

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 815**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2010 E 10773996 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2491117**

54 Título: **Métodos mejorados de genética inversa para la recuperación de virus**

30 Prioridad:

20.10.2009 US 279487 P

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

11.04.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DORMITZER, PHILIP;
KEINER, BJÖRN;
SUPHAPHIPHAT, PIRADA;
FRANTI, MICHAEL;
MASON, PETER;
UHLENDORFF, JENNIFER y
MATROSOVICH, MIKHAIL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 454 815 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

Métodos mejorados de genética inversa para la recuperación de virus

...

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo de la genética inversa. Además, se refiere a la fabricación de vacunas para la protección frente a diversos virus.

10 TÉCNICA ANTERIOR

La genética inversa permite la expresión recombinante y la manipulación de virus de ARN en un cultivo celular. Es una potente herramienta en virología y en la fabricación de vacunas, ya que permite la rápida producción de virus recombinantes (incluidos los reordenates) y/o su mutación. El método implica la transfección de células hospedadoras con uno o más constructos de expresión que codifican el genoma viral y el aislamiento del virus a partir de las células.

En Whiteley *et al.* (Influenza Other Respi Viruses. Julio de 2007; 1(4):157-66), el documento WO2005/062820, Koudstaal *et al.* (Vaccine. Abril de 2009 28;27(19):2588-93) y el documento US2008/124803 se describen métodos de producción de virus de la gripe en los que se transfectan células con constructos de expresión y se añaden, después de la transfección, células que son de un tipo celular diferente al de las células transfectadas.

Un inconveniente de la recuperación de virus mediante genética inversa es que el proceso es ineficaz y con frecuencia da como resultado un rendimiento viral insatisfactorio. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de proporcionar métodos de genética inversa alternativos y más eficaces.

RESUMEN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERENTES

Los autores de la invención han descubierto recientemente de manera sorprendente que la escasa eficacia de los métodos de genética inversa puede mejorarse significativamente transfectando las células con el constructo o los constructos de genética inversa y añadiendo posteriormente más células a las células transfectadas. Los autores de la invención suponen que el aumento de la eficacia observado se debe al hecho de que la transfección es perjudicial para las células. Por lo tanto, cualquier virus recuperado tiene que expandirse en células enfermas o esperar hasta que el virus se transfiere a células sanas. Esto da como resultado una pérdida de virus viables. La adición de células a las células hospedadoras transfectadas permite que el virus recuperado se multiplique en un sustrato de células sanas que aumenta significativamente el rendimiento viral.

En una forma de realización, la invención proporciona un método de preparación de un virus tal como se define en las reivindicaciones, que comprende las etapas de (i) transfección de un cultivo de células hospedadoras con al menos un constructo de expresión que codifica una molécula de ARN viral, (ii) adición de células a las células hospedadoras transfectadas de (i) para proporcionar una mezcla de células, y (iii) cultivo de la mezcla de células con el fin de producir los virus.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona un método de preparación de un virus para la fabricación de vacunas tal como se define en las reivindicaciones, que comprende las etapas de (i) transfección de un cultivo de células hospedadoras con al menos un constructo de expresión que codifica una molécula de ARN viral, (ii) adición de células a las células hospedadoras transfectadas de (i) para proporcionar una mezcla de células, (iii) cultivo de la mezcla de células con el fin de producir los virus, (iv) purificación del virus obtenido en la etapa (iii), y opcionalmente (v) formulación del virus en una vacuna.

Genética inversa

Puede utilizarse la genética inversa para producir una gran diversidad de virus de ARN, incluidos virus de ARN de cadena positiva [1,2], virus de ARN de cadena negativa [3,4] y virus de ARN bicatenario [5]. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de producción de un virus recombinante en el que el virus se obtiene utilizando el método de genética inversa de la presente invención.

Los sistemas de genética inversa conocidos implican la expresión de moléculas de ADN que codifican las moléculas de ARN viral (ARNv) deseadas a partir de promotores de Pol I, promotores de la ARN polimerasa bacteriana, promotores de la polimerasa de bacteriófagos, etc. Además, cuando un virus necesita determinadas proteínas para formar un virus infeccioso, los sistemas también proporcionan estas proteínas, por ejemplo, el sistema comprende adicionalmente moléculas de ADN que codifican proteínas virales de manera que la expresión de ambos tipos de ADN conduzca al ensamblaje de un virus infeccioso completo.

Cuando se utiliza la genética inversa para la expresión de ARNv, resultará evidente para el experto en la materia que la separación precisa de los elementos de la secuencia uno con respecto al otro es fundamental para

que la polimerasa inicie la replicación. Por lo tanto, es importante que la molécula de ADN que codifica el ARN viral se coloque correctamente entre el promotor de Pol I y la secuencia de terminación, pero esta colocación está dentro de las capacidades de aquellos que trabajan con sistemas de genética inversa.

5 Generalmente, la genética inversa resulta adecuada para la expresión de cualquier tipo de virus que necesite la producción de ARN genómico durante su ciclo vital. Tales virus incluyen, pero no se limitan a, virus de ARN de cadena positiva y de cadena negativa, tales como los que se describen más adelante. Preferentemente, el virus es un ortomixovirus, por ejemplo, un virus de la gripe. Los métodos de la invención son adecuados además para los virus no segmentados, así como para los segmentados.

10 Cuando el virus es un virus de ARN de cadena positiva suele ser suficiente transfectar una célula con un constructo de expresión que comprenda el genoma viral. Por ejemplo, la transfección de plásmidos que contienen el genoma de poliovirus dio como resultado la recuperación de poliovirus infecciosos [1,2]. La genética inversa para los virus de ARN de cadena negativa ha presentado más retos, ya que el ARN viral antisentido no suele ser infeccioso y necesita una ARN polimerasa para completar el ciclo vital. Por lo tanto, debe suministrarse la polimerasa viral, ya sea como proteína o como gen para la expresión de proteínas *in situ*.

20 Cuando el virus necesita una proteína para la infectividad, generalmente resulta preferente utilizar constructos de expresión bidireccionales ya que esto reduce el número total de constructos de expresión necesarios para la célula hospedadora. Por lo tanto, el método de la invención puede utilizar al menos un constructo de expresión bidireccional en el que un gen o ADNc se encuentra situado entre un promotor de Pol II cadena arriba y un promotor no endógeno de Pol I cadena abajo. La transcripción del gen o del ADNc a partir del promotor de Pol II produce un ARNm viral sentido con caperuza que puede traducirse a proteína, mientras que la transcripción a partir del promotor no endógeno de Pol I produce ARNv antisentido. El constructo de expresión bidireccional puede ser un vector de expresión bidireccional.

25 Con el fin de producir un virus recombinante, una célula debe expresar todos los segmentos del genoma viral que son necesarios para ensamblar un virión. El ADN clonado en los constructos de expresión de la presente invención proporciona preferentemente todo el ARN viral y todas las proteínas, pero también es posible utilizar un virus auxiliar para proporcionar algunos de los ARN y de las proteínas, aunque resultan preferentes los sistemas que no utilizan un virus auxiliar. Cuando el virus es un virus no segmentado, este puede conseguirse generalmente utilizando un único constructo de expresión en el método de la invención, a pesar de que también pertenece al alcance de la invención la expresión del genoma viral de virus no segmentados utilizando más de un constructo de expresión. Cuando el virus es un virus segmentado, el genoma viral suele expresarse utilizando más de un constructo de expresión en el método de la invención. Sin embargo, también se prevé la combinación de uno o más segmentos o incluso de todos los segmentos del genoma viral en un único constructo de expresión.

30 Los métodos de la invención son especialmente adecuados para producir cepas de virus reordenantes. La técnica puede utilizar la manipulación de plásmidos *in vitro* para generar combinaciones de segmentos virales, para facilitar la manipulación de las secuencias codificantes o no codificantes en los segmentos virales, para introducir mutaciones, etc. Resulta preferente el uso del sistema de expresión para la producción de cepas de virus reordenantes, ya que esto puede reducir significativamente el tiempo necesario para obtener un virus de base reordenante, lo que resulta especialmente beneficioso en situaciones en las que se necesita una rápida producción de vacunas para contrarrestar una epidemia. Por lo tanto, resulta preferente que el método de este aspecto de la invención utilice uno o más constructos de expresión que expresen los genes virales a partir de o derivados de al menos dos cepas de tipo silvestre diferentes.

40 También puede utilizarse un constructo de expresión que conduzca a la expresión de una proteína accesoria en la célula hospedadora. Por ejemplo, puede resultar ventajoso expresar una serin-proteasa no viral (por ejemplo, tripsina) como parte de un sistema de genética inversa.

Constructos de expresión

55 Los constructos de expresión que codifican las moléculas de ARN viral para su uso en la invención pueden ser cualquier constructo de expresión de uso común en la técnica de la recuperación de virus.

Los constructos de expresión utilizados pueden ser constructos de expresión unidireccionales o bidireccionales. Cuando una célula hospedadora expresa más de un transgén (ya sea en los mismos o en diferentes constructos de expresión) es posible utilizar la expresión unidireccional y/o bidireccional.

60 Los constructos de expresión bidireccional contienen al menos dos promotores que dirigen la expresión en diferentes direcciones (es decir, de 5' a 3' y de 3' a 5') a partir del mismo constructo. Los dos promotores pueden estar unidos operativamente a diferentes hebras del mismo ADN bicatenario. Preferentemente, uno de los promotores es un promotor de Pol I y al menos uno de los demás promotores es un promotor de Pol II. Esto resulta útil ya que el promotor de Pol I puede utilizarse para expresar los ARNc sin caperuza mientras que el promotor de

Pol II puede utilizarse para transcribir los ARNm que posteriormente pueden traducirse a proteínas, permitiendo así la expresión simultánea de ARN y proteína a partir del mismo constructo.

5 El constructo de expresión (ya sea unidireccional o bidireccional) incluirá por lo general una secuencia de terminación de la transcripción del ARN. La secuencia de terminación puede ser una secuencia de terminación endógena o una secuencia de terminación que no sea endógena de la célula hospedadora. Las secuencias de terminación adecuadas resultarán evidentes para los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, la secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II y ribozimas. Además, los constructos de expresión pueden contener una o más señales de poliadenilación de los ARNm, especialmente en el extremo de un gen cuya expresión esté controlada por un promotor de Pol II.

15 Los promotores de Pol I y Pol II utilizados en los constructos de expresión pueden derivarse de un organismo del mismo orden taxonómico que la célula hospedadora en la que se expresa el constructo de expresión. Como alternativa, los promotores pueden derivarse de un organismo de un orden taxonómico diferente al de la célula hospedadora. El término "orden" se refiere a la clasificación taxonómica convencional, y los ejemplos de órdenes son *primates*, *rodentia*, *carnivora*, *marsupialia*, *cetacean*, etc. Los seres humanos y los chimpancés están en el mismo orden taxonómico (*primates*), pero los seres humanos y los perros están en órdenes diferentes (*primates* vs. *carnivora*).

20 En los métodos de la invención, una célula hospedadora puede transfectarse con al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once o al menos doce constructos de expresión.

25 Un constructo de expresión puede ser un vector, tal como un plásmido u otro constructo episómico. Tales vectores comprenderán por lo general al menos un origen de replicación bacteriano y/o eucariota. Además, el vector puede comprender un marcador seleccionable que permita la selección en células procariontes y/o eucariotas. Los ejemplos de tales marcadores seleccionables son genes que confieren resistencia a los antibióticos, tales como ampicilina o kanamicina. El vector puede comprender adicionalmente uno o más sitios de clonación múltiple para facilitar la clonación de una secuencia de ADN.

30 Como alternativa, un constructo de expresión puede ser un constructo de expresión lineal. Tales constructos de expresión lineales no contendrán por lo general ninguna secuencia de amplificación y/o selección. Sin embargo, los constructos lineales que comprenden tales secuencias de amplificación y/o selección pertenecen también al alcance de la presente invención. En la referencia 6 se describe un ejemplo de un método que utiliza tales constructos de expresión lineales para la expresión del virus de la gripe.

