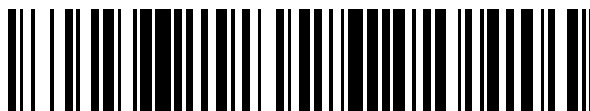


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 275**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2007** **E 07873789 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014** **EP 2069480**

54 Título: **Líneas de células MDCK que soportan el crecimiento viral hasta altos títulos y proceso de biorreactor que las usa.**

30 Prioridad:

15.09.2006 US 845121 P

22.12.2006 US 871721 P

09.05.2007 US 917008 P

25.07.2007 US 951813 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2014

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

LIU, JONATHAN;
SCHWARTZ, RICHARD;
THOMPSON, MARK;
MARANGA, LUIS;
HSU, SIMON;
GHOSH, MRIDUL y
SUBRAMANIAN, AJIT

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 473 275 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

Líneas de células MDCK que soportan el crecimiento viral hasta altos títulos y proceso de biorreactor que las usa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a células MDCK novedosas tal como se definen mediante las reivindicaciones que pueden usarse para hacer crecer virus, por ejemplo virus influenza, particularmente virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados, en cultivo celular hasta un alto título. Las células MDCK pueden adaptarse a o modificarse genéticamente para hacerse crecer en medio de cultivo libre de suero. La presente invención se refiere además a composiciones de cultivo celular que comprenden las células MDCK y a métodos de cultivo para hacer crecer las células MDCK. La presente invención se refiere además a métodos para producir virus influenza en cultivo celular usando las células MDCK de la invención. En particular la presente invención se refiere a procesos de biorreactor novedosos para hacer crecer células adherentes (por ejemplo, células MDCK) que pueden usarse para hacer crecer virus (por ejemplo, virus influenza, particularmente virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados), en cultivo celular hasta un alto título. Los procesos de biorreactor pueden utilizar medio de cultivo libre de suero.

20 **Antecedentes de la invención**

La vacunación es la medida de salud pública más importante para prevenir la enfermedad provocada por las epidemias anuales de gripe. El uso eficaz de las vacunas depende de poder producir rápidamente grandes cantidades de material de vacuna (por ejemplo, virus) a partir de una fuente estable y fácil de cultivar. El desarrollo rápido de las vacunas y su disponibilidad abundante es crítico en la lucha contra muchas enfermedades humanas y animales. Los retrasos en la producción de vacunas y los déficits en su cantidad pueden provocar problemas para abordar los brotes de enfermedad. Por ejemplo, estudios recientes sugieren que hay una causa de preocupación referente a los largos tiempos de entrega requeridos para producir vacunas contra gripe pandémica. Véase, por ejemplo, Wood, J. M., 2001, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 356:1953. Por consiguiente, los esfuerzos recientes para producir vacunas se han centrado en el crecimiento de virus de virus para vacunas en cultivo celular.

Se han usado tradicionalmente células de riñón canino Madin Darby (MDCK) para la titulación de virus influenza (Zambon M., en Textbook of Influenza, ed Nicholson, Webster y Hay, cap. 22, págs. 291-313, Blackwell Science (1998)). Estas células se establecieron en 1958 a partir del riñón de un cocker spaniel macho normal. En la ATCC figura que la línea MDCK (CCL 34) se ha depositado por S. Madin y N.B. Darby. Por ejemplo, el documento US 2006/0188977 describe una línea de células MDCK no tumorigénica seleccionada del grupo que consiste en: MDCK-S (ATCC PTA-6500); MDCK-SF111 (ATCC PTA-6501); MDCK-SF102 (ATCC PTA-6502) y MDCK-SF103 (ATCC PTA-6503). Sin embargo, las líneas de células MDCK existentes padecen varios defectos, incluyendo posible tumorigenicidad, el requisito de suero animal en cultivo celular y bajos rendimientos de virus influenza adecuados para su uso en vacunas. Por consiguiente, sigue habiendo una necesidad no satisfecha de líneas de células MDCK, preferiblemente líneas de células MDCK no tumorigénicas que puedan hacer crecer tales cepas de influenza hasta un alto título, preferiblemente, en medios libres de suero. Estas y otras necesidades no satisfechas se proporcionan por la presente invención.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La presente invención proporciona células MDCK tal como se definen mediante las reivindicaciones que pueden soportar el crecimiento de virus influenza, por ejemplo, virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados, hasta un alto título. Las células MDCK pueden hacerse crecer en formulaciones de medios o bien que contienen suero o bien libres de suero incluyendo formulaciones libres de proteínas animales (APF), pero preferiblemente crecen en formulaciones de medios libres de suero y/o APF. Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona una célula de riñón canino Madin-Darby (MCDK) identificada mediante el n.º de registro de la ATCC PTA-7909 o el n.º de registro de la ATCC PTA-7910, en la que una composición de cultivo celular que comprende una pluralidad de las células MDCK soporta la replicación de un virus influenza adaptado al frío hasta un logaritmo en base 10 de la mediana de la dosis de infección en cultivo tisular por mililitro ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml) de 7,8 o mayor o hasta un logaritmo en base 10 de unidades de focos fluorescentes por mililitro ($\log_{10}$ FFU/ml) de 7,8 o mayor. En algunas realizaciones, las células MDCK de la invención son adherentes. En otras realizaciones, las células MDCK de la invención son no adherentes (por ejemplo, pueden hacerse crecer en condiciones no adherentes). En algunas realizaciones, las células MDCK de la invención no son tumorigénicas. Las células MDCK de la invención pueden tener una morfología epitelial. Las células MDCK de la invención pueden ser adherentes y pueden tener una morfología epitelial. Las células MDCK de la invención pueden adaptarse o seleccionarse para hacerse crecer en condiciones no adherentes. En algunas realizaciones, las células MDCK de la invención son adherentes y no son tumorigénicas.

Los virus que pueden hacerse crecer en las células MDCK de la invención incluyen pero no se limitan a virus de ARN de hebra negativa, incluyendo pero sin limitarse a influenza, VRS, virus parainfluenza 1, 2 y 3, y metapneumovirus humano, así como otros virus, incluyendo virus de ADN, retrovirus, virus de ARN de hebra

positiva, virus de ARN de hebra negativa, virus de ARN bicatenarios, incluyendo, pero sin limitarse a, papovavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus vaccinia, virus de Coxsackie, reovirus, parvovirus, adenovirus, virus de la poliomielitis, virus del sarampión, virus de la rabia y virus del herpes.

5 También se describen en el presente documento métodos y formulaciones de medios útiles para la derivación, la propagación y el mantenimiento de células MDCK que pueden soportar el crecimiento de virus influenza, por ejemplo, virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados, hasta un alto título. Las células MDCK de la invención son particularmente útiles para la producción de material de vacuna tal como, por ejemplo, virus. Por consiguiente, también se describe en el presente documento una composición de cultivo celular
10 que comprende células MDCK y un medio de cultivo celular, en el que la composición de cultivo celular soporta la replicación de un virus influenza adaptado al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuado hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,0.

También se describen en el presente documento métodos de producción de material de vacuna (por ejemplo, virus)
15 cultivando cualquier célula MDCK descrita en el presente documento en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permiten la producción de material de vacuna y aislando el material de uno o más de la célula o el medio en el que se hace crecer. Por tanto, también se describe en el presente documento un método para producir virus influenza en cultivo celular, que comprende infectar una composición de cultivo celular descrita en el presente documento con un virus influenza, incubar la composición de cultivo celular en condiciones que permiten la replicación del virus influenza; y aislar virus influenza de la composición de cultivo celular.
20

También se describen en el presente documento composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, se describen en el presente documento composiciones inmunogénicas que comprenden el material de vacuna producido tal como se describió anteriormente y, opcionalmente, un excipiente tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable o uno o más componentes de administración farmacéuticamente aceptables.
25

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

Estos y otros objetos y características descritos en el presente documento resultarán más completamente evidentes
40 cuando se lea la siguiente descripción conjuntamente con el apéndice de las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 presenta una representación gráfica de las cepas de virus influenza reordenantes que comprenden
45 segmentos génicos de HA y NA de las cepas de virus influenza de tipo natural A/Panamá, A/Nueva Caledonia o B/Jilin en los clones de MDCK 1, 5, 36, 39, 40 y 55.

