyentes de paredes celulares bacterianas, aceites o saponinas y además excipientes farmacéuticamente tolerables.

60 Los virus pueden estar presentes en las vacunas como partículas de virus intactas, en particular como virus atenuados vivos. Para este fin, los concentrados de virus se ajustan a la titulación deseada y se liofilizan o estabilizan en forma líquida.

65 En una realización preferida adicional, las vacunas pueden contener virus disgregados, es decir inactivados, o intactos, pero inactivados. Para este fin, la posibilidad de infección de los virus se destruye por medio

de procedimientos químicos y/o físicos (por ejemplo por detergentes o formaldehído). la vacuna se ajusta después a la cantidad deseada de antígeno y después de posible mezcla de adyuvantes o después de posible formulación de vacunas, se distribuye, por ejemplo, como liposomas, microesferas o formulaciones de liberación lenta.

5 En una realización preferida adicional la vacuna puede finalmente estar presente como vacuna de subunidad, es decir, puede contener constituyentes de virus aislados definidos, preferentemente proteínas aisladas del virus de la gripe. Estos constituyentes pueden aislarse de los virus de la gripe por procedimientos conocidos por el experto en la materia.

10 Los ejemplos ilustran la invención.

**Ejemplo 1**

**Replicación de virus de la gripe en células MDCK a 33 °C**

15 Se replicaron células MDCK (ATCC CCL 34) en frascos de cultivo celular (MEM de Eagle [EMEM] usando FCS 2 % incubación a 37 °C durante 4 días). El césped celular denso resultante se separó de la pared del recipiente usando solución de tripsina, las células se aislaron y el concentrado de células se resuspendió en medio que contenía suero. las células se inocularon en frascos rotatorios (200 ml/frasco) a una densidad celular de 5 x 10<sup>5</sup> células/ml y se incubaron a 37 °C a 4 rpm. Después de dos días, las células se infectaron con virus de la gripe. Para hacer esto, se retiró el medio por encima del césped celular denso y se reemplazó con EMEM sin suero. Se añadió virus de la gripe A/PR/8/34 con una m.o.i. (multiplicidad de infección) de 0.1 y tripsina en una concentración final de 25 µg/ml al medio. Se incubaron dos frascos rotatorios en cada caso a 37 °C o a 33 °C. La replicación del virus se determinó como cantidad de antígeno (medida como unidades de hemaglutinina) y como posibilidad de infección (medida en el ensayo de CCID<sub>50</sub>) y se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1**

**Replicación de gripe A/PR/8/34 en frascos rotatorios (línea celular MDCK) después de incubación a 37 °C y 33 °C, medida como contenido de antígeno (unidades de HA y posibilidad de infección) (CCID<sub>50</sub>)**

| contenido de HA |       | CCID <sub>50</sub> /ml [log <sub>10</sub> ] |        |       |
|-----------------|-------|---|--------|-------|
|                 | 2 dpi | 3 dpi                                       | 4 dpi  | 4 dpi |
| 37°C            | 1:128 | 1:512                                       | 1:1024 | 6.4   |
| 33° C           | 1:64  | 1:256                                       | 1:1024 | 5.7   |

Dpi = días después de la infección

Las relaciones indicadas significan que una dilución 1:X de la recolección del virus aun tiene propiedades hemaglutinantes. Las propiedades hemaglutinantes pueden determinarse, por ejemplo, como se describe en Mayer y col., Virologische Arbeitsmethoden, [Virological Working Methods, Volumen 1 (1974), páginas 260-261 o en Grist, Diagnostic Methods in Clinical Virology, páginas 72-75.

30 La determinación del valor de CCID<sub>50</sub> puede llevarse a cabo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento que se describe en Paul, Zell- und Gewebekultur [cultivo tisular y celular] (1980), Pág. 395.