35 Los constructos de expresión de la invención pueden generarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Tales métodos se describieron, por ejemplo, en la referencia 7. Cuando el constructo de expresión es un constructo de expresión lineal, es posible linealizarlo antes de introducirlo en la célula hospedadora utilizando un único sitio de enzima de restricción. Como alternativa, es posible escindir el constructo de expresión a partir de un vector utilizando al menos dos sitios de enzimas de restricción. Además, también es posible obtener un constructo de expresión lineal amplificándolo mediante una técnica de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante PCR).

40 Cuando el hospedador de expresión es una célula canina, tal como una línea celular MDCK, pueden optimizarse las regiones codificantes de proteínas para la expresión canina, por ejemplo utilizando un promotor de un gen canino de tipo silvestre o de un virus canino, y/o que tenga un uso de codones más adecuado para las células caninas que para las células humanas. Por ejemplo, mientras que los genes humanos favorecen ligeramente UUC como codón de Phe (54%), en las células caninas la preferencia es más fuerte (59%). Del mismo modo, mientras que no existe preferencia mayoritaria para los codones de Ile en las células humanas, el 53% de los codones caninos utilizan AUC para Ile. Los virus caninos, tal como el parvovirus canino (un virus ADNmc) también pueden servir de guía para la optimización de codones, por ejemplo un 95% de los codones de Phe en secuencias de parvovirus canino son UUD (vs. 41% en el genoma canino), un 68% de los codones de Ile son AUU (vs. 32%), un 46% de los codones de Val son GUU (vs. 14%), un 72% de los codones de Pro son CCA (vs. 25%), un 87% de los codones de Tyr son UAU (vs. 40%), un 87% de los codones de His son CAU (vs. 39%), un 92% de los codones de Gln son CAA (vs. 25%), un 81% de los codones de Glu son GAA (vs. 40%), un 94% de los codones de Cys son UGU (vs. 42%), sólo el 1% de los codones de Ser son UCU (vs. 24%), CCC nunca se utiliza para Phe y UAG nunca se utiliza como un codón de terminación. Por lo tanto, los genes codificantes de proteínas pueden hacerse más similares a los genes cuya naturaleza ya ha sido optimizada para la expresión en células caninas, facilitando con ello la expresión.

Transfección

65 "Transfección" se refiere a la introducción de ADN en una célula. Los constructos de expresión pueden introducirse en células hospedadoras utilizando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden introducirse en células hospedadoras empleando electroporación, DEAE-dextrano, precipitación

con fosfato de calcio, liposomas, microinyección o bombardeo de micropartículas. La genética inversa se practica comúnmente mediante el método de liposomas, por ejemplo utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine™. Sin embargo, los métodos de la invención no se limitan a la transfección con liposomas, sino que se espera que funcionen igualmente bien con otros métodos de transfección.

5 Las células pueden añadirse a las células hospedadoras transfectadas en cualquier momento hasta las 72 horas después de la transfección. Por ejemplo, las células pueden añadirse inmediatamente después de la transfección, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas o 72 horas después de la transfección. Generalmente, el tiempo máximo en el que se añaden las células después de la transfección coincidirá con el tiempo máximo durante el cual pueden sobrevivir las células transfectadas.

10 El período de "después de la transfección" se inicia una vez que el ADN se ha introducido en las células hospedadoras dentro del cultivo. El instante de tiempo en que se introduce el ADN variará en función de diversos factores, por ejemplo la línea celular utilizada, el método de transfección o la temperatura a la que se realiza la transfección. El experto puede determinar fácilmente el tiempo utilizando los métodos convencionales. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo en paralelo varios experimentos en los que se transfecten las células con los constructos de genética inversa en condiciones idénticas, salvo porque la transfección se detiene en diferentes instantes de tiempo. Si el ADN se ha introducido en la célula hospedadora, entonces debería haberse formado al menos un virus. Por lo tanto, el experto puede realizar ensayos en busca de la presencia de un virus, por ejemplo determinando el número de unidades formadoras de placas mediante ensayos convencionales. El primer instante de tiempo después del cual puede detectarse al menos una unidad formadora de placas (UFP) es el instante de tiempo en el que el ADN se ha introducido en la célula hospedadora.

15 Como alternativa, el período después del cual las células se añaden a las células transfectadas puede determinarse a partir del inicio de la transfección. El inicio de la transfección es el instante de tiempo en el que el constructo o los constructos de expresión que codifican la(s) molécula(s) viral(es) se ponen en contacto con el cultivo de células hospedadoras. Por lo tanto, las células pueden añadirse a las células transfectadas en cualquier momento hasta las 96 horas después del inicio de la transfección, por ejemplo, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 84 horas o 96 horas. Mientras que el instante de tiempo "después de la transfección" y el instante de tiempo "desde el inicio de la transfección" se miden respecto a diferentes puntos de partida, el tiempo absoluto en el que se añaden las células a las células infectadas puede ser el mismo. Por ejemplo, si se tarda 1 hora en introducir el ADN en las células hospedadoras en un cultivo y las células se añaden 30 minutos después de haber introducido el ADN, entonces se habrán añadido las células 90 minutos después del inicio de la transfección o 30 minutos después de la transfección.

20 El número de células que se añaden después de la transfección variará generalmente en función del número de células que se utilizan como células hospedadoras para la transfección y también del tamaño del recipiente de cultivo celular que se utilice para la transfección. El experto puede determinar fácilmente el número de células que podrían utilizarse en los métodos de la invención. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden realizarse en condiciones idénticas en varios experimentos paralelos, salvo porque difiere el número de células que se añaden. Puede utilizarse el número de células que proporciona el mayor rendimiento viral en experimentos adicionales. Por ejemplo, cuando se utilizan aproximadamente 6×10^5 células como cultivo de partida para la transfección con Lipofectamine™, pueden añadirse aproximadamente 4×10^5 células.

25 Las células que se añaden después de la transfección proporcionan un sustrato para que se replique el virus recuperado. Por lo tanto, las células pueden ser células no infectadas, lo que significa que las células no han sido infectadas con un virus o transfectadas con un constructo de expresión que codifica una ARN viral en un tiempo determinado (por ejemplo 48 horas) antes de ser utilizadas en los métodos de la invención. Las células que han sido infectadas con un virus, por ejemplo el virus de Epstein-Barr para inmortalizarlas, resultan adecuadas para su uso en la presente invención. Análogamente, las células transfectadas pueden utilizarse en los métodos de la presente invención a condición de que la transfección no se produzca poco antes (es decir, dentro de las 48 horas antes) de utilizar las células en los métodos de la presente invención.

30 Cuando el virus recuperado necesita la presencia de una proteasa para la infectividad, resultará ventajoso añadir la proteasa junto con las células después de la transfección. Por ejemplo, el virus de la gripe necesita la actividad de una serin-proteasa, como la tripsina, para la infección. Por lo tanto, cuando se utilice el método de la invención para recuperar virus de la gripe, la serin-proteasa puede añadirse al mismo tiempo que las células después de la transfección. Como alternativa, la proteasa puede añadirse antes o después de añadir las células a las células transfectadas.

Células

35 La presente invención puede ponerse en práctica con cualquier célula eucariota que pueda producir el virus de interés. La invención utilizará por lo general una línea celular aunque, por ejemplo, pueden utilizarse células primarias como alternativa. La célula será por lo general de mamífero. Las células de mamífero adecuadas incluyen,

pero no se limitan a, células de hámster, vaca, primates (incluidos los seres humanos y los monos) y de perro. Pueden utilizarse diversos tipos de células, tales como células renales, fibroblastos, células de la retina, células pulmonares, etc. Los ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares con los nombres BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde africano, tal como células renales como en la línea celular Vero [8-10]. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo, células renales, como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

Otras células adecuadas incluyen, pero no se limitan a: CHO; 293T; BHK; MRC 5; PER.C6 [11]; FRhL2; WI-38; etc. Las células adecuadas son de fácil adquisición por ejemplo, en la American Type Culture Collection (ATCC) [12], en los Coriell Cell Repositories [13] en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con los números de catálogo CCL 81, CCL 81.2, CRL 1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK con el número de catálogo CCL 34. PER.C6 está disponible en la ECACC con el número de depósito 96022940. Las células MDCK, Vero y PER.C6 se utilizan comúnmente para la producción de virus y por lo tanto cada una de estas líneas celulares resulta especialmente adecuada para su uso con los métodos de la presente invención.

Las células preferentes (en particular para el cultivo del virus de la gripe) para su uso en la invención son las células MDCK [14-16], derivadas de riñón canino de Madin Darby. Las células MDCK originales están disponibles en la ATCC como CCL 34. Resulta preferente utilizar derivados de estas células o derivados de otras células MDCK. Los derivados de células MDCK se describieron, por ejemplo, en la referencia 14, que describe células MDCK que se adaptaron para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33.016' o '33016-PF', depositadas como DSM ACC 2219, véase también la referencia 14). Además, la referencia 17 describe células derivadas de MDCK que crecen en suspensión en un cultivo libre de suero ('B-702', depositada como FERM BP-7449). La línea celular MDCK utilizada puede ser tumorigénica. También se contempla el uso de células MDCK no tumorigénicas. Por ejemplo, la referencia 18 describe células MDCK no tumorigénicas, incluidas 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (ATCC PTA-6503). La referencia 19 describe células MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluidas las células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL 12042).

Las células que se utilizan para la transfección y las células que se añaden después de la transfección pueden ser del mismo tipo celular. Por ejemplo, los constructos de expresión pueden transfectarse en una cepa de células MDCK y las células añadidas pueden ser de una cepa de MDCK diferente. Este enfoque es ventajoso cuando el virus recuperado crece mejor en una línea celular que no puede transfectarse fácilmente. En este aspecto, el virus puede transfectarse en células que son más fáciles de transfectar pero puede propagarse posteriormente en una línea celular que sea más adecuada para la replicación viral. Sin embargo, generalmente resulta preferente utilizar la misma línea celular (por ejemplo, células MDCK 33016) como célula hospedadora tanto para la transfección como para la posterior adición de células, ya que esto tiene la ventaja, por ejemplo, de que pueden evitarse las diferentes condiciones de cultivo celular o presiones de selección de cultivo competitiva.

Preferentemente, las células se cultivan en ausencia de suero, para evitar una fuente común de contaminantes. El experto en la materia conoce diversos medios libres de suero para el cultivo de células eucariotas (por ejemplo, medio de Iscove, medio Ultra CHO (BioWhittaker), EX-CELL (JRH Biosciences)). Además, pueden utilizarse medios libres de proteínas (por ejemplo, PF-CHO (JRH Biosciences)). De lo contrario, las células para la replicación también pueden cultivarse en el medio habitual que contiene suero (por ejemplo, medio MEM o DMEM con un 0,5% a un 10% de suero de ternera fetal).

Las células hospedadoras y las células que se añaden pueden estar en cultivo adherente o en cultivo en suspensión. Por ejemplo, las células que se utilizan para la transfección pueden ser células adherentes y las células que se añaden después de la transfección también pueden ser células adherentes. Cuando las células que se añaden después de la transfección son células adherentes, resultará evidente que las células tendrán que retirarse del recipiente de cultivo en el que crecen antes de ser añadidas a las células transfectadas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, con ayuda de una serin-proteasa como la tripsina. También es posible utilizar células en suspensión como células hospedadoras para la transfección y células adherentes para la adición después de la transfección, y viceversa.

Los métodos de la invención suelen ponerse en práctica a las temperaturas de uso común en la técnica para el método de transfección específico que se utiliza. Por ejemplo, cuando se utilizan liposomas para la transfección, la reacción de transfección puede incubarse inicialmente a temperatura ambiente cuando se añade primero el complejo ADN/liposoma (por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos), seguido de incubación a aproximadamente 37°C durante un período especificado de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 24 horas). Los métodos de la invención pueden ponerse en práctica con cualquier método de transfección conocido en la técnica y por lo tanto el experto en la materia conoce las temperaturas a las que debe realizarse la transfección. Como alternativa, también es posible encontrar temperaturas de incubación adecuadas realizando varios experimentos de transfección en paralelo en condiciones idénticas salvo porque varía la temperatura de incubación durante la transfección. El número de virus recuperados es indicador de la eficacia de la transfección y puede determinarse mediante el ensayo para el

número de UFP producido, como se ha descrito anteriormente. Puede utilizarse para la transfección la temperatura que dé como resultado el mayor número de UFP.