La figura 2 presenta una representación gráfica del crecimiento celular de los subclones de MDCK 1-A, 1-B y 1-C en medio libre de suero MediV 105.
50

La figura 3 presenta una representación gráfica de los rendimientos de cepas de virus influenza reordenantes que comprenden segmentos génicos de HA y NA de las cepas de virus influenza de tipo natural A/Nueva Caledonia/20/99, A/Hiroshima/52/05, B/Malasia/2506/04 o A/Vietnam/1203/2004 y los segmentos génicos restantes de un virus adaptado al frío, sensible a la temperatura, atenuado en los subclones de MDCK 1-A, 1-B, y 1-C 3 y 4
55 días tras la infección (DPI).

La figura 4 presenta una tabla que muestra los rendimientos de cepas de virus influenza reordenantes que comprenden segmentos génicos de HA y NA de las cepas de virus influenza de tipo natural A/Nueva Caledonia/20/99, A/Hiroshima/52/05, B/Malasia/2506/04 o A/Vietnam/ 1203/2004 y los segmentos génicos restantes de un virus adaptado al frío, sensible a la temperatura, atenuado en los subclones de MDCK 1-A, 1-B, 1-C y 1-D 3 y
60 4 días tras la infección (DPI) en medios OptiPro™ y en MediV 105.

La figura 5 presenta el diagrama de flujo de la preparación del banco de células libres de suero del subclón de MDCK 1-B. El panel A presenta las etapas de selección realizadas en medios que contienen suero. El panel B
65 presenta las etapas para la adaptación a medios libres de suero.

La figura 6 presenta el crecimiento del subclón 1-A en medios MediV 105 y M18M.

La figura 7 presenta el tiempo de duplicación del subclón 1-A en medios MediV 105 y M18M.

- 5 La figura 8 presenta una comparación de la densidad celular del subclón 1-A en medios M18M que comprenden cuatro microportadores diferentes 30 y 60 minutos tras la inoculación.

La figura 9 presenta una comparación del rendimiento celular del subclón 1-A en medios M18M que comprenden cuatro microportadores diferentes.

- 10 La figura 10 explica resumidamente un proceso de aumento a escala del cultivo celular que puede utilizarse para la producción a escala comercial de material de vacuna.

- 15 La figura 11 explica resumidamente dos procesos de purificación que pueden utilizarse para la producción a escala comercial de material de vacuna a partir de cultivo celular.

- La figura 12 presenta los resultados de la cromatografía en sulfato de Cellufine (CS) después de o en combinación con tratamiento con benzonasa. Panel A) El perfil de OD de la cromatografía en columna usando sulfato de Cellufine se muestra en el panel izquierdo, las flechas indican el momento en el que se iniciaron la carga, el lavado y la elución. La electroforesis en gel de agarosa (panel derecho) muestra que está presente el contaminante de ADN en el material de partida (carril 2) y la fracción no retenida (carril 3) pero está ausente en el material eluido de la columna (carril 4), el carril 1 es el marcador de peso molecular. El panel B) representa el esquema para la degradación de ADNbc de MDCK usando tratamiento con benzonasa en la columna.

- 25 La figura 13 presenta varias curvas del proceso de SUB de 30 l para la producción de B/Malasia/2506/04 en el subclón de MDCK 1-B. El panel superior es la curva de crecimiento de las células durante la fase de crecimiento. Los perfiles de metabolitos para glucosa (panel del medio, línea continua), lactato (panel del medio, línea discontinua), glutamina (panel inferior, línea continua) e ión amonio (panel inferior, línea discontinua) para esta ejecución se midieron mediante Bioprofile.

- 30 La figura 14 presenta los resultados de estudios piloto sin intercambio de medios para el proceso de SUB. A) Gráficos de los títulos virales obtenidos para razones de intercambio de medio de entre el 0% y el 100% a 2 y 3 dpi (superior e inferior, respectivamente). B) Gráficos del título viral pico a 2 y 3 dpi para concentraciones de TrypLE eficaces de entre 0,04 y 1. C) Gráficos de los títulos virales a lo largo del tiempo para B/Malasia/2506/04 (parte superior) y A/Vietnam/1203/2004 (parte inferior) tras la infección con (triángulos) o sin (cuadrados) intercambio de medios.

- La figura 15 representa gráficamente el título viral de A/Islas Salomón/3/06 a lo largo del tiempo (horas tras la infección) para diferentes MOI usadas. Los rendimientos virales desde 20 hasta 96 horas tras la infección están en recuadros y esta área del gráfico está ampliada a la derecha. La cosecha viral pico del cultivo infectado a 2000 FFU/ml está en círculo.

Descripción detallada de la invención

- 45 La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que pueden obtenerse líneas de células MDCK clonadas que soportan la replicación de virus influenza, particularmente virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados, hasta un alto título. Por tanto, se describen en el presente documento líneas de células MDCK que se han adaptado a una variedad de condiciones de cultivo celular, incluyendo formulaciones de medios libres de suero, que pueden soportar la replicación de virus influenza, por ejemplo, virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados, hasta un alto título y se denominan en el presente documento "células descritas en el presente documento".

- 55 Además, se describen en el presente documento composiciones de cultivo celular que comprenden células descritas en el presente documento y otros componentes, que pueden incluir, pero sin limitarse a, medios (por ejemplo, un medio dado a conocer en el presente documento), componentes de medios, tampones, compuestos químicos, tipos de células adicionales, material viral (por ejemplo, genomas virales, partículas virales) y proteínas heterólogas.

- 60 También se describen en el presente documento métodos y formulaciones de medios útiles para el cultivo de células MDCK, con una o más características específicas incluyendo pero sin limitarse a, ser no tumorigénicas (por ejemplo, que no forman nódulos en un ratón desnudo) y/o ser no oncogénicas y/o hacerse crecer como células adherentes y/o hacerse crecer como células no adherentes y/o tener una morfología de tipo epitelial y/o soportar la replicación de diversos virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus y flavovirus y/o soportar el crecimiento de virus influenza, incluyendo virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados, hasta un alto título. Las condiciones de cultivo descritas en el presente documento incluyen formulaciones de medios que contienen suero y libres de suero, así como formulaciones libres de proteínas

animales (APF).

También se describen en el presente documento métodos de producción de material de vacuna (por ejemplo, virus influenza) en células MDCK, de preparación de material de vacuna a partir de células MDCK y métodos de presentación de la infección por influenza utilizando materiales de vacunas producidos en células MDCK. Las células descritas en el presente documento son particularmente útiles para la producción de cepas de influenza adaptadas al frío/sensibles a la temperatura/atenuadas (ca/ts/att) (por ejemplo, aquéllas en FluMist®) que no se replican tan eficazmente en otras líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, PerC6®, HEK-293, MRC-5 y WI-38).

Definiciones

La tumorigenicidad, tal como se usa en el presente documento, tiene el significado habitual atribuido a este término por un experto en la técnica. La tumorigenicidad, en una realización, se determina mediante el modelo de ratón desnudo adulto (por ejemplo, Stiles *et al.*, 1976, Cancer Res, 36:1353, y ejemplo 5 más adelante). La tumorigenicidad también puede someterse a prueba mediante otros ensayos, por ejemplo, mediante inyección en un embrión de pollo y/o aplicación tópica a la membrana corioalantoidea (Leighton *et al.*, 1970, Cancer, 26:1024).

El término “recombinante” indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína) se ha alterado de manera artificial o sintética (de manera no natural) por la intervención humana. La alteración puede realizarse en el material dentro de, o retirado de, su estado o entorno natural. Específicamente, cuando se hace referencia a un virus, por ejemplo, un virus influenza, el virus es recombinante cuando se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

El término “reordenante”, cuando se hace referencia a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o de polipéptido derivados de más de una fuente o cepa viral original. Por ejemplo, un reordenante 7:1 incluye 7 segmentos genómicos virales (o segmentos génicos) derivados de un primer virus original y un único segmento genómico viral complementario, por ejemplo, que codifica para hemaglutinina o neuraminidasa, de un segundo virus original. Un reordenante 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, más comúnmente los 6 genes internos de un primer virus original, y dos segmentos complementarios, por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa, de un virus original diferente.

El término “aproximadamente”, tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un valor que está no más del 10% por encima o por debajo del valor que está modificándose mediante el término. Por ejemplo, el término “aproximadamente 5 µg/kg” significa un intervalo de desde 4,5 µg/kg hasta 5,5 µg/kg. Como otro ejemplo, “aproximadamente 1 hora” significa un intervalo de desde 54 minutos hasta 66 minutos.