**Ejemplo 2**

**Preparación de una línea celular que se adapta a crecimiento en suspensión y puede infectarse por virus de la gripe**

35 Se selecciona una línea celular que es adecuada para el crecimiento en cultivo en suspensión y puede infectarse por virus de la gripe comenzando a partir de células MDCK (ATCC CCL34 MDCK (NBL-2)), que habían proliferado por medio de solamente unos pocos pases o durante varios meses en laboratorio. Esta selección se llevó a cabo por proliferación de las células en frascos rotatorios que se rotaron a 16 rpm (en lugar de aproximadamente 3 rpm como es habitual para frascos rotatorios que tienen células que crecen de forma adherente). Después de varios pases de las células presentes suspendidas en el medio, se obtuvieron cepas celulares que crecían en suspensión. Estas cepas celulares se infectaron con virus de la gripe y se seleccionaron las cepas que producían el mayor rendimiento de virus. Un aumento en la tasa de células que crecían en suspensión durante los primeros pases a 16 rpm se consiguió en de 1 a 3 pases mediante la adición de sistemas de selección conocidos por el experto en la materia, tales como hipoxantina, aminopterina y timidina, o alanosina y adenina, individualmente o en combinación. La selección de células que crecen en suspensión también es posible en otros sistemas de cultivo celular agitados conocidos por el experto en la materia, tales como matraces agitados. Un ejemplo de células que se adaptan a crecimiento en suspensión y pueden infectarse por virus de la gripe es la línea celular MDCK 33016 (OSM ACC2219).

**Ejemplo 3**

**Replicación de virus de la gripe en células MDCK 33016 a 33 °C**

5 La línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219) que crecía en suspensión se replicó a 37 °C en medio de Iscove con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces por semana en un frasco rotatorio que rotaba a 16 rpm. 4 días después de la transferencia, se consiguió un conteo celular de aproximadamente  $7,0 \times 10^5$  células/ml. Simultáneamente con la infección del cultivo celular ahora de 4 días de edad con la cepa de la gripe A/PR/8/34 (m.o.i. = 0,1), el cultivo celular se trató con tripsina (concentración final 25 µg/ml), se incubó adicionalmente a 37 °C o 33 °C y se determinó la replicación del virus durante 3 días (Tabla II).

**Tabla II**

**Replicación de gripe A/PR/8/34, medida como contenido de antígenos (unidades de HA) en frascos rotatorios (línea de células MDCK MDCK 33016) después de infección de un cultivo celular sin cambio de medio a una temperatura de incubación de 37 °C o 33 °C.**

Contenido de HA después de la infección (dpi)

|      | 1 dpi | 2 dpi | 3 dpi  |
|------|-------|-------|--------|
| 37°C | 1:64  | 1:512 | 1:1024 |
| 33°C | 1:16  | 1:128 | 1:1024 |

**Ejemplo 4**

**Replicación de diversas cepas de gripe en células MDCK 33016 (DSM ACC 2219) a 33 °C**

15 La línea celular MDCK 33016 (DSM ACC 2219) proliferó a 37 °C en medio de Iscove con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces por semana en un frasco rotatorio que rotaba a 16 rpm. 4 días después de la transferencia, se consiguió un conteo celular de aproximadamente  $7,0 \times 10^5$  a  $10 \times 10^5$  células/ml. Simultáneamente con la infección del cultivo celular ahora de 4 días de edad con diversas cepas de gripe (m.o.i. aproximadamente 0,1), el cultivo celular se trató con tripsina (concentración final de 25 µg/ml), se incubó adicionalmente a 33 °C y la replicación del virus se determinó el quinto día después de la infección (Tabla III).

**Tabla III**

**Replicación de cepas de gripe en frascos rotatorios (línea celular MDCK 33016) después de infección de un cultivo celular sin cambio de medio, medida como contenido de antígeno (unidades de HA)**

| Cepa de gripe          | Contenido de HA 5 días después de la infección |
|------------------------|--|
|                        | Contenido de HA                                |
| A/Singapur             | 1:1024   |
| A/Sichuan              | 1:256  |
| A/Shanghái             | 1:256  |
| A/Guizhou              | 1:128  |
| A/Beijing              | 1:512  |
| B/Beijing              | 1:256  |
| B/Yamagata             | 1:512  |
| A/PR/8/34              | 1:1024   |
| A/Equi 1/Praga         | 1:512  |
| A/Equi 2/Miami         | 1:256  |
| A/Equi 2 Fontainebleau | 1:128  |
| A/Swine/Ghent          | 1:512  |
| A/Swine/Iowa           | 1:1024   |
| A/Swine/Arnsberg       | 1:512  |