La temperatura a la que se añaden las células a las células transfectadas y la temperatura a la que se incuba la mezcla resultante de células puede ser la misma o diferente en comparación con la temperatura utilizada durante la transfección. La temperatura puede depender de la línea celular utilizada para la adición después de la transfección y también puede variar en función del virus que se recupere utilizando los métodos de la invención. Sin embargo, las temperaturas adecuadas para el cultivo de líneas celulares individuales o la recuperación de virus concretos son conocidas en la técnica, y por lo tanto el experto en la materia puede identificar fácilmente las temperaturas adecuadas. Por ejemplo, las líneas celulares de mamífero como las líneas celulares Vero, PER.C6 y MDCK suelen cultivarse a una temperatura entre 36°C y 38°C, o aproximadamente 37°C. Esta temperatura también se elige para la recuperación de muchos virus, aunque algunos virus, como el de la gripe, pueden recuperarse a una temperatura de aproximadamente 33°C ya que esto puede dar como resultado una mejor antigenicidad del virus resultante [20]. Las temperaturas adecuadas también pueden identificarse realizando varios experimentos de transfección en paralelo en condiciones idénticas, salvo porque varía la temperatura de incubación después de la transfección. Puede utilizarse después de la transfección la temperatura que dé como resultado el mayor número de UFP. Los métodos adecuados para el ensayo en busca de UFP se han descrito anteriormente con relación a los ensayos para identificar las temperaturas que pueden utilizarse durante la transfección.

Preparación de virus

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de preparación de un virus para la fabricación de vacunas tal como se define en las reivindicaciones, que comprende las etapas de (i) transfección de un cultivo de células hospedadoras con al menos un constructo de expresión que codifica una molécula de ARN viral, (ii) adición de células a las células hospedadoras transfectadas de (i) para proporcionar una mezcla de células, (iii) cultivo de la mezcla de células con el fin de producir los virus, y (iv) purificación del virus obtenido en la etapa (iii) y opcionalmente (v) formulación del virus en una vacuna. Cuando se utilizan células como hospedador de cultivo en este aspecto de la invención, se sabe que las condiciones de cultivo celular (por ejemplo, temperatura, densidad celular, valor de pH, etc.) pueden variarse en un amplio intervalo, sujetas a la línea celular y al virus empleado y pueden adaptarse a los requisitos de la aplicación. Por tanto, la siguiente información representa simplemente unas directrices.

Como se ha mencionado anteriormente, las células se cultivan preferentemente en medios libres de suero o libres de proteínas.

La multiplicación de las células puede llevarse a cabo según métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un sistema de perfusión utilizando los métodos comunes de apoyo como la centrifugación o la filtración. Por otra parte, las células pueden multiplicarse según la invención en un sistema discontinuo alimentado ("fed-batch") antes de la infección. En el contexto de la presente invención, un sistema de cultivo es conocido como sistema discontinuo alimentado, en el que las células se cultivaron inicialmente en un sistema discontinuo y el agotamiento de los nutrientes (o parte de los nutrientes) en el medio se compensa mediante la alimentación controlada de los nutrientes concentrados. Puede resultar ventajoso ajustar el valor de pH del medio durante la multiplicación de las células antes de la infección a un valor entre pH 6,6 y pH 7,8 y, especialmente, entre un valor entre pH 7,2 y pH 7,3. El cultivo de células se produce preferentemente a una temperatura entre 30°C y 40°C. En la etapa (iii), las células se cultivan preferentemente a una temperatura de entre 30°C y 36°C o de entre 32°C y 34°C o a aproximadamente 33°C. Esto resulta especialmente preferente cuando el método de la invención se utiliza para producir virus de la gripe, ya que se ha demostrado que la incubación de las células infectadas en este intervalo de temperaturas da lugar a la producción de un virus que da como resultado una eficacia mejorada cuando se formula en una vacuna [20].

Puede ajustarse la presión parcial de oxígeno durante el cultivo antes de la infección preferentemente a un valor entre 25% y 95% y, especialmente, a un valor entre 35% y 60%. Los valores de la presión parcial de oxígeno indicados en el contexto de la invención se basan en la saturación de aire. La infección de las células se produce a una densidad celular de preferentemente aproximadamente $8-25 \times 10^5$ células/ml en el sistema discontinuo o de preferentemente aproximadamente $5-20 \times 10^6$ células/ml en el sistema de perfusión. Las células pueden infectarse con una dosis viral (valor de MOI, "multiplicidad de infección"; corresponde al número de unidades virales por célula en el momento de la infección) entre 10^{-8} y 10, preferentemente entre 0,0001 y 0,5.

El virus puede cultivarse en células en cultivo adherente o en suspensión. Pueden utilizarse cultivos en microportadores. Los cultivos en microportadores se consideran cultivos adherentes. Las células también pueden adaptarse para el crecimiento en suspensión.

Los métodos según la invención también incluyen la recolección y el aislamiento de los virus o de las proteínas generadas por ellos. Durante el aislamiento de los virus o de las proteínas, las células se separan del medio de cultivo por métodos convencionales, como separación, filtración o ultrafiltración. A continuación, los virus o las proteínas se concentran según métodos suficientemente conocidos para los expertos en la materia, como

centrifugación en gradiente, filtración, precipitación, cromatografía, etc. y, a continuación, se purifican. También resulta preferente según la invención que los virus se inactiven durante o después de la purificación. Puede producirse la inactivación de los virus, por ejemplo, mediante β -propiolactona o formaldehído en cualquier punto del proceso de purificación.

Los virus aislados según la invención también pueden cultivarse en huevos, en la etapa (iii). El método convencional actual para el cultivo del virus de la gripe para vacunas utiliza huevos de gallina SPF embrionados, purificándose el virus a partir el contenido de los huevos (fluido alantoideo). También es posible hacer pasar un virus a través de los huevos y propagarlo posteriormente en cultivo celular.

Virus

Los métodos de la invención pueden ponerse en práctica con cualquier virus que pueda expresarse mediante genética inversa en una célula. Tales virus pueden ser virus segmentados o no segmentados. Además, el virus puede ser un virus de ARN de cadena positiva o un virus de ARN de cadena negativa. El virus también puede ser un virus de ARN bicatenario.

Cuando el virus es un virus de ARN de cadena negativa, el virus puede ser de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Paramyxoviridae*, *Pneumovirinae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* o *Arenaviridae*. Además, el virus puede ser un virus de un género seleccionado del grupo que consiste en *Paramyxovirus*, *Orthomyxovirus*, *Respirovirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus*, *Avulavirus*, *Pneumovirus*, *Metapneumovirus*, *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Novirhabdovirus*, *Marburgvirus*, virus Ébola, *Bornavirus*, *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, *Isavirus*, *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Tospovirus*, *Arenavirus*, *Ophiovirus*, *Tenuivirus* o *Deltavirus*. En formas de realización específicas, el virus de ARN de cadena negativa está seleccionado del grupo que consiste en el virus Sendai, el virus del sarampión, el virus de las paperas, el virus Hendra, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus respiratorio sincicial humano, el pneumovirus aviar, el virus Indiana de la estomatitis vesicular, el virus de la rabia, el virus de la fiebre efímera bovina, el virus del amarilleamiento necrótico de la lechuga, el virus del enanismo amarillo de la patata, el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, *Marburgvirus* del Lago Victoria, el virus Ébola de Zaire, el virus de la enfermedad de Borna, el virus de la gripe, *Thogotovirus*, el virus de la anemia infecciosa del salmón, el virus Bunyamwera, el virus Hanta, el virus Dugbe, el virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus del bronceado del tomate, el virus de la coriomeningitis linfocítica, el virus de la psoriasis de los cítricos, el virus del rayado del arroz y el virus de la hepatitis delta. En las formas de realización preferentes, el virus es un virus de la gripe (véase más adelante).

Cuando el virus es un virus de ARN de cadena positiva, el virus puede ser de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Picornaviridae* y *Roniviridae*. Además, el virus puede ser un virus de un género seleccionado del grupo que consiste en *Arterivirus*, *Coronavirus*, *Enterovirus*, *Torovirus*, *Okavirus*, *Rhinovirus*, *Hepatovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kabuvirus* y *Teschovirus*. En formas de realización específicas, el virus está seleccionado del grupo que consiste en el virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), el poliovirus, el enterovirus humano A (VHE-A), el enterovirus humano B (VHE-B), el enterovirus humano C, el enterovirus humano D, la hepatitis A y el rinovirus humano A y B.

Cuando el virus es un virus de ARN bicatenario, el virus puede ser de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Birmaviridae*, *Cystaviridae*, *Hypoviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae* y *Totiviridae*. Además, el virus puede ser un virus de un género seleccionado del grupo que consiste en *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus*, *Entomobirnavirus*, *Cystovirus*, *Partivirus*, *Alphacryptovirus*, *Betacryptovirus*, *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orbivirus*, *Orthoreovirus*, *Oryzavirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus* y *Seadornavirus*.

Los virus preferentes para su uso con la invención son los rotavirus. La genética inversa con estos virus es actualmente difícil debido a la escasa eficacia de la recuperación de virus y, por lo tanto, los métodos de la invención pueden facilitar la recuperación de este virus.

La presente invención también resulta especialmente adecuada para los virus que experimentan mutación rápida y en los que el enfoque recombinante permite un aislamiento más rápido del virus, que a continuación puede propagarse adicionalmente para obtener las vacunas adecuadas. Por lo tanto, en otra forma de realización preferente, el virus es el de la gripe.

Virus de la gripe

Los virus de la gripe son especialmente adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención, especialmente los virus de la gripe A y los virus de la gripe B, ya que la genética inversa para este virus ha sido bien caracterizada. Los virus de la gripe son virus de ARN de cadena negativa segmentados. Los virus de la gripe A y B tienen ocho segmentos, mientras que el virus de la gripe C tiene siete. El virus necesita al menos cuatro proteínas virales (PB1, PB2, PA y nucleoproteína) para iniciar la replicación y la transcripción.

La genética inversa para los virus de la gripe A y B puede ponerse en práctica con 12 plásmidos para expresar las cuatro proteínas necesarias y los ocho segmentos del genoma. Sin embargo, para reducir el número de constructos, puede incluirse una pluralidad de casetes de transcripción de ARN polimerasa I (para la síntesis de ARN viral) en un solo plásmido (por ejemplo, las secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos del ARNv de la gripe), y una pluralidad de regiones codificantes de proteínas con los promotores de la ARN polimerasa II en otro plásmido (por ejemplo, las secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 transcritos de ARNm de la gripe) [21]. También es posible incluir uno o más segmentos de ARNv de la gripe bajo el control de un promotor de Pol I y una o más regiones codificantes de proteínas de la gripe bajo el control de otro promotor, en particular un promotor de Pol II, en el mismo plásmido. Como se ha descrito anteriormente, esto se realiza preferentemente utilizando plásmidos bidireccionales.

Los aspectos preferentes del método de la referencia 21 implican: (a) regiones codificantes de ARNm de PA, PB2 y PB1 en un solo plásmido, y (b) los 8 segmentos codificantes de ARNv en un solo plásmido. Resulta especialmente preferente incluir los segmentos neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) en un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido, ya que las cepas de virus de la gripe de reciente aparición suelen tener mutaciones en los segmentos NA y/o HA. Por lo tanto, en esta forma de realización, sólo es necesario reemplazar el vector que comprende la secuencia de HA y NA.

Los sistemas de expresión preferentes para los virus de la gripe A codifican segmentos de genoma derivados de una pluralidad de diferentes cepas de tipo silvestre. El sistema puede codificar 1 o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) segmentos del genoma de una cepa PR/8/34 (A/Puerto Rico/8/34), pero por lo general este/estos no incluirán el segmento HA de PR/8/34 y por lo general no incluirán el segmento NA de PR/8/34. Por lo tanto, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 (posiblemente los seis) de PR/8/34.