Los términos “sensible a la temperatura”, “adaptado al frío” y “atenuado” se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el término “sensible a la temperatura” (“*temperature sensitive*, ts”) indica que el virus presenta una reducción de 100 veces o mayor en el título a una temperatura superior, por ejemplo, 39°C en relación con una temperatura inferior, por ejemplo, 33°C para cepas de influenza A, y que el virus presenta una reducción de 100 veces o mayor en el título a una temperatura superior, por ejemplo, 37°C en relación con una temperatura inferior, por ejemplo, 33°C para cepas de influenza B. Por ejemplo, el término “adaptado al frío” (“*cold adapted*, ca”) indica que el virus presenta una tasa de crecimiento superior a una temperatura inferior, por ejemplo, 25°C dentro de 100 veces su crecimiento a una temperatura superior, por ejemplo, 33°C. Por ejemplo, el término “atenuado” (“*attenuated*, att”) indica que el virus se replica en las vías respiratorias superiores de hurones pero no puede detectarse en tejidos pulmonares, y no provoca enfermedad similar a la gripe en el animal. Se entenderá que virus con fenotipos intermedios, es decir, virus que expresan reducciones del título inferiores a 100 veces a 39°C (para virus de la cepa A) o 37°C (para virus de la cepa B), que presentan crecimiento a 25°C que es más de 100 veces su crecimiento a 33°C (por ejemplo, dentro de 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 10.000 veces menos) y/o que presentan crecimiento reducido en los pulmones en relación con el crecimiento en las vías respiratorias superiores de hurones (es decir, parcialmente atenuados) y/o enfermedad similar a la gripe reducida en el animal, también son virus útiles abarcados por la invención. El crecimiento indica la cantidad viral tal como se indica mediante el título, el tamaño o la morfología de las placas, la densidad de partículas u otras medidas conocidas por los expertos en la técnica.

Características de las células

Las células descritas en el presente documento pueden ser células de vertebrados. Las células descritas en el presente documento pueden ser células de mamíferos, por ejemplo, de hámsteres, ganado, monos o perros, en particular células de riñón o líneas celulares derivadas de estos. Las células descritas en el presente documento pueden ser células MDCK (por ejemplo, relacionadas de manera lineal con MDCK ATCC CCL-34). Las células descritas en el presente documento pueden derivarse de MDCK ATCC CCL-34. Las células descritas en el presente documento pueden derivarse de células MDCK CCL-34 mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en primer lugar las células MDCK CCL-34 pueden someterse a pase un número limitado de veces en un medio que contiene suero (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + suero bovino fetal al 10% (FBS) + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l, u otros medios descritos en el presente documento) seguido por

clonación de células individuales y caracterización de los clones. Pueden seleccionarse clones con propiedades biológicas y fisiológicas superiores incluyendo, pero sin limitarse a, tiempos de duplicación, perfil de tumorigenicidad y producción viral, para la generación de un banco de células maestro (MCB).

- 5 Se describe en el presente documento una célula de riñón canino Madin-Darby (MDCK), en la que una composición de cultivo celular que comprende una pluralidad de las células MDCK soporta la replicación de un virus influenza. Las células MDCK pueden soportar la replicación de un virus influenza que tiene una o más de las siguientes características: adaptado al frío, atenuado y sensible a la temperatura. La capacidad de las células MDCK para soportar la replicación viral puede determinarse midiendo el rendimiento de virus obtenidos a partir de un cultivo celular infectado (por ejemplo, usando un ensayo de mediana de la dosis infecciosa en cultivo celular (TCID₅₀) o ensayo de focos fluorescentes (FFA)). Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un logaritmo en base 10 de la mediana de la dosis de infección en cultivo tisular por mililitro (log₁₀ TCID₅₀/ml) de al menos aproximadamente 7,0. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,2. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,4. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,6. En determinadas realizaciones, las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,8. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,0. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,2. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,4. Las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,6. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,8. Las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 9,0. Alternativamente, u opcionalmente, el rendimiento viral puede cuantificarse determinando la concentración de virus presente en una muestra según un ensayo de focos fluorescentes (descrito como ejemplo 6 y conocido en la técnica, véase por ejemplo, Stokes *et al.*, 1988, J Clin Microbiol. 26:1263-6 y la publicación de patente estadounidense 20040265987). Los valores de FFA se notifican a menudo como log₁₀ FFU/ml (unidades de focos fluorescentes/ml). Por consiguiente, las células MDCK pueden soportar la replicación del virus influenza hasta un logaritmo en base 10 de unidades de focos fluorescentes por mililitro (log₁₀ FFU/ml) de al menos aproximadamente 7,0, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,2, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,4, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,6, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,8, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,0, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,2, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,4, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,6, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,8, o hasta un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 9,0.

- Las células descritas en el presente documento pueden propagarse en cultivo para generar una composición de cultivo celular (también denominada en el presente documento "composición de cultivo celular de la invención"). Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK descritas en el presente documento, en la que la composición de cultivo celular soporta la replicación de un virus influenza que tiene una o más de las siguientes características: adaptado al frío, atenuado y sensible a la temperatura hasta un log₁₀ TCID₅₀/ml y/o un log₁₀ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,0, al menos aproximadamente 7,2, al menos aproximadamente 7,4, al menos aproximadamente 7,6, al menos aproximadamente 7,8, al menos aproximadamente 8,0, al menos aproximadamente 8,2, al menos aproximadamente 8,4, al menos aproximadamente 8,6, al menos aproximadamente 8,8, al menos aproximadamente 9,0, al menos aproximadamente 9,2, al menos aproximadamente 9,4, al menos aproximadamente 9,6, al menos aproximadamente 9,8, al menos aproximadamente 10,0, al menos aproximadamente 10,2, al menos aproximadamente 10,4, al menos aproximadamente 10,6, al menos aproximadamente 10,8 o al menos aproximadamente 11,0.

- Las células descritas en el presente documento pueden adaptarse a crecer en un medio de elección (por ejemplo, un medio APF o libre de suero, tal como los descritos en el presente documento). Tal adaptación puede producirse antes de, simultáneamente con o posteriormente a la clonación de células individuales. Las células descritas en el presente documento se adaptaron a crecer en MediV 101, MediV 102, MediV 103, MediV 104, MediV 105, M-32, MediV 107, M18M o derivados de crecimiento optimizado de los mismos, tal como se describe a continuación en el presente documento. Por consiguiente, las células descritas en el presente documento pueden propagarse en un medio tal como se da a conocer en el presente documento para generar una composición de cultivo celular de la invención. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK de la invención, en la que el medio de crecimiento es un medio libre de suero.

- Las células pueden ser de las líneas celulares que incluyen, pero sin limitarse a, las que se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) el 5 de enero de 2005 y a las que se les asignaron los n.^{os} de depósito de la ATCC PTA-6500, PTA-6501, PTA-6502, PTA-6503 y los subclones 1-A y 1-B, depositados el 5 de octubre de 2006 y a los que se les asignaron los n.^{os} de depósito de la ATCC PTA-7909 y PTA-7910, respectivamente. Estos depósitos se mantendrán según los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en

materia de Patentes. Las células MDCK de la invención pueden usarse para generar un banco de células útil para la preparación de material de vacuna adecuado para su aprobación por la Food and Drug Administration estadounidense para uso humano. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK depositadas como número de registro de la ATCC PTA-6500, PTA-6501, PTA-6502, PTA-6503, PTA-7909 o PTA-7910. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK depositadas como número de registro de la ATCC PTA-7909. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK depositadas como número de registro de la ATCC PTA-7910.

También se describen en el presente documento líneas de células MDCK derivadas de la línea celular MDCK (CCL 34) mediante pase y selección con respecto a una o más características específicas incluyendo pero sin limitarse a hacerse crecer como células adherentes en medios o bien que contienen suero, o bien libres de suero o bien libres de proteínas animales, hacerse crecer como células no adherentes en medios o bien que contienen suero, o bien libres de suero o bien libres de proteínas animales, tener una morfología de tipo epitelial, no ser tumorigénicas (por ejemplo, no formar nódulos en un ratón desnudo) y/o no ser oncogénicas y/o soportar la replicación de diversos virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus y flavovirus.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden no ser tumorigénicas. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK descritas en el presente documento, en la que las células MDCK descritas en el presente documento no son tumorigénicas. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar si las células son tumorigénicas (véanse, por ejemplo, Leighton *et al.*, 1970, Cancer, 26:1024 y Stiles *et al.*, 1976, Cancer Res, 36:1353), el método preferido actualmente por la Food and Drug Administration estadounidense usa el modelo de ratón desnudo detallado en la sección 8.7 a continuación. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden no ser tumorigénicas en el modelo de ratón desnudo adulto (véase, Stiles *et al.* *ibídem* y la sección 8.7 a continuación). Las células MDCK descritas en el presente documento pueden no ser tumorigénicas cuando se inyectan en un embrión de pollo y/o se aplican por vía tópica a la membrana corioalantoidea (véase, Leighton *et al.*, *ibídem*). Las células MDCK descritas en el presente documento pueden no ser tumorigénicas en el modelo de ratón desnudo adulto pero no cuando se inyectan en un embrión de pollo y/o se aplican por vía tópica a la membrana corioalantoidea. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden no ser tumorigénicas en el modelo de ratón desnudo adulto y cuando se inyectan en un embrión de pollo y/o se aplican por vía tópica a la membrana corioalantoidea. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden no ser tumorigénicas tras al menos 20 pases, o tras al menos 30 pases, o tras al menos 40 pases, o tras al menos 50 pases, o tras al menos 60 pases, o tras al menos 70 pases, o tras al menos 80 pases, o tras al menos 90 pases, o tras al menos 100 pases en un medio. El medio puede ser un medio descrito en el presente documento (por ejemplo, Medi 105).