**Ejemplo 5****Preparación de una vacuna de gripe experimental**

5 Después de la inoculación en ratones, los virus de gripe patogénica humana habitualmente no conducen a su infección con procesos patológicos, de modo que los experimentos de protección con ratones son experimentalmente muy difíciles de construir. La cepa de virus de la gripe A/PR/8/34, sin embargo se adapta a los ratones y después de administración intranasal provoca una mortalidad dependiente de dosis en ratones.

10 Se preparó una vacuna experimental a partir de virus de la gripe A/PR/8/34 del Ejemplo 3 (A/PR/8 replicado a 37 °C o 33 °C) los virus de la gripe en medio de cultivo celular se separaron de células y fragmentos celulares por centrifugación de baja velocidad (2000 g, 20 minutos, 4° C) y se purificó por una centrifugación en gradiente de sacarosa (10 a 50 % (p/p) de gradiente de sacarosa lineal, 30.000 g, 2 horas, 4 °C). Se obtuvo la banda que contenía virus de la gripe, se diluyó con PBS pH 7,2 1:10 y se sedimentó a 20.000 rpm y se recogió el precipitado en PBS (volumen: 50 % del medio de cultivo celular original). Los virus de la gripe se inactivaron con formaldehído (adición dos veces de 0,025 % de una solución de formaldehído de concentración a 35 % a un intervalo de 24 horas, incubación a 20 °C con agitación).

20 Se inoculó a cada uno de 10 ratones NMRI, de 18 a 20 g de peso, 0,3 ml de cada una de estas vacunas experimentales inactivadas el día 0 y el día 28 por inyección subcutánea. 2 y 4 semanas después de la inoculación y también 1 y 2 semanas después de la revacunación, se tomó sangre de los animales para determinar la titulación de anticuerpos neutralizadores contra A/PR/8/34. Para determinar la tasa de protección, se expuso a los ratones 2 semanas después de la revacunación (6 semanas después del comienzo del experimento) por administración intranasal de 1000 DLso (dosis letal al 50 %). Los resultados del experimento se recopilan en la Tabla IV.

25

**Tabla IV**

**Eficacia de vacunas experimentales: para la vacuna A el virus de la gripe A/PR/8/34 se replicó a 37 °C y para la vacuna B a 33 °C. Se investigaron las titulaciones de anticuerpos neutralizadores contra A/PR/8 y también la tasa de protección después de exposición de los ratones.**

|      | Titulación de anticuerpos neutralizadores/ml* |          |            | Tasa de protección número de vivos/total |      |
|------|---|----------|------------|--|------|
|      | 2 s pvac                                      | 4 s pvac | 1 s prevac | 2 s prevac                               |      |
| 37°C | <28   | 56       | 676        | 1 620                                    | 1/10 |
| 33°C | 112   | 1 549    | 44 670     | 112 200                                  | 9/10 |

\* Semanas después de la vacunación (s pvac) y semanas después de la revacunación s prevac)

30 Los experimentos confirman que los virus de la gripe que se habían replicado a 37 °C en cultivo celular con un alto rendimiento de antígenos (titulación de HA) solamente indujeron titulaciones de anticuerpos neutralizadores bajas en el ratón y apenas proporcionaron protección, mientras que los virus de la gripe que se habían replicado a 33 °C en el cultivo celular también con un rendimiento de antígeno alto (titulación de HA) indujeron titulaciones de anticuerpos neutralizadores muy altas en el ratón y condujeron a muy buena protección.