Otros sistemas de expresión útiles para los virus de la gripe A pueden codificar 1 o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) segmentos del genoma de un virus de la gripe AA/6/60 (A/Ann Arbor/6/60), pero por lo general este/estos no incluirán el segmento HA de AA/6/60 y por lo general no incluirán el segmento NA de AA/6/60. Por lo tanto, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 (posiblemente los seis) de AA/6/60.

El sistema puede codificar 1 o más segmentos del genoma de una cepa A/California/4/09, por ejemplo el segmento HA y/o el segmento NA. Por lo tanto, por ejemplo, el segmento del gen de la HA puede codificar una hemaglutinina H1 que está más estrechamente relacionada con la SEQ ID NO: 1 que con la SEQ ID NO: 2 (es decir, tiene un mayor grado de identidad de secuencia cuando se compara con la SEQ ID NO: 1 que con la SEQ ID NO: 2 utilizando el mismo algoritmo y los mismos parámetros). Las SEQ ID NO: 1 y 2 son idénticas en un 80%. Del mismo modo, el gen de la NA puede codificar una neuraminidasa N1 que está más estrechamente relacionada con la SEQ ID NO: 3 que con la SEQ ID NO: 4. Las SEQ ID NO: 3 y 4 son idénticas en un 82%.

Los sistemas de expresión para los virus de la gripe B pueden codificar segmentos de genoma derivados de una pluralidad de diferentes cepas de tipo silvestre. El sistema puede codificar 1 o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) segmentos del genoma de un virus de la gripe AA/1/66 (B/Ann Arbor/1/66), pero por lo general este/estos no incluirán el segmento HA de AA/1/66 y por lo general no incluirán el segmento NA de AA/1/66. Por lo tanto, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 de AA/1/66.

Las secuencias y los segmentos virales de las cepas A/PR/8/34, AA/6/60, AA/1/66, A/Chile/1/83 y A/California/04/09 son de fácil adquisición. Sus secuencias están disponibles en las bases de datos públicas, por ejemplo GI:89779337, GI:89779334, GI:89779332, GI:89779320, GI:89779327, GI:89779325, GI:89779322, GI:89779329.

Un sistema de genética inversa para el virus de la gripe puede incluir un constructo de expresión que conduzca a la expresión de una proteína accesoria en la célula hospedadora. Por ejemplo, puede resultar ventajoso expresar una serin-proteasa no viral (por ejemplo, tripsina).

Vacuna

En un aspecto, la invención utiliza el virus producido según los métodos de la invención para producir vacunas.

Las vacunas (especialmente para el virus de la gripe) se basan por lo general en virus vivos o en virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones 'fraccionados' o en antígenos de superficie purificados. Los antígenos también pueden presentarse en forma de virosomas. La invención puede utilizarse para fabricar cualquiera de estos tipos de vacuna.

Cuando se utiliza un virus inactivado, la vacuna puede comprender virus completos, virus fraccionados o antígenos de superficie purificados (para la gripe, incluida la hemaglutinina y, por lo general, que también incluye la neuraminidasa). Los medios químicos para inactivar un virus incluyen el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β -propiolactona, azul de metileno, psoraleno,

carboxifulereno (C60), etilamina binaria, acetil etilenimina o combinaciones de los mismos. En la técnica se conocen métodos no químicos de inactivación viral tales como, por ejemplo, la irradiación gamma o con luz UV.

5 Los viriones pueden recolectarse a partir de fluidos que contienen virus, por ejemplo, fluido alantoideo o sobrenadante de cultivo celular, por diversos métodos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar la centrifugación zonal utilizando una solución de gradiente lineal de sacarosa que incluye detergente para romper los viriones. A continuación, los antígenos pueden purificarse, después de la dilución opcional, mediante diafiltración.

10 Los viriones fraccionados se obtienen tratando los viriones purificados con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, tri-N-butilfosfato, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subviriones, incluido el proceso de fraccionamiento 'Tween-éter'. Los métodos de fraccionamiento de virus de la gripe, por ejemplo, son bien conocidos en la técnica, véanse por ejemplo las referencias 22-27, etc. El fraccionamiento del virus se lleva a cabo por lo general rompiendo o fragmentando el virus completo, sea infeccioso o no infeccioso, con una concentración de rotura de un agente de fraccionamiento. La rotura da como resultado una solubilización total o parcial de las proteínas víricas, que modifica la integridad del virus. Los agentes de fraccionamiento preferentes son tensioactivos iónicos y no iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, azúcares acilo, sulfobetainas, betaínas, polioxietilentalquiléteres, N,N-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, NP9, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTABs (bromuros de cetiltrimetilamonio), fosfato de tri-N-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina, y DOT-MA, los polioxietanoles octil o nonilfenoxi (por ejemplo, los tensioactivos Triton, tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietilensorbitán (los tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, etc. Un procedimiento de fraccionamiento útil utiliza los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y el formaldehído, y el fraccionamiento puede tener lugar durante la purificación inicial de viriones (por ejemplo, en una solución en gradiente de densidad de sacarosa). Por lo tanto, un proceso de fraccionamiento puede implicar el aclarado del material que contiene el virión (para eliminar el material distinto de virión), la concentración de los viriones recolectados (por ejemplo, utilizando un método de adsorción, tal como la adsorción en CaHPO₄), la separación de los viriones completos del material distinto de virión, el fraccionamiento de los viriones utilizando un agente de fraccionamiento en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, utilizando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de fraccionamiento tal como desoxicolato de sodio), y a continuación filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar los materiales no deseados. Los viriones fraccionados pueden resuspenderse de manera provechosa en solución de cloruro sódico isotónica tamponada con fosfato de sodio. Algunos ejemplos de vacunas antigripales de subunidades son los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™.

35 El método de la invención también puede utilizarse para producir vacunas vivas. Tales vacunas suelen prepararse purificando viriones a partir de fluidos que contienen los viriones. Por ejemplo, los fluidos pueden aclararse por centrifugado y estabilizarse con tampón (por ejemplo, que contenga sacarosa, fosfato de potasio y glutamato monosódico). Actualmente están disponibles diversas formas de la vacuna antigripal (por ejemplo, véanse los capítulos 17 y 18 de la referencia 28). Los virus vivos incluyen los productos FLUMIST™ de MedImmune (virus vivos trivalentes).

40 Las vacunas antigripales de antígenos de superficie purificadas comprenden los antígenos de superficie hemaglutinina y, por lo general, también neuraminidasa. Los procesos de preparación de estas proteínas en forma purificada son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™ son vacunas antigripales de subunidades.

50 Otra forma de antígeno inactivado es el virosoma [29] (partículas liposomales similitricas libres de ácidos nucleicos). Los virosomas pueden prepararse por solubilización del virus con un detergente seguido de la eliminación de la nucleocápside y la reconstitución de la membrana que contiene las glicoproteínas virales. Un método alternativo de preparación de virosomas implica la adición de glicoproteínas de la membrana viral a cantidades en exceso de fosfolípidos, para proporcionar liposomas con proteínas virales en su membrana.

55 El virus puede ser atenuado. El virus puede ser sensible a la temperatura. El virus puede estar adaptado al frío. Estas tres características resultan especialmente útiles cuando se utiliza como antígeno un virus vivo.

60 HA es el principal inmunógeno en las vacunas antigripales inactivadas actuales, y las dosis de vacuna están estandarizadas por referencia a los niveles de HA, medidos por lo general mediante SRID. Las vacunas existentes suelen contener aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque pueden utilizarse dosis menores por ejemplo, para los niños, o en situaciones de pandemia, o cuando se utiliza un adyuvante. Se han utilizado dosis fraccionadas tales como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅛, así como dosis mayores (por ejemplo, dosis 3x ó 9x [30,31]). Por lo tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 µg y 150 µg de HA por cepa gripal, preferentemente entre 0,1 µg y 50 µg, por ejemplo, 0,1 µg-20 µg, 0,1 µg-15 µg, 0,1 µg-10 µg, 0,1 µg-7,5 µg, 0,5 µg-5 µg, etc. Las dosis concretas incluyen por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. por cepa.

Para las vacunas vivas, la dosificación se mide por la dosis infecciosa media en cultivo tisular (TCID₅₀) más que el contenido de HA, y es típica una TCID₅₀ de entre 10⁶ y 10⁸ (preferentemente entre 10^{6,5}-10^{7,5}) por cepa.

5 Las cepas gripales utilizadas con la invención pueden tener una HA natural tal como se encuentra en un virus de tipo silvestre, o una HA modificada. Por ejemplo, es conocida la modificación de HA para eliminar los determinantes (por ejemplo, regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión de HA1/HA2) que hacen que un virus sea altamente patógeno en especies de aves. El uso de la genética inversa facilita tales modificaciones.

10 Las cepas de virus de la gripe para su uso en vacunas cambian de estación a estación. En los períodos interpandémicos, las vacunas incluyen por lo general dos cepas de gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de gripe B, y son típicas las vacunas trivalentes. La invención también puede utilizar cepas virales pandémicas (por ejemplo, cepas para las que el receptor de la vacuna y la población humana en general no han desarrollado anticuerpos, en particular del virus de la gripe A), tales como cepas del subtipo H2, H5, H7 o H9, y las vacunas antigripales para cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal complementada por una cepa pandémica. Sin embargo, dependiendo de la estación y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, la invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de HA: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de NA del virus de la gripe A: N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9.

20 Además de ser adecuadas para la inmunización contra las cepas interpandémicas, las composiciones de la invención resultan especialmente útiles para la inmunización contra las cepas pandémicas o potencialmente pandémicas. Las características de una cepa gripal que le proporcionan la capacidad de provocar una pandemia son: (a) que incluya una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en cepas humanas que circulan en la actualidad, es decir, una que no se ha manifestado en la población humana durante más de una década (por ejemplo, H2), o que nunca se ha observado anteriormente en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que por lo general sólo se han encontrado en las poblaciones de aves), de manera que la población humana no habrá desarrollado anticuerpos contra la hemaglutinina de la cepa; (b) que sea capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana, y (c) que sea patógena para los seres humanos. Para la inmunización contra la gripe pandémica resulta preferente un virus con el tipo de hemaglutinina H5, tal como una cepa H5N1. Otras cepas posibles son H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y otras cepas cualesquiera potencialmente pandémicas emergentes. La invención resulta especialmente adecuada para la protección contra las posibles cepas pandémicas de virus que pueden propagarse o se han propagado desde una población de animales no humanos a los seres humanos, por ejemplo, una cepa de gripe H1N1 de origen porcino. La invención es entonces adecuada para la vacunación de seres humanos así como de animales no humanos.

35 Otras cepas cuyos antígenos pueden incluirse de manera provechosa en las composiciones son cepas que son resistentes al tratamiento antiviral (por ejemplo, resistentes al oseltamivir [32] y/o al zanamivir), incluidas las cepas pandémicas resistentes [33].

40 Las composiciones de la invención pueden incluir antígeno(s) de una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la gripe, incluido el virus de la gripe A y/o el virus de la gripe B. Cuando una vacuna incluye más de una cepa gripal, las diferentes cepas se cultivan por lo general por separado y se mezclan una vez los virus han sido recolectados y los antígenos preparados. Por lo tanto, un proceso de la invención puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa gripal. Es típica una vacuna trivalente, que incluye antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B. También resulta útil una vacuna tetravalente [34], que incluye antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y dos cepas de virus de la gripe B, o tres cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

50 **Composiciones farmacéuticas**

Las composiciones de vacuna fabricadas según la invención son farmacéuticamente aceptables. Suelen incluir componentes además de los antígenos, por ejemplo, incluyen por lo general uno o más vehículos farmacéuticos y/o excipientes. Como se describe más adelante, también pueden incluirse adyuvantes. Se dispone de un análisis detallado de tales componentes en la referencia 35.