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

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden no ser oncogénicas. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK descritas en el presente documento, en la que las células MDCK no son oncogénicas. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar si las células son oncogénicas e implican generalmente la inoculación de lisados celulares y/o ADN en especies de roedores recién nacidos y la evaluación de cualquier formación de tumor a lo largo del tiempo (véanse, por ejemplo, Nowinski y Hays, 1978, J. Virol., 27: 13-8; Peeper, *et al.*, 2002, Nat Cell Biol., 4:148-53; Code of Federal Regulation (CFR), "Oncogenicity", título 40, vol. 8, capítulo 1, sección 798.330, págs. 160-164). Por ejemplo, se inyectan lisados celulares y/o ADN de al menos 10⁷ equivalentes celulares en roedores recién nacidos (por ejemplo, hámster, ratones desnudos, ratas) normalmente de menos de 4 días de edad que entonces se monitorizan durante hasta cinco meses o más. Se realizan rutinariamente ensayos de oncogenicidad por empresas de ensayos comerciales (por ejemplo, BioReliance, véanse los protocolos n.º 001031 y n.º 001030). Lisados celulares y/o ADN de al menos 10⁵, o al menos 10⁶, o al menos 10⁷ células MDCK descritas en el presente documento pueden no inducir formación de tumores en 2 meses, o en 3 meses, o en 4 meses, o en 5 meses, o en 6 meses, o más, cuando se inyectan en especies de roedores recién nacidos. 0,01 mg, o 0,02 mg, o 0,03 mg, o 0,04 mg, o 0,05 mg, o 0,06 mg, o 0,07 mg, o 0,08 mg, o 0,09 mg, o 0,10 mg, o más, de ADN de una célula MDCK descrita en el presente documento pueden no inducir formación de tumores en 2 meses, o en 3 meses, o en 4 meses, o en 5 meses, o en 6 meses, o más, cuando se inyectan en una especie de roedor recién nacido.

Las células descritas en el presente documento pueden hacerse crecer como células adherentes en medios o bien que contienen suero o bien libres de suero o bien libres de proteínas animales. Las células descritas en el presente documento pueden hacerse crecer como células no adherentes (por ejemplo, que pueden hacerse crecer en condiciones no adherentes) en medios o bien que contienen suero o bien libres de suero o bien libres de proteínas animales. Las células descritas en el presente documento pueden tener una morfología de tipo epitelial. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de diversos virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus y flavovirus. Se contempla que las células MDCK descritas en el presente documento puedan tener cualquier combinación de una o más características específicas incluyendo pero sin limitarse a, no ser tumorigénicas, no ser oncogénicas, hacerse crecer como células adherentes, hacerse crecer como células no adherentes, tener una morfología de tipo epitelial, soportar la replicación de diversos virus y soportar el crecimiento de virus influenza hasta un alto título, por ejemplo, un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,0, al menos aproximadamente 7,2, al menos aproximadamente 7,4, al menos aproximadamente 7,6, al menos aproximadamente 7,8, al menos aproximadamente 8,0, al menos aproximadamente 8,2, al menos aproximadamente 8,4, al menos aproximadamente 8,6, al menos aproximadamente 8,8, al menos aproximadamente 9,0, al menos aproximadamente 9,2, al menos aproximadamente 9,4, al menos aproximadamente 9,6, al menos aproximadamente 9,8, al menos aproximadamente 10,0, al menos aproximadamente 10,2, al menos aproximadamente 10,4, al menos aproximadamente 10,6, al menos aproximadamente 10,8 o al menos aproximadamente 11,0 y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,0, al menos aproximadamente 7,2, al menos aproximadamente 7,4, al menos aproximadamente 7,6, al menos aproximadamente 7,8, al menos aproximadamente 8,0, al menos aproximadamente 8,2, al menos aproximadamente 8,4, al menos aproximadamente 8,6, al menos aproximadamente 8,8, al menos aproximadamente 9,0, al menos aproximadamente 9,2, al menos aproximadamente 9,4, al menos aproximadamente 9,6, al menos aproximadamente 9,8, al menos aproximadamente 10,0, al menos aproximadamente 10,2, al menos aproximadamente 10,4, al menos aproximadamente 10,6, al menos aproximadamente 10,8 o al menos aproximadamente 11,0. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK descritas en el presente documento, en la que las células MDCK descritas en el presente documento pueden tener cualquier combinación de una o más características específicas incluyendo pero sin limitarse a, no ser tumorigénicas, no ser oncogénicas, hacerse crecer como células adherentes, hacerse crecer como células no adherentes, tener una morfología de tipo epitelial, soportar la replicación de diversos virus y soportar el crecimiento de virus influenza hasta un alto título (por ejemplo, $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,8).

Se contempla que todos y cada uno de los pases de las células MDCK descritas en el presente documento pueda documentarse con suficiente detalle de manera que está disponible el linaje completo de cada línea celular. La documentación de todos y cada uno de los pases puede facilitar su aprobación por la Food and Drug Administration estadounidense y otros organismos reguladores en todo el mundo para el uso de las células MDCK descritas en el presente documento para la preparación de material de vacuna.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden estar libres de contaminantes microbianos (por ejemplo, contaminantes bacterianos, virales y fúngicos). Se conocen bien en la técnica métodos para someter a prueba la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos y se realizan de manera rutinaria por contratistas comerciales (por ejemplo, BioReliance®, Rockville, MD). Se detallan pruebas de micoplasmas y esterilidad microbiana aceptadas en la sección 8.7 a continuación. Se enumeran ejemplos específicos de agentes microbianos que pueden someterse a prueba en la tabla 4.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de virus incluyendo pero sin limitarse a ortomixovirus (incluyendo cepas de influenza A y/o B), paramixovirus (incluyendo VRS A y/o B, metapneumovirus humano y parainfluenza 1, 2 y/o 3), rabdovirus y flavovirus.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de virus influenza adaptados al frío/sensibles a la temperatura (ca/ts) tales como los encontrados, por ejemplo, en FluMist® (Belshe *et al.*, 1998, N Engl J Med 338:1405; Nichol *et al.*, 1999, JAMA 282:137; Jackson *et al.*, 1999, Vaccine, 17:1905) y/o virus reordenantes que comprenden la estructura principal (por ejemplo, los segmentos génicos restantes) de estos virus o que comprenden la estructura principal (o uno o más segmentos de ARNv) de virus influenza que tienen una o más de las siguientes características: adaptados al frío, atenuados y sensibles a la temperatura. Una indicación de la capacidad de una célula para soportar la replicación viral es el rendimiento de virus obtenido a partir de un cultivo celular infectado. El rendimiento viral puede determinarse mediante numerosos métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el rendimiento viral puede cuantificarse determinando la concentración de virus presente en una muestra según un ensayo de mediana de la dosis infecciosa en cultivo tisular (TCID₅₀) que mide viriones infecciosos o ensayo de focos fluorescentes (FFA). Los valores de TCID₅₀ se notifican a menudo como el $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y los valores de FFA se notifican a menudo como $\log_{10}$ FFU/ml (unidades de focos fluorescentes/ml).