30

**Ejemplo 6****Replicación de virus de la gripe en células MDCK a 33 °C y eficacia de la vacuna obtenida**

35

La línea celular MDCK (ATCC CL34) se replicó a 37 °C en un frasco de cultivo celular en MEM de Eagle (EMEM) con FCS 2 % con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces por semana. 4 días después de la transformación, había resultado un césped celular denso. Después de cambiar el medio a EMEM sin suero, el cultivo celular se infectó con gripe B/Beijing (m.o.i. = 0,1), se añadió tripsina al medio en una concentración final de 25 ~g/ml y se incubaron los frascos de cultivo celular infectado a 37 °C o a 33 °C. 4 días después de la infección, el contenido de HA en ambos lotes experimentales fue de 256 unidades de HA. Después de centrifugación a baja velocidad para retirar células/restos celulares, los virus en el sobrenadante se inactivaron con formaldehído (adición dos veces de 0,025 % de una solución de formaldehído de concentración de 35 % en un intervalo de 24 horas, incubación a 20 °C con agitación). En cada sección experimental, el adyuvante añadido fue hidróxido de aluminio (concentración final el 10 % de una solución de Al(OH)3 de concentración 2 %). Usando estas vacunas experimentales, se sometió en cada caso a 3 cobayas (400 a 500 g) por sección experimental a vacunación interplantar con 0,2 ml y revacunación 4 semanas después con la misma vacuna. Para investigar la eficacia de la vacuna, se tomaron muestras de sangre 2, 4 y 6 semanas después de la inoculación y se ensayaron en el ensayo de inhibición de hemaglutinación y ensayo de neutralización de suero (consultese Tabla V).

50

**Tabla V**

**Eficacia de vacunas experimentales de gripe B/Beijing después de replicación del virus a 37 °C y 33 °C en cultivo celular: se investigaron los parámetros serológicos de inhibición de hemaglutinación y anticuerpos neutralizadores (valores medios de 3 cobayas)**

|      | Titulación de inhibición de hemaglutinación |       |      | titulación de anticuerpos neutralizadores |       |        |
|------|---|-------|------|---|-------|--------|
|      | 2 s   | 4 s   | 6 s  | 2 s                                       | 4 s   | 6 s    |
|      | pvac*                                       | pvac* | pvac | pvac                                      | pvac  | pvac   |
| 37°C | 85  | 341   | 1024 | 851                                       | 1290  | 6760   |
| 33°C | 85  | 341   | 853  | 3890                                      | 22400 | 117490 |

\* s pvac = semanas después de inoculación (6 s pvac = 2 semanas después de revacunación)

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para hacer una vacuna para administración a humanos o animales que comprende:
- 5 a) la replicación de virus de la gripe en cultivo celular, en el que las células que pueden ser infectadas por virus de la gripe se cultivan en cultivo celular en suspensión en medio libre de suero, las células se infectan con virus de influenza y después de la infección se cultivan a una temperatura en el intervalo de 32° C a 34° C para la replicación del virus, en donde una proteasa es añadida a las células cultivadas antes, durante o después de la infección con virus de la gripe;
- 10 b) la recogida y el aislamiento de los virus de gripe replicados de 2 a 10 días después de la infección, en la que las células o residuos celulares son separados del medio de cultivo; y
- c) la formulación de los virus de la gripe replicados para dar la vacuna, en donde:
- la infecciosidad de los virus replicados se destruye por medio de métodos químicos y/o físicos
- o
- 15 los virus están presentes en la vacuna como virus atenuados vivos
2. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que las células se cultivan con virus de la gripe a 33° C después de la infección para la replicación del virus.
- 20 3. El procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las células son células de vertebrados.
4. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 3, en el que las células de vertebrados son células de ave.
- 25 5. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en donde las células de ave son células de embrión de gallina.
6. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 3, en el que las células de vertebrado son células de mamífero.
- 30 7. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 6, en donde las células de mamífero son células de hámster, ganado, mono o perro.
- 35 8. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 7, en donde las células de mamífero son células BHK21-F, células HKCC, células VERO, o células MDCK.
9. El procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteasa es un proteasa serina.
- 40 10. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 9, en donde la proteasa serina es tripsina.
11. El procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la recogida y aislamiento de los virus de la gripe tiene lugar de 2 a 7 días después de la infección.
- 45