55 Las composiciones de vacuna estarán generalmente en forma acuosa. Sin embargo, algunas vacunas pueden estar en forma seca, por ejemplo, en forma de sólidos inyectables o preparaciones secas o polimerizadas en un parche.

60 Las composiciones de vacuna pueden incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, resulta preferente que la vacuna esté prácticamente libre (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo libre de tiomersal [26,36]. Resultan más preferentes las vacunas que no contienen mercurio. Puede incluirse succinato de α-tocoferol como una alternativa a los compuestos mercuriales [26]. Resultan especialmente preferentes las vacunas sin conservantes.

65

Para controlar la tonicidad, resulta preferente incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Resulta preferente el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente en una cantidad entre 1 mg/ml y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico dihidrato, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Las composiciones de vacuna tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferentemente estará incluida en el intervalo comprendido entre 290-310 mOsm/kg. Se ha informado con anterioridad que la osmolalidad no tiene impacto sobre el dolor causado por la vacunación [37], pero sin embargo, resulta preferente mantener la osmolalidad en este intervalo.

Las composiciones de vacuna pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato, un tampón de histidina (especialmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio) o un tampón de citrato. Por lo general los tampones se incluyen en el intervalo de 5 mM-20 mM.

El pH de una composición de vacuna estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más generalmente entre 6,0 y 8,0 por ejemplo, 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Por consiguiente, un proceso de la invención puede incluir una etapa de ajuste del pH de la vacuna a granel antes del envasado.

La composición de vacuna es preferentemente estéril. La composición de vacuna es preferentemente apirógena, conteniendo por ejemplo < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, < 0,1 UE por dosis. La composición de la vacuna está preferentemente libre de gluten.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden incluir detergente, por ejemplo un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitán (conocido como "Tweens"), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetil trimetil amonio ('CTAB') o desoxicolato de sodio, especialmente para una vacuna de subunidades o de antígeno de superficie. El detergente puede estar presente sólo en cantidades traza. Por lo tanto, la vacuna puede incluir menos de 1 mg/ml de cada uno de octoxinol-10 y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades traza pueden ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

Una composición de vacuna puede incluir material para una sola inmunización o puede incluir material para inmunizaciones múltiples (es decir, un kit 'multidosis'). En los dispositivos multidosis resulta preferente incluir un conservante. Como alternativa a (o además de) la inclusión de un conservante en las composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tenga un adaptador aséptico para la eliminación de material.

Las vacunas antigripales se administran por lo general en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse a los niños media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml).

Las composiciones y los kits se almacenan preferentemente a una temperatura entre 2°C y 8°C. No deben congelarse. Lo ideal es mantenerlos alejados de la luz directa.

ADN de la célula hospedadora

Cuando se ha aislado el virus y/o se ha cultivado en una línea celular, es una práctica convencional minimizar la cantidad de ADN residual de la línea celular en la vacuna final, con el fin de minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN.

Por lo tanto, una composición de vacuna preparada según la invención contiene preferentemente menos de 10 ng (preferentemente menos de 1 ng, y más preferentemente menos de 100 pg) de ADN residual de la célula hospedadora por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades traza del ADN de la célula hospedadora

Resulta preferente que la longitud media de cualquier ADN residual de la célula hospedadora sea inferior a 500 pb, por ejemplo, inferior a 400 pb, inferior a 300 pb, inferior a 200 pb, inferior a 100 pb, etc.

El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna utilizando procedimientos convencionales de purificación, por ejemplo cromatografía, etc. La eliminación del ADN residual de la célula hospedadora puede potenciarse mediante tratamiento con nucleasas, por ejemplo utilizando una ADNasa. Un método conveniente para reducir la contaminación por ADN de la célula hospedadora se describe en las referencias 38 y 39, e implica un tratamiento en dos etapas, primero utilizando una ADNasa (por ejemplo, Benzonase), que puede utilizarse durante el crecimiento viral, y a continuación un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede utilizarse durante la rotura de los viriones. También puede utilizarse el tratamiento con un agente alquilante, tal como β-propiolactona para eliminar el ADN de la célula hospedadora, y también puede utilizarse de manera ventajosa para inactivar los viriones [40].

Adyuvantes

Las composiciones de la invención pueden incluir ventajosamente un adyuvante, que puede actuar para potenciar las respuestas inmunitarias (humoral y/o celular) inducidas en un sujeto que recibe la composición. Los adyuvantes preferentes comprenden emulsiones de aceite-en-agua. Se conocen varios de tales adyuvantes, y por lo general incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el o los aceites y tensioactivos biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente inferiores a 5 µm de diámetro, y lo ideal es que tengan un diámetro inferior a la micra, consiguiéndose estos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Resultan preferentes las gotitas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

La emulsión puede comprender aceites tales como los de una fuente vegetal o animal (tal como el pescado). Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más disponibles habitualmente, ejemplifican los aceites de frutos. Puede utilizarse aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el de más fácil adquisición, pero también puede utilizarse el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticual y similares. Pueden prepararse ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no están presentes de forma natural en los aceites de semillas, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de los aceites de frutos y de semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por tanto, pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros a partir de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena tal como el espermaceti ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden utilizarse en el presente documento. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que resulta especialmente preferente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferente. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, son de fácil adquisición en fuentes comerciales o pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica. Otro aceite preferente es el α-tocoferol (véase más adelante).

Pueden utilizarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferentes de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente de al menos 15 y más preferentemente de al menos 16. La invención puede utilizarse con tensioactivos, incluidos pero no limitados a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (comúnmente conocidos como los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), que se venden con el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque de EP/PO lineales; octoxinolos, que pueden variar en el número de grupos de etoxi que se repiten (oxi-1,2-etanodiol), siendo de especial interés el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los SPAN), tal como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Resultan preferentes los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferentes para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

Pueden utilizarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. También resulta adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitán tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilensorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades preferentes de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tal como Tween 80) del 0,01% al 1%, en particular aproximadamente al 0,1%; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (tal como Triton X-100 u otros detergentes en la serie Triton) del 0,001% al 0,1%, en particular del 0,005% al 0,02%; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) del 0,1% al 20%, preferentemente del 0,1% al 10% y en particular del 0,1% al 1% o aproximadamente al 0,5%.

Cuando la vacuna contiene un virus fraccionado, resulta preferente que contenga tensioactivo libre en la fase acuosa. Esto resulta ventajoso, ya que el tensioactivo libre puede ejercer un "efecto de fraccionamiento" en el antígeno, rompiendo de esta manera cualquier agregado de viriones y/o virión no fraccionado que de lo contrario podría estar presente. Esto puede mejorar la seguridad de las vacunas de virus fraccionados [41].

Las emulsiones preferentes tienen un tamaño medio de gotita de $< 1 \mu\text{m}$, por ejemplo, $\leq 750 \text{ nm}$, $\leq 500 \text{ nm}$, $\leq 400 \text{ nm}$, $\leq 300 \text{ nm}$, $\leq 250 \text{ nm}$, $\leq 220 \text{ nm}$, $\leq 200 \text{ nm}$, o menores. Estos tamaños de gotita pueden conseguirse de manera práctica mediante técnicas tales como la microfluidización.

- 5 Los adyuvantes específicos de emulsión de aceite-en-agua útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:
- 10 • Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de escualeno aproximadamente al 5%, polisorbato 80 aproximadamente al 0,5% y Span 85 aproximadamente al 0,5%. En términos de peso, estas relaciones se convierten en escualeno al 4,3%, polisorbato 80 al 0,5% y Span 85 al 0,48%. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [42-44], como se describe con más detalle en el capítulo 10 de la referencia 45 y en el capítulo 12 de la referencia 46. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.
- 15 • Una emulsión de escualeno, DL- α -tocoferol y polisorbato 80 (Tween 80). La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener escualeno del 2% al 10%, tocoferol del 2% al 10% y Tween 80 del 0,3% al 3%, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 , ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el Tween 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5:2 o en una relación en peso de aproximadamente 11:5. Puede hacerse una de tales emulsiones disolviendo Tween 80 en PBS para proporcionar una solución al 2%, a continuación mezclando 20 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), a continuación microfluidificando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro medio de entre 100 nm y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm. 25 La emulsión también puede incluir un monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5 mg-10 mg de escualeno, 0,5 mg-11 mg de tocoferol, y 0,1 mg-4 mg de polisorbato 80 [47].
- 30 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.
- 35 • Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 $\mu\text{g/ml}$ de polisorbato 80, 110 $\mu\text{g/ml}$ de Triton X-100 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes proveniente de los antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
- 40 • Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [48] (Thr-MDP al 0,05%-1%, escualano al 5%, Pluronic L121 al 2,5% y polisorbato 80 al 0,2%). También puede utilizarse sin la Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [49] (escualano al 5%, Pluronic L121 al 1,25% y polisorbato 80 al 0,2%). Resulta preferente la microfluidización.
- 45 • Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de alquil éter de polioxietileno (por ejemplo, polioxietileno (12) éter cetosteárico) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monooleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos un 90% de gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [50]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol, un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa) y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [51]. Tales emulsiones pueden estar liofilizadas.
- 50 • Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [52]. La concentración final (peso) de estos componentes en las vacunas con adyuvante son escualeno al 5%, poloxámero 105 al 4% (poliol plurónico) y Abil-Care 85 al 2% (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).
- 55 • Una emulsión que tiene un 0,5%-50% de un aceite, un 0,1%-10% de un fosfolípido y un 0,05%-5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 53, los componentes fosfolipídicos preferentes son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Resultan ventajosos los tamaños de gotita submicrométricos.
- 60 • Una emulsión submicrométrica de aceite-en-agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la
- 65

referencia 54, producido por adición de una amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetili-dioctadecil-amonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.

- 5
- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, colesterol) están asociados en forma de micelas helicoidales [55].
- 10
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [56].
- 15
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [56].

20

En algunas formas de realización puede mezclarse una emulsión con el antígeno de manera extratempórea, en el momento de la administración, y por lo tanto el adyuvante y el antígeno pueden guardarse por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para la formulación final en el momento de uso. En otras formas de realización se mezcla una emulsión con el antígeno durante la fabricación, y por lo tanto la composición se envasa en una forma líquida con adyuvante. El antígeno estará generalmente en forma acuosa, de manera que la vacuna se prepara finalmente mezclando dos líquidos. La relación en volumen de los dos líquidos para la mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero es generalmente de aproximadamente 1:1. Cuando se dan las concentraciones de los componentes en las anteriores descripciones de emulsiones específicas, estas concentraciones son por lo general para una composición sin diluir y por lo tanto, la concentración disminuirá después de la mezcla con una solución de antígeno.

25

Envasado de las composiciones de vacuna

30

Los recipientes adecuados para las composiciones de la invención (o componentes de kit) incluyen viales, jeringas (por ejemplo, jeringas desechables), aerosoles nasales, etc. Estos recipientes deben ser estériles.

35

Cuando una composición/componente se encuentra en un vial, el vial está hecho preferentemente de un material de vidrio o de plástico. El vial se esteriliza preferentemente antes de añadir al mismo la composición. Para evitar problemas con los pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferentemente con un tapón sin látex, y resulta preferente la ausencia de látex en todo el material de envasado. El vial puede incluir una sola dosis de vacuna o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), por ejemplo 10 dosis. Los viales preferentes están hechos de vidrio incoloro.

40

Un vial puede tener una tapa (por ejemplo, un cierre Luer) adaptada de manera que pueda insertarse en la tapa una jeringa precargada, pueda expulsarse en el vial el contenido de la jeringa (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en el mismo) y pueda devolverse a la jeringa el contenido del vial. Después retirar la jeringa del vial, a continuación puede insertarse una aguja y puede administrarse la composición a un paciente. El tapón está situado preferentemente dentro de un sello o cubierta, de manera que tenga que retirarse el sello o la cubierta antes de acceder a la tapa. Un vial puede tener una tapa que permita la eliminación aséptica de su contenido, especialmente los viales multidosis.