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de virus influenza (por ejemplo, cepas ca/ts) hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al

menos 9,6, o al menos 9,8. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de virus influenza (por ejemplo, cepas ca/ts) hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 6,0, o al menos aproximadamente 6,2, o al menos aproximadamente 6,4, o al menos aproximadamente 6,6, o al menos aproximadamente 6,8, o al menos aproximadamente 7,0, o al menos aproximadamente 7,2, o al menos aproximadamente 7,4, o al menos aproximadamente 7,6, o al menos aproximadamente 7,8, o al menos aproximadamente 8,0, o al menos aproximadamente 8,2, o al menos aproximadamente 8,4, o al menos aproximadamente 8,6, o al menos aproximadamente 8,8, o al menos aproximadamente 9,0, o al menos aproximadamente 9,2, o al menos aproximadamente 9,4, o al menos aproximadamente 9,6, o al menos aproximadamente 9,8. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de virus influenza (por ejemplo, cepas ca/ts) hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de virus influenza (por ejemplo, cepas ca/ts) hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 6,0, o al menos aproximadamente 6,2, o al menos aproximadamente 6,4, o al menos aproximadamente 6,6, o al menos aproximadamente 6,8, o al menos aproximadamente 7,0, o al menos aproximadamente 7,2, o al menos aproximadamente 7,4, o al menos aproximadamente 7,6, o al menos aproximadamente 7,8, o al menos aproximadamente 8,0, o al menos aproximadamente 8,2, o al menos aproximadamente 8,4, o al menos aproximadamente 8,6, o al menos aproximadamente 8,8, o al menos aproximadamente 9,0, o al menos aproximadamente 9,2, o al menos aproximadamente 9,4, o al menos aproximadamente 9,6, o al menos aproximadamente 9,8.

Se sabe bien en la técnica que los virus de tipo natural usados en la preparación de las cepas de vacuna para la vacunación anual contra gripe epidémica se recomiendan anualmente por el Comité Consultivo de Vacunas y Productos Biológicos Relacionados (*Vaccines y Related Biological Products Advisory Committee*) a los Centros de Evaluación Biológica e Investigación (*Centers for Biologics Evaluation and Research*, CBER) o la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Evaluación de Medicamentos Europea (*European Medicines Evaluation Agency*, EMEA), y se proporcionan a los fabricantes por la FDA o los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC). Estas cepas pueden usarse entonces para la producción de cepas de vacuna reordenantes que combinan generalmente los genes de NA y/o HA de los virus de tipo natural con los segmentos génicos restantes derivados de un virus donador (a menudo denominado virus donador maestro VDM) que tendrán determinadas características deseables. Por ejemplo, una cepa de VDM puede estar adaptada al frío y/o ser sensible a la temperatura y/o estar atenuada y/o tener una alta tasa de crecimiento. La descripción que sigue inmediatamente a continuación se refiere a versiones adaptadas al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuadas de cepas de influenza diferentes (por ejemplo, cepas de tipo natural recomendadas por una o más organizaciones sanitarias). Tal como es consciente un experto en la técnica, tales virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados pueden prepararse fácilmente obteniendo virus influenza recombinantes y/o reordenantes que comprenden los segmentos génicos de HA y NA de la cepa de interés y los segmentos génicos restantes de una cepa de influenza adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada (también denominada en el presente documento "estructura principal adaptada al frío, sensible a la temperatura, atenuada") tal como, por ejemplo, los virus influenza adaptados al frío, sensibles a la temperatura, atenuados encontrados en FluMist®, así como la cepa A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66. Tal como se usa en el presente documento, un virus recombinante y/o reordenante que comprende los segmentos génicos de HA y NA de una cepa de virus influenza de tipo natural y los segmentos génicos restantes de un virus influenza adaptado al frío, sensible a la temperatura, atenuado también se le hace referencia mediante la designación de cepa de tipo natural precedida por el identificador "ca", por ejemplo un virus recombinante y/o reordenante que comprende los segmentos génicos de HA y NA de A/Nueva Caledonia/20/99 y los segmentos restantes de un virus influenza adaptado al frío, sensible a la temperatura, atenuado puede designarse "ca A/Nueva Caledonia/20/99". El virus influenza reordenante puede comprender al menos un segmento génico de A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66, A/Leningrado/134/47/57, B/Leningrado/ 14/17/55 o A/ Puerto Rico/8/34.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada (por ejemplo, reordenante) de al menos una cepa de influenza (por ejemplo, una cepa de influenza A, una cepa de influenza B) recomendada y/o proporcionada anualmente por una o más organizaciones sanitarias incluyendo, pero sin limitarse a, los CBER, la OMS, la EMEA, la FDA y los CDC, hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK descritas en el presente documento, en la que la composición de cultivo celular soporta la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada (por ejemplo, reordenante) de al menos una cepa de influenza (por ejemplo, una cepa de influenza A, una cepa de influenza B) recomendada y/o proporcionada anualmente por una o más organizaciones sanitarias incluyendo, pero sin limitarse a, los CBER, la OMS, la EMEA, la FDA y los CDC, hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al

menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de al menos una cepa de influenza A hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK descritas en el presente documento, en la que la composición de cultivo celular soporta la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de al menos una cepa de influenza A hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Se contempla que la cepa de influenza A pueda ser de cualquier subtipo (por ejemplo, H₁N₁, H₃N₂, H₇N₇, H₅N₁, H₉N₂, H₁N₂, H₂N₂). En la actualidad se han identificado al menos 16 subtipos de HA diferentes y 9 subtipos de NA diferentes en virus de influenza A. Por consiguiente, la cepa de influenza A puede comprender cualquier combinación de subtipos de HA y NA conocidos actualmente o identificados en el futuro.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de al menos una cepa de influenza B hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Una composición de cultivo celular descrita en el presente documento puede comprender como único tipo de células huésped células MDCK descritas en el presente documento, en la que la composición de cultivo celular soporta la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de al menos una cepa de influenza B hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Los virus de influenza B no se dividen actualmente en subtipos basándose en sus proteínas hemaglutinina y neuraminidasa, más bien se clasifican por linaje. En la actualidad, las cepas de virus de influenza B se dividen en dos linajes, los linajes B/Yamagata y B/Victoria de los que hay numerosos sublinajes. Por consiguiente, la cepa de influenza B puede derivarse de cualquier linaje y/o sublinaje conocido actualmente o identificado en el futuro.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de la cepa de influenza A/Nueva Caledonia (es decir, ca A/Nueva Caledonia) hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de la cepa de influenza A/Hiroshima (es decir, ca A/Hiroshima) hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de la cepa de influenza B/Malasia (es decir, ca B/Malasia) hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de la cepa de influenza A/Vietnam (es decir, ca A/Vietnam) hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de la cepa de influenza A/Wisconsin (es decir, ca A/Wisconsin) hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden soportar la replicación de una versión adaptada al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuada de cada una de las cepas de influenza A/Nueva Caledonia y A/Hiroshima hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al

temperatura y/o atenuados hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4, o al menos 9,6, o al menos 9,8 o al menos 10,0, que comprende hacer crecer las células en un medio libre de suero, preferiblemente un medio libre de proteínas animales y añadir una proteasa por ejemplo, TrypLE (1:10 - 1:100) antes de, durante o después de infectar las células con virus influenza. Los virus influenza adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados pueden hacerse crecer hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos 6,0, o al menos 6,2, o al menos 6,4, o al menos 6,6, o al menos 6,8, o al menos 7,0, o al menos 7,2, o al menos 7,4, o al menos 7,6, o al menos 7,8, o al menos 8,0, o al menos 8,2, o al menos 8,4, o al menos 8,6, o al menos 8,8, o al menos 9,0, o al menos 9,2, o al menos 9,4 o al menos 9,6, o al menos 9,8 o al menos 10,0. Los medios nuevos pueden ser MediV 105 complementado con una proteasa, por ejemplo, TrypLE (1:10 - 1:100). Los medios nuevos pueden ser M-32 complementados con una proteasa, por ejemplo TrypLE (1:10 - 1:100). Los medios nuevos son MediV 107 que puede complementarse con una proteasa, por ejemplo, TrypLE (1:10 - 1:100). Cualquier proteasa conocida por un experto en la técnica que sea útil en la escisión de proteínas de influenza puede usarse en estos métodos. Los medios nuevos pueden ser M18M complementado con una proteasa, por ejemplo, TrypLE (1:10 - 1:100). Los medios nuevos pueden ser DMEM/F12 complementado con glucosa 4,5 g/l, glutamina 4 mM y una proteasa, por ejemplo, TrypLE (1:10 - 1:100).

Un experto en la técnica entenderá que las células descritas en el presente documento pueden usarse frecuentemente como parte de una composición de cultivo celular. Los componentes de una composición de cultivo celular pueden variar según las células y el uso previsto. Por ejemplo, para fines de cultivo una composición de cultivo celular puede comprender las células descritas en el presente documento y un medio adecuado para el crecimiento de las células. Por consiguiente, se describen en el presente documento composiciones de cultivo celular que comprenden las células descritas en el presente documento y otros componentes que pueden incluir, pero no se limitan a, medios (por ejemplo, un medio dado a conocer en el presente documento), componentes de medios, tampones, compuestos químicos, tipos de células adicionales, material viral (por ejemplo, genomas virales, artículos virales) y proteínas heterólogas. Una composición de cultivo celular puede comprender células descritas en el presente documento y un medio o componentes del mismo. Los medios que pueden estar presentes en una composición de cultivo celular incluyen medios libres de suero, medios que contienen suero y medios libres de proteínas animales. En una realización, una composición de células comprende un medio libre de suero, por ejemplo, MediV 101, MediV 102, MediV 103, MediV 104, MediV 105, M-32, MediV 107 o M18M, o componentes o un derivado de crecimiento optimizado de los mismos.