45

50

Cuando un componente está envasado en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a ella. Si la aguja no está unida, puede suministrarse con la jeringa una aguja separada para su montaje y uso. Una aguja de este tipo puede estar protegida. Resultan preferentes las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 25 mm de calibre 23, de 25 mm de calibre 25 y de 16 mm de calibre 25. Las jeringas pueden estar provistas de etiquetas despegables en las que pueden estar impresos el número de lote, la temporada de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos, para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo en la jeringa tiene preferentemente un tope para evitar que se extraiga accidentalmente el émbolo durante la aspiración. Las jeringas pueden tener un émbolo y/o un tapón de goma látex. Las jeringas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringa tendrá generalmente un protector para sellar la punta antes de la unión a una aguja, y el protector está hecho preferentemente de un caucho de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado, entonces la aguja va equipada preferentemente con un capuchón de caucho de butilo. Las jeringas preferentes son las comercializadas con el nombre comercial "Tip-Lok"™.

55

60

Los recipientes pueden estar marcados para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo para facilitar la administración a los niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestre un volumen de 0,25 ml.

65

Cuando se utiliza un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringa o un vial), entonces resulta preferente utilizar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato más que de un vidrio sódico-cálcico.

Un kit o composición puede envasarse junto con (por ejemplo, en la misma caja) un folleto con información sobre la vacuna por ejemplo, instrucciones para su administración, información sobre los antígenos de la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, por ejemplo para tener rápidamente disponible una solución de adrenalina en caso de reacción anafiláctica tras la vacunación, etc.

5

Métodos de tratamiento, y administración de la vacuna

La invención proporciona una vacuna fabricada según la invención. Estas composiciones de vacuna resultan adecuadas para la administración a sujetos humanos o animales no humanos, tales como cerdos, y la invención proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administración al sujeto de una composición de la invención. La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como medicamento, y proporciona el uso de una composición de la invención para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

10

La respuesta inmunitaria provocada por estos métodos y su uso incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los métodos para evaluar las respuestas de anticuerpos, la capacidad de neutralización y la protección tras la vacunación antigripal son bien conocidos en la técnica. Los estudios en seres humanos han demostrado que los títulos de anticuerpos contra hemaglutinina del virus de la gripe humana se correlacionan con la protección (un título de inhibición de la hemaglutinación en una muestra de suero de aproximadamente 30-40 proporciona una protección de aproximadamente un 50% frente a la infección por un virus homólogo) [57]. Las respuestas de anticuerpos se miden por lo general mediante la inhibición de la hemaglutinación, mediante microneutralización, mediante inmunodifusión radial simple (SRID) y/o mediante hemólisis radial simple (SRH). Estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

15

20

Las composiciones de la invención pueden administrarse de diversas maneras. La vía de inmunización más preferente es mediante inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o en la pierna), pero otras vías disponibles incluyen la inyección subcutánea, intranasal [58-60], oral [61], intradérmica [62,63], transcutánea, transdérmica [64], etc.

25

Las vacunas preparadas según la invención pueden utilizarse para tratar tanto niños como adultos. Actualmente se recomiendan las vacunas antigripales para su uso en la inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6 meses. Por lo tanto, un sujeto humano puede ser menor de 1 año, tener de 1 a 5 años, de 5 a 15 años, de 15 a 55 años, o al menos 55 años de edad. Los sujetos preferentes para recibir las vacunas son las personas de edad avanzada (por ejemplo, ≥ 50 años, ≥ 60 años, y preferentemente ≥ 65 años de edad), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), los sujetos hospitalizados, los personal sanitario, personal militar y de servicio armado y, las mujeres embarazadas, los enfermos crónicos, los sujetos inmunodeficientes, los sujetos que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un compuesto de oseltamivir o zanamivir; véase más adelante) en los 7 días anteriores a recibir la vacuna, las personas con alergia al huevo y las personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no resultan adecuadas únicamente para estos grupos y pueden utilizarse de manera más general en una población. Para las cepas pandémicas, resulta preferente la administración a todos los grupos de edad.

30

35

40

Las composiciones preferentes de la invención satisfacen 1, 2 ó 3 de los criterios de eficacia del CPMP. En los adultos (18-60 años), estos criterios son: (1) $\geq 70\%$ de seroprotección, (2) $\geq 40\%$ de seroconversión y/o (3) un aumento del GMT de $\geq 2,5$ veces. En personas de edad avanzada (> 60 años), estos criterios son: (1) $\geq 60\%$ de seroprotección, (2) $\geq 30\%$ de seroconversión y/o (3) un aumento del GMT de ≥ 2 veces. Estos criterios se basan en estudios sin enmascaramiento con un mínimo de 50 pacientes.

45

El tratamiento puede ser mediante un régimen monodosis o un régimen multidosis. Pueden utilizarse dosis múltiples en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de vacunación de refuerzo. En un régimen multidosis las diversas dosis pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo, sensibilización parenteral y refuerzo por vía mucosa, sensibilización por vía mucosa y refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (por lo general dos dosis) resulta especialmente útil en pacientes que no han desarrollado anticuerpos, por ejemplo para las personas que nunca han recibido una vacuna antigripal antes, o para la vacunación contra un nuevo subtipo de HA (como en un brote pandémico). Las dosis múltiples se administrarán por lo general con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

50

55

Las vacunas producidas mediante la invención pueden administrarse a los pacientes prácticamente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud o centro de vacunación) que otras vacunas, por ejemplo prácticamente al mismo tiempo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna antitetánica, una vacuna antipertussis, una vacuna DTP, una vacuna conjugada contra *H. influenzae* de tipo b, una vacuna antipoliomielítica inactivada, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada antimeningocócica (tal como una vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una

60

65

vacuna contra el virus respiratorio sincicial, una vacuna conjugada antineumocócica, etc. La administración prácticamente al mismo tiempo que una vacuna antineumocócica y/o una vacuna antimeningocócica resulta especialmente útil en pacientes de edad avanzada.

5 De manera similar, las vacunas de la invención pueden administrarse a los pacientes prácticamente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud) que un compuesto antiviral y, en particular, un compuesto antiviral activo contra el virus de la gripe (por ejemplo, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de la neuraminidasa, tales como un ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-
10 2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluidos ésteres de los mismos (por ejemplo, los ésteres etílicos) y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de fosfato). Un antiviral preferente es el ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster de etilo, fosfato (1:1), también conocido como oseltamivir fosfato (TAMIFLU™).

15 **General**

La expresión "que comprende" abarca "incluido/a", así como "que consiste", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

20 El término "prácticamente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "prácticamente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término "prácticamente" puede omitirse de la definición de la invención.

25 El término "aproximadamente" con relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x + 10%.

A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende una etapa de mezcla de dos o más componentes no necesita ningún orden de mezcla específico. Por lo tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando haya tres componentes, entonces pueden combinarse entre sí dos componentes, y a continuación puede combinarse la combinación con el tercer componente, etc.

30 Cuando en el cultivo de células se utilicen materiales animales (y especialmente bovinos), éstos deben obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), y, en particular, libres de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, resulta preferente cultivar las células en ausencia total de materiales derivados de animales.

35 Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede sustituirse, como alternativa, por un profármaco adecuado.

40 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

45 Figura 1: Representación esquemática de una forma de realización de la presente invención; se siembran células en suspensión MDCK 33016 (cultivadas en CDM) en una placa de 6 pocillos A (en DMEM o medio libre de suero + FBS al 5%); B: co-transfección de MDCK 33016; C: lavado 2x, cambio de DMEM libre de suero, + trypzean, +/- células MDCK no infectadas de nueva aportación; D: virus RG.

50 Figura 2: Eficacia de recuperación del virus de la gripe en células MDCK 33016 utilizando el esqueleto de PR8-A/CA; el eje Y muestra el título infeccioso (UFF/ml); los recuadros vacíos muestran los resultados con PR8-A/CA y suero al 5% y los recuadros sombreados muestran los resultados con PR8-A/CA y sin suero; A indica que se añadieron células no infectadas de nueva aportación; B indica que no se añadieron células no infectadas de nueva aportación.

55 Figura 3: Eficacia de recuperación del virus de la gripe en células MDCK 33016 utilizando el esqueleto de A/WSN/33; el eje Y muestra el título infeccioso (UFF/ml); los recuadros vacíos muestran los resultados con WSN y suero al 5% y los recuadros sombreados muestran los resultados con WSN y sin suero; A indica que se añadieron células no infectadas de nueva aportación; B indica que no se añadieron células no infectadas de nueva aportación.

60 Figura 4: Eficacia de recuperación del virus de la gripe en células MDCK 33016 utilizando el esqueleto de PR8-WSN, el eje Y muestra las UFF/ml; los recuadros vacíos muestran los resultados con PR8-WSN y suero al 5% y los recuadros sombreados muestran los resultados con PR8-WSN y sin suero; A indica que se añadieron células no infectadas de nueva aportación; B indica que no se añadieron células no infectadas de nueva aportación.

65

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION*Recuperación de virus*

Se cultivaron en suspensión células MDCK 33016 en medios CDM a una temperatura de 37°C. Un día antes de la transfección se sembraron 6×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos CELL-BIND™ en 2 ml de medio DMEM con STF al 5%. En un experimento paralelo, las células se sembraron en ausencia de STF. Las células se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se transfectaron las células sembradas con reactivo de transfección Lipofectamine™ LTX Plus utilizando el protocolo del fabricante. En resumen, se diluyó 1 µg de cada plásmido (PA, PB1, PB2, NP, NS, M, HA, NA más TMRSS2) en 500 µl de medio DMEM libre de suero. Se añadieron 10 µl de reactivo Plus directamente al ADN diluido. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual se añadieron a ella 25 µl de Lipofectamine. A continuación, se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación se añadió el complejo de reactivo de transfección:ADN a las células, gota a gota. Las células se incubaron posteriormente a 37°C durante 24 horas.

Tras la incubación, se aspiró el medio de las células y se añadió a cada pocillo una suspensión de 4×10^5 células MDCK 33016 en medio DMEM libre de suero que contenía una dilución 1:2.000 de Trypzean™ (1 mg/ml de solución madre). En un experimento paralelo, se añadió a las células transfectadas una dilución 1:2.000 de Trypzean™ (1 mg/ml de solución madre) sola, es decir, sin adición de células. A continuación, se incubaron las células a 37°C durante otras 48 horas o hasta que se lisaron las células, después de lo cual se determinó el título viral utilizando un ensayo de formación de focos.

Ensayos de formación de focos

Se sembraron células MDCK no infectadas a una densidad de $6,25 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 48 pocillos en 500 µl de DMEM con STF al 10%. Al día siguiente, se infectaron las células con los virus en un volumen de 100 µl-150 µl durante 2 horas a 37°C. Se infectaron las células con diversas diluciones del virus. Dos horas después de la infección, se aspiró el medio y se añadieron a cada pocillo 500 µl de DMEM con STF al 10%. Las células se incubaron a 37°C hasta el día siguiente.

24 horas después de la infección, se aspiró el medio y se lavaron las células una vez con PBS. Se añadieron a cada pocillo 500 µl de acetona al 80% en PBS enfriada en hielo seguido de incubación a 4°C durante 30 minutos. Se aspiró la mezcla de acetona y se lavaron las células una vez con PBST (PBS + Tween al 0,1%). Se añadieron a cada pocillo 500 µl de BSA al 2% en PBS seguido de incubación a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Se añadieron 500 µl de una dilución 1:6.000 de anti-NP en tampón de bloqueo seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Se aspiró la solución de anticuerpo y se lavaron las células dos veces con PBST. Se añadió el anticuerpo secundario (cabra anti-ratón) a una dilución de 1:2.000 en 500 µl de tampón de bloqueo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Se aspiró la solución de anticuerpo y se lavaron las células tres veces con PBST. Se añadieron a cada pocillo 500 µl de KPL True Blue y se incubaron durante 10 minutos. Se interrumpió la reacción aspirando el True-Blue y lavando una vez con dH₂O. Se aspiró el agua y se dejaron secar las células.

Resultados

Los resultados del ensayo de formación de focos con tres esqueletos virales diferentes se muestran en las figuras 2-4. Los resultados demuestran la eficacia de la recuperación de virus con y sin la adición de células 24 horas después de la infección. Como puede observarse, en todos los casos la eficacia de la recuperación de virus aumentó hasta tres veces en los experimentos en los que se añadieron células 24 horas después de la transfección en comparación con los experimentos en los que no se añadieron las células. Este aumento de la eficacia puede observarse con todos los esqueletos virales ensayados y en las dos condiciones, con suero y sin suero.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de la invención.

REFERENCIAS

- [1] Racaniello y Baltimore (1981) Science 214:916-919
- [2] Kaplan *et al.* (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 8424-8428
- [3] Fodor *et al.* (1999) J. Virol 73(11):9679-9682
- [4] Hoffmann *et al.* (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 11411-11416
- [5] Kobayashi *et al.* (2007) Cell Host Microbe 19;1(2):147-57
- [6] WO2009/000891
- [7] Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed., 1989, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y
- [8] Kistner *et al.* (1998) Vaccine 16:960-8.
- [9] Kistner *et al.* (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.
- [10] Bruhl *et al.* (2000) Vaccine 19:1149-58.
- [11] Pau *et al.* (2001) Vaccine 19:2716-21.
- [12] <http://www.atcc.org/>

- [13] <http://locus.umdj.edu/>
 [14] WO97/37000.
 [15] Brands *et al.* (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
 [16] Halperin *et al.* (2002) Vaccine 20:1240-7.
 5 [17] EP-A-1260581 (WO01/64846)
 [18] WO2006/071563
 [19] WO2005/113758
 [20] WO97/37001
 10 [21] Neumann *et al.* (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102: 16825-9
 [22] WO02/28422.
 [23] WO02/067983.
 [24] WO02/074336.
 [25] WO01/21151.
 [26] WO02/097072.
 15 [27] WO2005/113756.
 [28] Vaccines. (eds. Plotkins & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0
 [29] Huckriede *et al.* (2003) Methods Enzymol 373:74-91.
 [30] Treanor *et al.* (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
 [31] Keitel *et al.* (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
 20 [32] Herlocher *et al.* (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
 [33] Le *et al.* (2005) Nature 437(7062):1108.
 [34] WO2008/068631.
 [35] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [36] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
 25 [37] Nony *et al.* (2001) Vaccine 27:3645-51.
 [38] EP-B-0870508.
 [39] US 5948410.
 [40] WO2007/052163.
 [41] WO2007/052061
 30 [42] WO90/14837.
 [43] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
 [44] Podda (2001) Vaccines 19:2673-2680.
 [45] Vaccines Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN
 0-306-44867-X).
 35 [46] Vaccine Adjuvants: Reparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in
 Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [47] WO2008/043774.
 [48] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
 [49] Hariharan *et al.* (1995) Cancer Res 55:3486-9.
 40 [50] US-2007/014805.
 [51] US-2007/0191314.
 [52] Suli *et al.* (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.
 [53] WO95/11700.
 [54] Patente de EE.UU. 6.080.725.
 45 [55] WO2005/097181,
 [56] WO2006/113373,
 [57] Pottor & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.
 [58] Greenbaum *et al.* (2004) Vaccine 22:2566-77.
 [59] Zurbriggen *et al.* (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
 50 [60] Plascik (2003) J Am PharmAssoc (Wash DC), 43:728-30.
 [61] Mann *et al.* (2004) Vaccine 22:2425-9.
 [62] Halperin *et al.* (1979) Am J Public Health 69:1247-50.
 [63] Herbert *et al.* (1979) J Infect Dis 140:234-8.
 [64] Chen *et al.* (2003). Vaccine 21:2830-6.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- < 110> NOVARTIS AG
 60 < 120> MÉTODOS MEJORADOS DE GENÉTICA INVERSA PARA LA RECUPERACIÓN DE VIRUS
 < 130> P055736WO
 < 140> PCT/IB2010/
 65 < 141 > 20-10-2010

ES 2 454 815 T3

< 150> USSN 61/279.487
 < 151 > 20-10-2009

5

< 160> 4

< 170> Sequin2010, versión 1.0

10

< 210> 1
 < 211 > 566
 < 212 > PRT
 < 213 > virus de la gripe A

15

< 400 > 1

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
 50 55 60
 Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110
 Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
 130 135 140
 Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
 145 150 155 160
 Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175
 Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190
 Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205
 Tyr Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
 210 215 220
 Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

ES 2 454 815 T3

5 Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
 245 250 255
 Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
 260 265 270
 10 Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
 275 280 285
 Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
 290 295 300
 15 Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
 305 310 315 320
 Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335
 20 Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350
 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 25 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 370 375 380
 Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400
 30 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415
 Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430
 35 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445
 Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 40 Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 45 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
 515 520 525
 50 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 55 Gln Cys Arg Ile Cys Ile

60 < 210 > 2
 < 211 > 566
 < 212 > PRT
 < 213 > virus de la gripe A
 65 < 400 > 2

ES 2 454 815 T3

5 Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ser Ala Thr Asp
1 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

10 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Asn His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
50 55 60

15 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Phe Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

20 Ala Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
100 105 110

25 Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Lys His Asn
130 135 140

30 Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Lys Gly Lys Ser Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro
165 170 175

35 Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Glu Asp Gln Lys Thr Ile
195 200 205

40 Tyr Arg Lys Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Asn
210 215 220

45 Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln
225 230 235 240

Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
245 250 255

50 Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser
275 280 285

55 Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
305 310 315 320

60 Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg
325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

65

ES 2 454 815 T3

5 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380
 10 Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile
 385 390 395 400
 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys
 405 410 415
 15 Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430
 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Glu Asn
 435 440 445
 20 Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 25 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 30 Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540 545
 35 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

40 < 210 > 3
 < 211 > 469
 < 212 > PRT
 < 213 > virus de la gripe A

45 < 400 > 3

50 Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Cys Met Thr
 1 5 10 15
 Ile Gly Met Ala Asn Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile
 20 25 30
 55 Trp Ile Ser His Ser Ile Gln Leu Gly Asn Gln Asn Gln Ile Glu Thr
 35 40 45
 Cys Asn Gln Ser Val Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln
 50 55 60
 60 Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Phe Ala Ala Gly Gln Ser Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Lys Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly
 85 90 95
 65 Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly
 100 105 110

ES 2 454 815 T3

5 Asp Val Phe₁₁₅ Val Ile Arg Glu Pro₁₂₀ Phe Ile Ser Cys Ser₁₂₅ Pro Leu Glu
 Cys Arg₁₃₀ Thr Phe Phe Leu Thr₁₃₅ Gln Gly Ala Leu Leu₁₄₀ Asn Asp Lys His
 10 Ser Asn Gly Thr Ile Lys₁₅₀ Asp Arg Ser Pro Tyr₁₅₅ Arg Thr Leu Met Ser₁₆₀
 Cys Pro Ile Gly Glu₁₆₅ Val Pro Ser Pro Tyr₁₇₀ Asn Ser Arg Phe Glu₁₇₅ Ser
 15 Val Ala Trp Ser₁₈₀ Ala Ser Ala Cys His₁₈₅ Asp Gly Ile Asn Trp₁₉₀ Leu Thr
 Ile Gly Ile₁₉₅ Ser Gly Pro Asp Asn₂₀₀ Gly Ala Val Ala Val₂₀₅ Leu Lys Tyr
 20 Asn Gly₂₁₀ Ile Ile Thr Asp Thr₂₁₅ Ile Lys Ser Trp Arg₂₂₀ Asn Asn Ile Leu
 Arg Thr Gln Glu Ser Glu₂₃₀ Cys Ala Cys Val Asn₂₃₅ Gly Ser Cys Phe Thr₂₄₀
 25 Val Met Thr Asp Gly₂₄₅ Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe₂₅₅
 Arg Ile Glu Lys₂₆₀ Gly Lys Ile Val Lys₂₆₅ Ser Val Glu Met Asn₂₇₀ Ala Pro
 30 Asn Tyr His₂₇₅ Tyr Glu Glu Cys Ser₂₈₀ Cys Tyr Pro Asp Ser₂₈₅ Ser Glu Ile
 Thr Cys₂₉₀ Val Cys Arg Asp Asn₂₉₅ Trp His Gly Ser Asn₃₀₀ Arg Pro Trp Val
 35 Ser Phe Asn Gln Asn Leu₃₁₀ Glu Tyr Gln Ile Gly₃₁₅ Tyr Ile Cys Ser Gly₃₂₀
 Ile Phe Gly Asp Asn₃₂₅ Pro Arg Pro Asn Asp₃₃₀ Lys Thr Gly Ser Cys₃₃₅ Gly
 40 Pro Val Ser Ser₃₄₀ Asn Gly Ala Asn Gly₃₄₅ Val Lys Gly Phe Ser₃₅₀ Phe Lys
 Tyr Gly Asn₃₅₅ Gly Val Trp Ile Gly₃₆₀ Arg Thr Lys Ser Ile₃₆₅ Ser Ser Arg
 45 Asn Gly₃₇₀ Phe Glu Met Ile Trp₃₇₅ Asp Pro Asn Gly Trp₃₈₀ Thr Gly Thr Asp
 Asn Asn Phe Ser Ile Lys₃₉₀ Gln Asp Ile Val Gly₃₉₅ Ile Asn Glu Trp Ser₄₀₀
 50 Gly Tyr Ser Gly Ser₄₀₅ Phe Val Gln His Pro₄₁₀ Glu Leu Thr Gly Leu Asp₄₁₅
 Cys Ile Arg Pro₄₂₀ Cys Phe Trp Val Glu₄₂₅ Leu Ile Arg Gly Arg₄₃₀ Pro Lys
 55 Glu Asn Thr₄₃₅ Ile Trp Thr Ser Gly₄₄₀ Ser Ser Ile Ser Phe₄₄₅ Cys Gly Val
 Asn Ser₄₅₀ Asp Thr Val Gly Trp₄₅₅ Ser Trp Pro Asp Gly₄₆₀ Ala Glu Leu Pro
 60 Phe Thr Ile Asp Lys

< 210 > 4
 < 211 > 470
 < 212 > PRT
 < 213 > virus de la grippe A

65

ES 2 454 815 T3

< 400 > 4

5 Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Thr
1 5 10
Ile Gly Ile Ile Ser Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile
20 25 30
10 Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Ser Gln Asn His Thr Gly Ile
35 40 45
Cys Asn Gln Arg Ile Ile Thr Tyr Glu Asn Ser Thr Trp Val Asn Gln
50 55 60
15 Thr Tyr Val Asn Ile Asn Asn Thr Asn Val Val Ala Gly Lys Asp Thr
65 70 75 80
Thr Ser Val Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Arg Gly
85 90 95
20 Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly
100 105 110
Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu
115 120 125
25 Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His
130 135 140
Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Ala Leu Met Ser
145 150 155 160
30 Cys Pro Ile Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser
165 170 175
Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Met Gly Trp Leu Thr
180 185 190
35 Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asp Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr
195 200 205
Asn Gly Ile Ile Thr Glu Thr Ile Lys Ser Trp Arg Lys Arg Ile Leu
210 215 220
40 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr
225 230 235 240
Ile Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Pro Ala Ser Tyr Arg Ile Phe
245 250 255
45 Lys Ile Glu Lys Gly Lys Ile Thr Lys Ser Ile Glu Leu Asp Ala Pro
260 265 270
Asn Ser His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Thr Gly Thr Val
275 280 285
50 Met Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val
290 295 300
Ser Phe Asn Gln Asn Leu Asp Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly
305 310 315 320

60

65

ES 2 454 815 T3

5 Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Lys Asp Gly Lys Gly Ser Cys Asp
 325 330 335
 Pro Val Thr Val Asp Gly Ala Asp Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Arg
 340 345 350
 Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Asn Ser Ser Arg
 355 360 365
 10 Lys Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Asp Thr Asp
 370 375 380
 Ser Asn Phe Leu Val Lys Gln Asp Val Val Ala Met Thr Asp Trp Ser
 385 390 395 400
 15 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp
 405 410 415
 Cys Met Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Val Arg Gly Arg Pro Arg
 420 425 430
 20 Glu Gly Thr Thr Val Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly
 435 440 445
 Val Asn Ser Asp Thr Ala Asn Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu
 450 455 460
 25 Pro Phe Thr Ile Asp Lys
 465 470
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

REIVINDICACIONES

.....