Métodos y formulaciones de medios

También se describen en el presente documento métodos y formulaciones de medios para el cultivo de células MDCK que soportan la replicación de virus influenza hasta un alto título en medios que contienen suero. También se describen en el presente documento métodos para la adaptación a y el cultivo posterior de las células MDCK en medios libres de suero, incluyendo formulaciones de medios libres de proteínas animales. Los medios pueden formularse de manera que las células MDCK conservan una o más de las siguientes características incluyendo pero sin limitarse a, no ser tumorigénicas, no ser oncogénicas, hacerse crecer como células adherentes, hacerse crecer como células no adherentes, tener una morfología de tipo epitelial, soportar la replicación de diversos virus cuando se cultivan y soportar la replicación de virus influenza hasta un alto título tal como se describe en el presente documento. Se contempla que las formulaciones de medios dadas a conocer en el presente documento o componentes de los mismos puedan estar presentes en una composición de cultivo celular.

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

Pueden derivarse células MDCK adaptadas a suero descritas en el presente documento de células de riñón canino Madin Darby (MDCK) obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC CCL34) cultivándolas en un medio definido químicamente complementado con suero. Pueden expandirse células MDCK (ATCC CCL34) en un medio definido químicamente complementado con suero para generar una línea de células MDCK adaptadas a suero tal como sigue: se realizan pases de las células MDCK (ATCC CCL34) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (10% v/v), glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l para obtener células suficientes para preparar un banco de células maestro previo (PreMCB) congelado. Las células pueden cultivarse usando los métodos detallados en los ejemplos 1 y 2, a continuación. Se contempla específicamente que las células MDCK adaptadas a suero se sometan a pases durante otros 20 pases o más, a partir de un vial de PreMCB y se sometan a prueba para determinar la tumorigenicidad en un modelo de ratones desnudos adultos *in vivo* y la cariólogía en un ensayo de cariotipo. Las células MDCK expandidas pueden no producir tumores cuando se inyectan por vía subcutánea en ratones desnudos adultos y tendrán un número de cromosomas modal de 78 con un intervalo de números de cromosomas de no más de aproximadamente 60-88, o de no más de aproximadamente 65-85, o de no más de aproximadamente 65-80, o de no más de aproximadamente 70-85. Las células MDCK-S pueden no ser tumorigénicas tras al menos 20 pases, o tras al menos 30 pases, o tras al menos 40 pases, o tras al menos 50 pases, o tras al menos 60 pases, o tras al menos 70 pases, o tras al menos 80 pases, o tras al menos 90 pases, o tras al menos 100 pases en un medio (por ejemplo, un medio descrito en el presente documento).

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

Las formulaciones de medios libres de suero descritas en el presente documento pueden incluir, pero no se limitan a, MediV 101 (medio de Taub+hidrolizado vegetal), MediV 102 (Taub+lípidos), MediV 103 (Taub+lípidos+hidrolizado vegetal); MediV 104 (Taub+lípidos+hidrolizado vegetal+factor de crecimiento), MediV 105 (igual que MediV 104 excepto porque se reemplaza la transferrina por citrato de amonio férrico/tropolona o sulfato de amonio férrico/tropolona) (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 2006/0188977), M-32 (igual que MediV 105 complementado con oligoelementos A, B y C (véase la tabla 9), MediV 107 (véase la tabla 10) y M18M (véase la tabla 11). Se contempla específicamente que el medio SF de Taub (Taub y Livingston, 1981, Ann NY Acad Sci., 372:406) es una mezcla 50:50 de DMEM y F12 de Ham complementada con hormonas, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, prostaglandina E 1 25 ng/ml, hidrocortisona 50 nM, triyodotironina 5 pM y Na₂SeO₃ 10 nM, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM. El medio SF de Taub también se denomina en el presente documento medio de Taub o simplemente "Taub". Se proporcionan a continuación formulaciones de medios específicos y métodos de preparación de los mismos (véase, por ejemplo, la sección 8.10).

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

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

Pueden complementarse medios de Taub con un hidrolizado vegetal y una concentración final de al menos 0,5 g/l, o al menos 1,0 g/l, o al menos 1,5 g/l, o al menos 2,0 g/l, o al menos 2,5 g/l, o al menos 3,0 g/l, o al menos 5,0 g/l, o al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l. Pueden complementarse medios de Taub con un hidrolizado de trigo. En otra

realización específica, se complementan medios de Taub con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l. También se describe en el presente documento un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV 101 que comprende medio de Taub con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l (véase, por ejemplo, la sección 8.10).

5 Pueden complementarse medios de Taub con una mezcla de lípidos a una concentración final de al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 100%, o al menos el 125%, o al menos el 150%, o al menos el 200%, o al menos el 300% de la concentración final recomendada por los fabricantes. Pueden complementarse medios de Taub con una mezcla de lípidos definida químicamente. Pueden
10 complementarse medios de Taub con una mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes (por ejemplo, una reserva 100X obtenida de un fabricante se añadiría al medio hasta una concentración final de 1X). También se describe en el presente documento un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV 102 que comprende medio de Taub complementado con una mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la
15 concentración final recomendada por los fabricantes (véase, por ejemplo, la sección 8.10).

Pueden complementarse medios de Taub con un hidrolizado vegetal a una concentración final de al menos 0,5 g/l, o al menos 1,0 g/l, o al menos 1,5 g/l, o al menos 2,0 g/l, o al menos 2,5 g/l, o al menos 3,0 g/l, o al menos 5,0 g/l, o al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l y con una mezcla de lípidos a una concentración final de al menos el 50%, o al
20 menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 100%, o al menos el 125%, o al menos el 150%, o al menos el 175%, o al menos el 200% de la concentración recomendada por los fabricantes. Pueden complementarse medios de Taub con hidrolizado de trigo y una mezcla de lípidos definida químicamente. Pueden complementarse medios de Taub con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una
25 mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes. También se describe en el presente documento un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV 103 que comprende medio de Taub complementado con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes (véase, por ejemplo, la sección 8.10).

30 Pueden complementarse medios de Taub con una hormona de crecimiento. Las hormonas de crecimiento que pueden usarse incluyen pero no se limitan a factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento transformante (TGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). La hormona de crecimiento puede ser factor de crecimiento epidérmico (EGF). Pueden complementarse medios de Taub con un factor de crecimiento a una concentración final de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50,0 ng/ml, o
35 entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 25,0 ng/ml, o entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 20 ng/ml, o entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 15,0 ng/ml, o entre aproximadamente 8 ng/ml y aproximadamente 12 ng/ml. Pueden complementarse medios de Taub con un EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml. Pueden complementarse medios de Taub con un factor de crecimiento a una concentración final de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50,0 ng/ml, o entre aproximadamente 0,5 y
40 aproximadamente 25,0 ng/ml, o entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 20 ng/ml, o entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 15,0 ng/ml, o entre aproximadamente 8 ng/ml y aproximadamente 12 ng/ml y con un hidrolizado vegetal a una concentración final de al menos 0,5 g/l, o al menos 1,0 g/l, o al menos 1,5 g/l, o al menos 2,0 g/l, o al menos 2,5 g/l, o al menos 3,0 g/l, o al menos 5,0 g/l, o al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l y con una
45 mezcla de lípidos a una concentración final de al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 100%, o al menos el 125%, o al menos el 150%, o al menos el 175%, o al menos el 200% de la concentración recomendada por los fabricantes. Pueden complementarse medios de Taub con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes y EGF a una concentración
50 final de aproximadamente 10 ng/ml. También se describe en el presente documento un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV 104 que comprende medio de Taub complementado con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes y EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml (véase, por ejemplo, la sección 8.10).