- 5 1. Método de preparación de un virus que comprende las etapas de (i) transfección de un cultivo de células hospedadoras con al menos un constructo de expresión que codifica una molécula de ARN viral, (ii) adición de células a las células hospedadoras transfectadas de (i) para proporcionar una mezcla de células, en el que las células hospedadoras y las células añadidas después de la transfección son de la misma línea celular, y (iii) cultivo de la mezcla de células con el fin de producir un virus.
- 10 2. Método de preparación de un virus que comprende las etapas de (i) transfección de un cultivo de células MDCK con al menos un constructo de expresión que codifica una molécula de ARN viral, (ii) adición de células MDCK a las células MDCK transfectadas de (i) para proporcionar una mezcla de células MDCK, y (iii) cultivo de la mezcla de células MDCK con el fin de producir un virus.
- 15 3. Método de preparación de un virus para la fabricación de vacunas, que comprende las etapas de (i) transfección de un cultivo de células hospedadoras con al menos un constructo de expresión que codifica una molécula de ARN viral, (ii) adición de células a las células hospedadoras transfectadas de (i) para proporcionar una mezcla de células, en el que las células hospedadoras y las células añadidas después de la transfección son de la misma línea celular, (iii) cultivo de la mezcla de células con el fin de producir un virus, y (iv) purificación del virus obtenido en la etapa (iii).
- 20 4. Método de preparación de un virus para la fabricación de vacunas, que comprende las etapas de (i) transfección de un cultivo de células MDCK con al menos un constructo de expresión que codifica una molécula de ARN viral, (ii) adición de células MDCK a las células MDCK transfectadas de (i) para proporcionar una mezcla de células MDCK; (iii) cultivo de la mezcla de células MDCK con el fin de producir un virus, y (iv) purificación del virus obtenido en la etapa (iii).
- 25 5. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 3 en el que la célula hospedadora es una célula VERO, PER.C6 o MDCK.
- 30 6. Método según la reivindicación 2, la reivindicación 4 o la reivindicación 5 en el que la célula MDCK es la línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219).
- 35 7. Método según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o la reivindicación 5 o la reivindicación 6 cuando dependen de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente la etapa de formulación del virus purificado en la etapa (iv) en una vacuna,
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las células se cultivan en suspensión.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las células se cultivan mediante cultivo adherente.
- 45 10. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el virus es un virus segmentado.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el virus es un virus de ARN de cadena negativa.
12. Método según la reivindicación 11, en el que el virus es un virus de la gripe.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el virus es un virus de ARN bicatenario.
14. Método según la reivindicación 13, en el que el virus es un rotavirus.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la reivindicación 13, en el que el virus es un virus no segmentado.

55

60

65

FIGURA 1

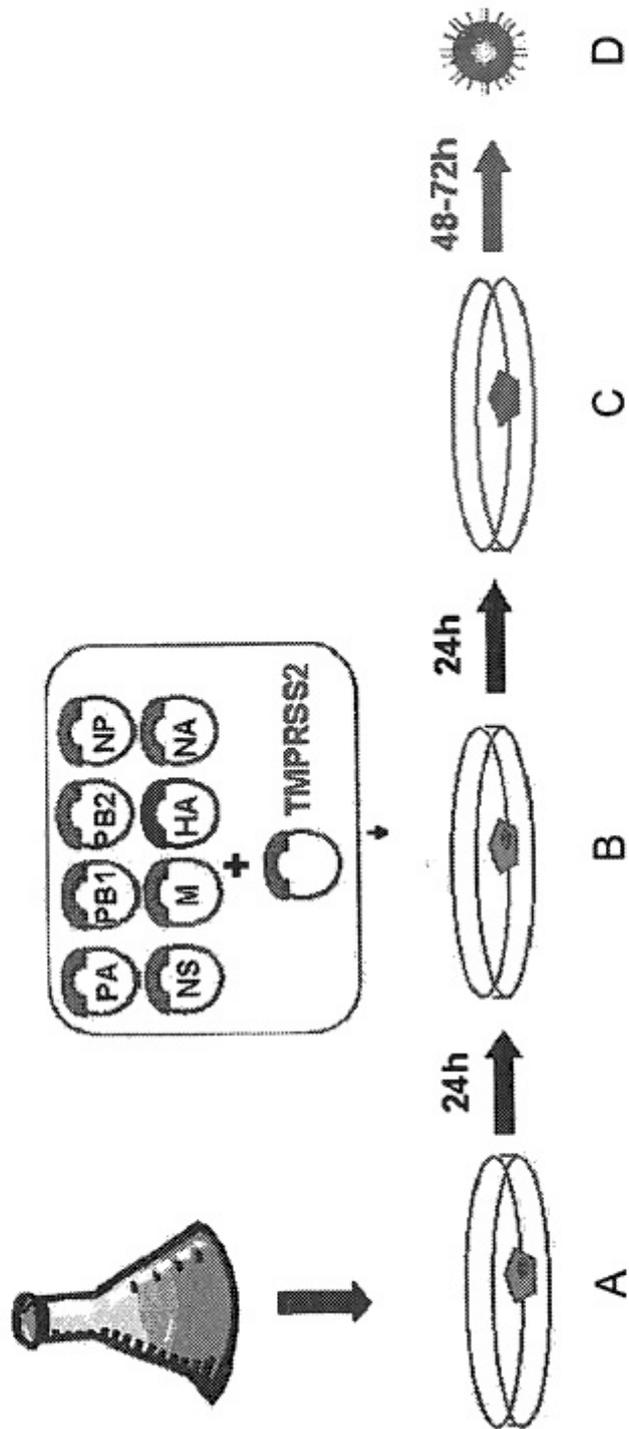


FIGURA 2

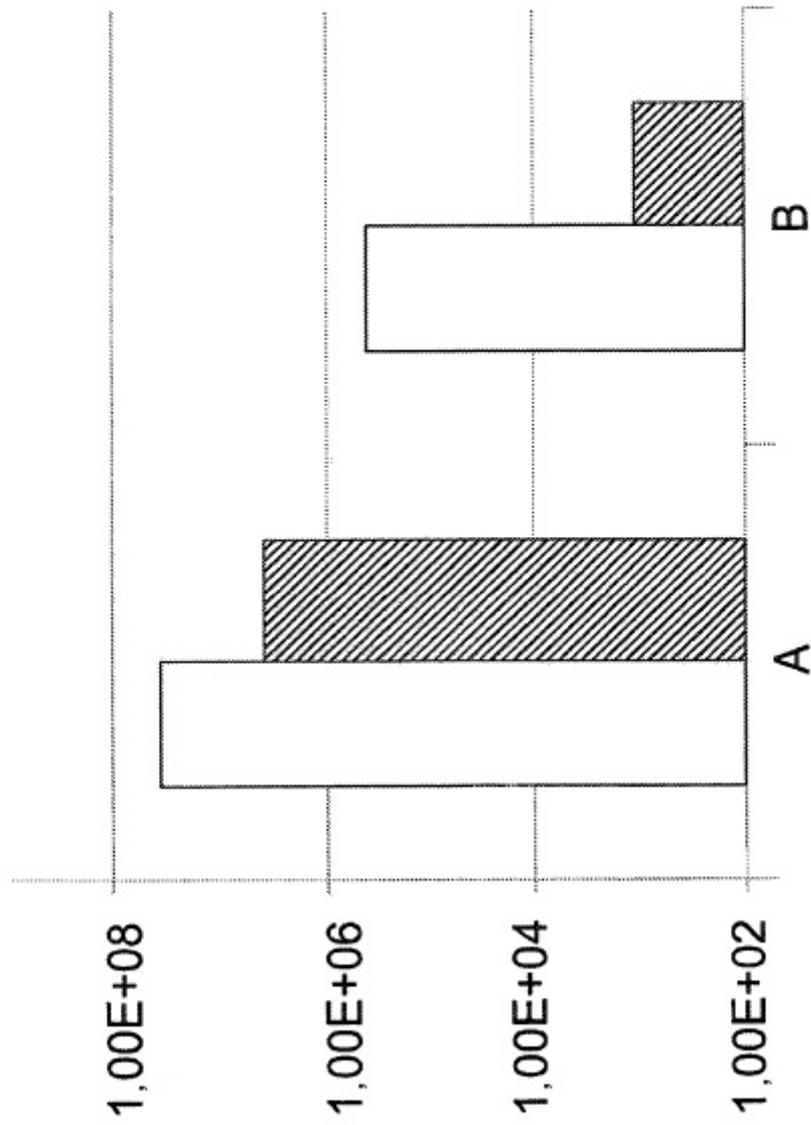


FIGURA 3

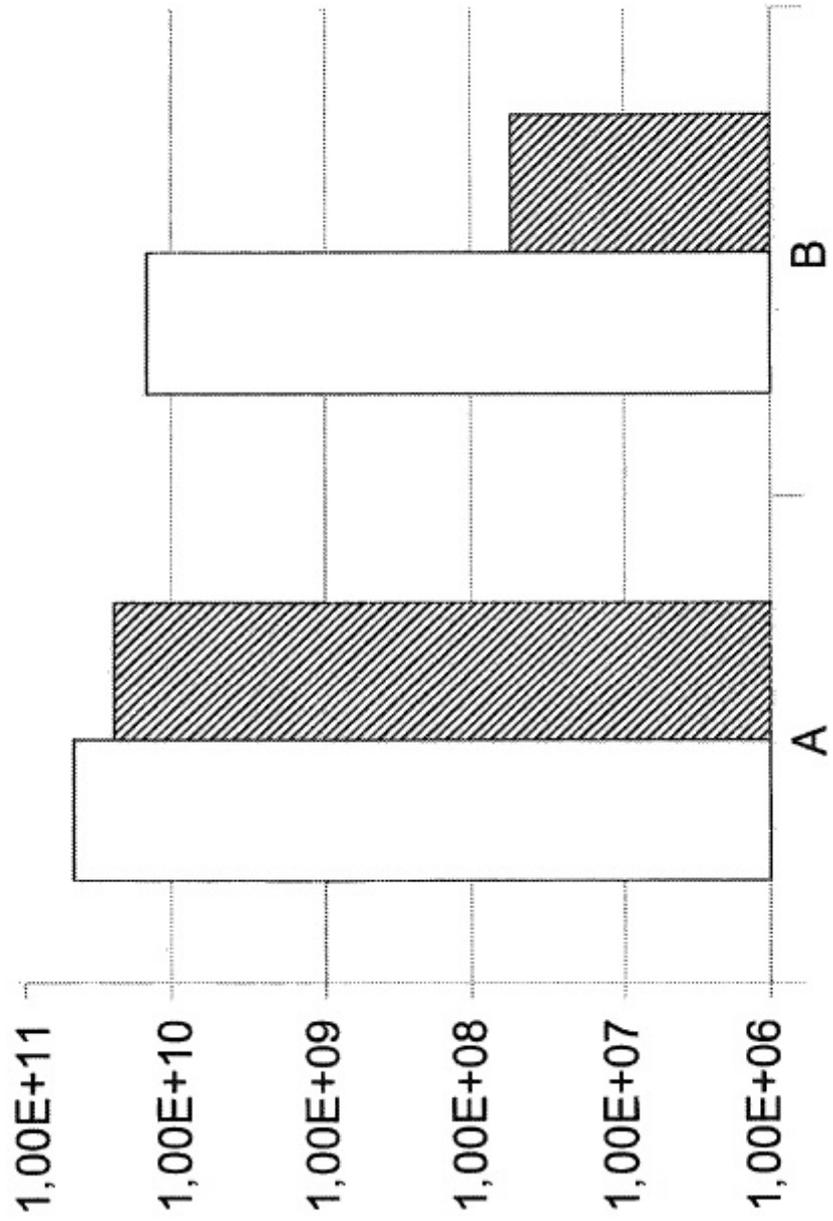


FIGURA 4