55 Un experto en la técnica también apreciará que formulaciones de medios libres de proteínas animales pueden ser deseables para la producción de virus usados en la fabricación de vacunas. Por consiguiente, uno o más o todos los componentes derivados de animales de los medios libres de suero dados a conocer en el presente documento (por ejemplo, MediV 101, MediV 102, MediV 103, MediV 104, MediV 105, M-32, MediV 107, M18M) pueden reemplazarse por un derivado libre de animales. Por ejemplo, puede utilizarse insulina recombinante disponible
60 comercialmente derivada de fuentes no animales (por ejemplo, n.º de cat. de Biological Industries 01-818-1) en vez de insulina derivada de una fuente animal. Asimismo, pueden utilizarse agentes de unión a hierro (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.045.454; 5.118.513; 6.593.140; y la publicación PCT número WO 01/16294) en vez de transferrina derivada de una fuente animal. Las formulaciones de medios libres de suero descritos en el presente documento pueden comprender tropolona (2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1) y una fuente de
65 hierro (por ejemplo, citrato de amonio férrico, sulfato de amonio férrico) en lugar de transferrina. Por ejemplo, estará presente tropolona o un derivado de tropolona en una concentración en exceso molar con respecto al hierro

presente en el medio a una razón molar de aproximadamente 2 a 1 a de aproximadamente 70 a 1, o de aproximadamente 10 a 1 a de aproximadamente 70 a 1. Los medios libres de suero descritos en el presente documento pueden comprender citrato de amonio férrico a una concentración final de 200 µg/l y tropolona a una concentración final de 250 µg/l (véase, por ejemplo, la sección 8.10)). Por consiguiente, cuando la concentración de hierro en el medio es de alrededor de 0,3 µM, la tropolona o el derivado de la misma puede emplearse a una concentración de aproximadamente 1,5 µM a aproximadamente 20 µM, por ejemplo de aproximadamente 3 µM a aproximadamente 20 µM. El hierro puede estar presente como iones férrico o ferroso, que resultan por ejemplo del uso de sales de hierro simples o complejas en el medio, tales como sulfato ferroso, cloruro férrico, nitrato férrico o en particular citrato de amonio férrico. También se describe en el presente documento un medio libre de suero denominado en el presente documento MediV 105 que comprende medio de Taub sin transferrina complementado con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes y EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml y citrato de amonio férrico:tropolona o sulfato de amonio férrico:tropolona a una razón de entre 2 y 1 y 70 y 1. Un medio libre de suero descrito en el presente documento puede comprender citrato de amonio férrico a una concentración final de 200 µg/l y tropolona a una concentración final de 250 µg/l (véase, por ejemplo, la sección 8.10)).

Uno o más de los medios dados a conocer en el presente documento pueden complementarse con oligoelementos (por ejemplo, disoluciones de oligoelementos A, B y C, tabla 9). Los oligoelementos que pueden usarse incluyen pero no se limitan a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, selenito $\cdot 2\text{Na}$, citrato férrico, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, sal de amonio de ácido molibídico, NH_4VO_3 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, SnCl_2 (anhidro), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, KBr , CdCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CrCl_3 (anhidro), NaF , GeO_2 , KI , RbCl , $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Se obtienen fácilmente disoluciones madre concentradas de oligoelementos a partir de varias fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo Cell Grow (véanse los n.ºs de catálogo 99-182, 99-175 y 99-176). También se describe en el presente documento un medio libre de suero denominado en el presente documento M-32 que comprende medio de Taub sin transferrina complementado con un hidrolizado de trigo a una concentración final de 2,5 g/l y una mezcla de lípidos definida químicamente a una concentración final del 100% de la concentración final recomendada por los fabricantes y EGF a una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml y disoluciones de oligoelementos A, B y C (tabla 9), y citrato de amonio férrico:tropolona o sulfato de amonio férrico:tropolona a una razón de entre 2 y 1 y 70 y 1. Un medio libre de suero descrito en el presente documento puede comprender citrato de amonio férrico a una concentración final de 200 µg/l y tropolona a una concentración final de 250 µg/l (véase, por ejemplo, la sección 8.10)). También se contempla que uno o más de los medios dados a conocer en el presente documento se complementen con glucosa adicional. Un medio libre de suero de los descritos en el presente documento puede comprender 1-5 g/l adicionales de glucosa para lograr una concentración de glucosa final de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 10 g/l.

Pueden derivarse células MDCK adaptadas para el crecimiento en medios libres de suero MediV 101, MediV 102, MediV 103, MediV 104, MediV 105, M-32, MediV 107 o M18M a partir de células de riñón canino Madin Darby (MDCK) obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC CCL34) mediante cultivo en un medio definido químicamente complementado con suero durante al menos un pase y entonces sometiéndolas a pases en un medio libre de suero tal como, por ejemplo, los medios libres de suero descritos anteriormente. Pueden adaptarse células MDCK (ATCC CCL34) a medios libres de suero tal como sigue: las células MDCK (ATCC CCL34) se someten a pases en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (al 10% v/v), glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l al menos una vez y luego se someten a pases en medios libres de suero. Las células MDCK se someten entonces a pases según sea necesario en medios libres de suero para obtener suficientes células adaptadas a medios libres de suero como para preparar un banco de células maestro previo (PreMCB) congelado. Las células pueden someterse a pases en un medio que contiene suero (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (al 10% v/v), glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l) entre 1 y 5 veces, o entre 4 y 10 veces, o entre 9 y 20 veces, o más de 20 veces, y entonces someterse a pases en medios libres de suero (por ejemplo, MediV 101, MediV 102, MediV 103, MediV 104, MediV 105, M-32, MediV 107 y M18M, véase, por ejemplo, la sección 8.10)).

Se contempla específicamente que las células MDCK adaptadas a medios libres de suero se sometan a pases durante otros 20 pases o más, a partir de un vial de PreMCB y se sometan a prueba para determinar la tumorigenicidad en un modelo de ratones desnudos adultos *in vivo* y la cariología en un ensayo de cariotipo. Las células MDCK adaptadas a medios libres de suero expandidas pueden no producir nódulos cuando se inyectan por vía subcutánea en ratones desnudos adultos y/o tendrán un número de cromosomas modal de 78. Las células MDCK adaptadas a medios libres de suero expandidas pueden tener un número de cromosomas modal de 78 con un intervalo de números de cromosomas de no más de aproximadamente 60 a aproximadamente 88, o de no más de aproximadamente 65 a aproximadamente 85, o de no más de aproximadamente 65-80, o de no más de aproximadamente 70 a aproximadamente 85. Las células MDCK-SF pueden no ser tumorigénicas tras al menos 20 pases, o tras al menos 30 pases, o tras al menos 40 pases, o tras al menos 50 pases, o tras al menos 60 pases, o tras al menos 70 pases, o tras al menos 80 pases, o tras al menos 90 pases, o tras al menos 100 pases en un medio (por ejemplo, un medio descrito en el presente documento).

El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero puede ser

MediV 101. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero puede ser MediV 102. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero puede ser MediV 103. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero puede ser MediV-104. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero es MediV 105. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero puede ser M-32. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero puede ser MediV 107. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero es M18M. El medio libre de suero usado para la derivación de células MDCK adaptadas a medios libres de suero puede ser un medio APF. Se contempla que los medios descritos en el presente documento puedan formularse para eliminar proteínas animales. Por ejemplo, puede reemplazarse transferrina bovina por una transferrina recombinante derivada de una fuente no animal. Se proporcionan a continuación formulaciones de medios específicos y métodos de preparación de los mismos (véase, por ejemplo, la sección 8.10).

Las células descritas en el presente documento pueden no adaptarse para su crecimiento en un medio libre de suero, sino que en su lugar se hacen crecer simplemente en medio libre de suero sin adaptación. Por tanto, las células pueden hacerse crecer en MediV 101. Las células pueden hacerse crecer en MediV 102. Las células pueden hacerse crecer en MediV 103. Las células se hacen crecer en MediV-104. Las células pueden hacerse crecer en MediV 105. Las células se hacen crecer en M-32. En otra realización, las células pueden hacerse crecer en MediV 107. Las células se hacen crecer en M18M. Las células pueden hacerse crecer en un medio APF. Se contempla que el medio descrito en el presente documento pueda formularse para eliminar proteínas animales. Por ejemplo, puede reemplazarse transferrina bovina por una transferrina recombinante derivada de una fuente no animal.

Condiciones de cultivo

También se describen en el presente documento métodos para el cultivo de células MDCK de la invención y otras células animales en formulaciones de medios que contienen suero y libres de suero tal como se expuso anteriormente. Se contempla específicamente que condiciones de cultivo adicionales puedan desempeñar un papel en el mantenimiento de las propiedades de las células MDCK descritas en el presente documento, incluyendo no ser tumorigénicas, no ser oncogénicas, hacerse crecer como células adherentes, hacerse crecer como células no adherentes, tener una morfología de tipo epitelial, soportar la replicación de diversos virus y soportar el crecimiento de virus influenza (por ejemplo, adaptados al frío y/o sensibles a la temperatura y/o atenuados) hasta un alto título, por ejemplo, un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml y/o un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,4, o al menos aproximadamente 7,6, o al menos aproximadamente 7,8, o al menos aproximadamente 8,0, o al menos aproximadamente 9,0. Estas condiciones de cultivo incluyen, pero no se limitan a, la elección de la superficie adherente, la densidad celular, la temperatura, la concentración de CO₂, el método de cultivo, el contenido en oxígeno disuelto y el pH.

Se contempla específicamente que un experto en la técnica pueda adaptar las condiciones de cultivo de varios modos para optimizar el crecimiento de las células MDCK descritas en el presente documento. Tales adaptaciones también pueden dar como resultado un aumento en la producción de material viral (por ejemplo, virus), tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense US n.º 2005/0118698. Alternativamente, un experto en la técnica puede adaptar las condiciones de cultivo para optimizar la producción de material de vacuna a partir de las células MDCK descritas en el presente documento sin considerar el crecimiento de las células. Estas condiciones de cultivo incluyen pero no se limitan a la superficie adherente, la densidad celular, la temperatura, la concentración de CO₂, el método de cultivo, el contenido en oxígeno disuelto y el pH.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse como células adherentes sobre una superficie a la que se unen. Se conocen bien en la técnica superficies adherentes sobre las que pueden hacerse crecer células de cultivo tisular. Las superficies adherentes incluyen pero no se limitan a plásticos de poliestireno modificados en la superficie, superficies recubiertas con proteínas (por ejemplo, vidrio/plástico recubierto con fibronectina y/o colágeno) así como una gran variedad de microportadores disponibles comercialmente (por ejemplo, perlas microportadoras de DEAE-dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno-tri-metilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor; Cytodex 1 y Cytodex 3, GE Healthcare Life Science). Las perlas microportadoras son esferas pequeñas (en el intervalo de 100-200 micrómetros de diámetro) que proporcionan una gran área de superficie para el crecimiento de células adherentes por volumen de cultivo celular. Por ejemplo un único litro de medio puede incluir más de 20 millones de perlas microportadoras que proporcionan más de 8000 centímetros cuadrados de superficie de crecimiento. La elección de la superficie adherente se determina mediante los métodos utilizados para el cultivo de las células MDCK descritas en el presente documento y puede determinarse por un experto en la técnica. Un experto en la técnica entenderá que durante el proceso de subcultivo de células adherentes (es decir, hacer proliferar las células, expandir el cultivo celular) las células deben transferirse desde una superficie de soporte confluyente (por ejemplo, superficie de un frasco, microportador, etc.) hasta una nueva superficie de soporte. Pueden utilizarse varios métodos para efectuar tal transferencia de células. Por ejemplo, pueden usarse proteasas, incluyendo tripsina, TrypLE y collagenasa, para separar células de frascos o microportadores, las células se lavan entonces y se diluyen en un frasco más grande o en un volumen más grande de medio que contiene microportadores para su expansión. Es preferible usar una

- proteasa no derivada de animales para tales aplicaciones tales como TrypLE (Invitrogen, Carlsbad, CA). Alternativamente, en cultivos en microportadores pueden utilizarse métodos de transferencia perla a perla directos, en los que se mezclan nuevos medios y perlas con las perlas confluentes y se incuba el cultivo en condiciones que facilitan la transferencia de células a las nuevas perlas. Puede utilizarse una combinación de tratamiento con
- 5 proteasas y transferencia perla a perla. En una realización específica, se trata un cultivo celular de células MDCK de la invención que se hacen crecer como células adherentes sobre microportadores con una proteasa (por ejemplo, TrypLE), entonces se inactiva la proteasa (por ejemplo, mediante la adición de un inhibidor de proteasas tal como
- 10 inhibidor de tripsina de frijol), entonces pueden añadirse nuevos medios y perlas microportadoras al cultivo. En una realización, se retira una porción o todo el medio de crecimiento antes del tratamiento con proteasas. Puede reemplazarse una porción o todo el medio de crecimiento por un tampón antes del tratamiento con proteasas. Puede añadirse un agente quelante antes de o durante el tratamiento con proteasas. El cultivo tratado con proteasas puede transferirse a un recipiente de cultivo más grande antes, durante o después de la adición de nuevos microportadores y medios.
- 15 Las células MDCK de la invención pueden cultivarse como células no adherentes (por ejemplo, que pueden crecer en condiciones no adherentes) en suspensión. Recipientes de cultivo adecuados que pueden emplearse en el transcurso del proceso según la invención son todos recipientes conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, frascos centrifugadores, frascos rotatorios, fermentadores o biorreactores. Para la producción comercial de virus, por ejemplo, para la producción de vacunas, a menudo es deseable cultivar las células en un biorreactor o
- 20 fermentador. Están disponibles biorreactores en volúmenes de menos de 1 litro hasta en exceso de 10.000 litros, por ejemplo, biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, NJ); biorreactores a escala de laboratorio y comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).
- 25 Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse como células adherentes en un sistema de cultivo discontinuo. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse como células adherentes en un sistema de cultivo de alimentación discontinua en el que se añaden nutrientes adicionales (por ejemplo, fuente de carbono, aminoácidos, etc.) a medida que se agotan del medio de partida para facilitar el crecimiento hasta altas densidades celulares. Las células MDCK de la invención pueden cultivarse como células
- 30 adherentes en un sistema de cultivo de perfusión. Se contempla específicamente que las células MDCK descritas en el presente documento se cultivarán en un sistema de perfusión (por ejemplo, en un fermentador de recipiente con agitación, usando sistemas de retención de células conocidos por el experto en la técnica, tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, filtros de centrifugación y similares) para la producción de material de vacuna (por ejemplo, virus). Puede encontrarse orientación adicional referente al cultivo de células MDCK como células adherentes, por
- 35 ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.^{os} 2003/0108860 y 2005/0118140. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse como células no adherentes en un sistema de cultivo discontinuo o de alimentación discontinua. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse como células no adherentes en un sistema de cultivo de perfusión.
- 40 Se utiliza un sistema de reactor que comprende elementos desechables tales como una bolsa de plástico flexible para cultivar células. Tales sistemas de reactor se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. Véanse por ejemplo las publicaciones de patente internacionales WO 05/108546; WO 05/104706; y WO 05/10849 y la sección 8.12 a continuación. Los sistemas de reactor que comprenden elementos desechables (también denominados en el presente documento "biorreactor(es) de uso único" o mediante la abreviatura "SUB") pueden
- 45 esterilizarse previamente y no requieren un entorno de vapor en el sitio (*steam-in-place*) (SIP) o limpieza en el sitio (*clean-in-place*) (CIP) para cambiar de lote a lote o de producto a producto en un sistema de producción o cultivo. Como tales, los SUB requieren menos control regulador garantizando una contaminación lote a lote nula y, por tanto, pueden hacerse funcionar a una razón coste-ventaja considerable y con preparación nula o mínima antes de su uso. Adicionalmente, puesto que los SUB no requieren limpieza o esterilización pueden utilizarse rápidamente para
- 50 facilitar la producción de grandes cantidades de material de vacuna (por ejemplo, virus) a partir de cultivo celular. Un sistema de reactor desechable puede ser un sistema de reactor de tanque con agitación que permite un entorno hidrodinámico para el mezclado del cultivo celular que permite un control de nutrientes, O₂ y pH más eficaz.
- Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse a una concentración de CO₂ de al menos
- 55 el 1%, o de al menos el 2%, o de al menos el 3%, o de al menos el 4%, o de al menos el 5%, o de al menos el 6%, o de al menos el 7%, o de al menos el 8%, o de al menos el 9%, o de al menos el 10%, o de al menos el 20%.
- La concentración de oxígeno disuelto (OD) (valor de pO₂) puede regularse ventajosamente durante el cultivo de las células MDCK descritas en el presente documento y está en el intervalo de desde el 5% y el 95% (basándose en la saturación de aire), o entre el 10% y el 60%. La concentración de oxígeno disuelto (OD) (valor de pO₂) puede ser de
- 60 al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 50%, o al menos el 60%.
- El pH del medio de cultivo usado para el cultivo de las células MDCK descritas en el presente documento puede regularse durante el cultivo y puede estar en el intervalo de desde pH 6,4 hasta pH 8,0, o en el intervalo de desde
- 65 pH 6,8 hasta pH 7,4. El pH del medio de cultivo puede estar a aproximadamente 6,4, o a aproximadamente 6,6, o a aproximadamente 6,8, o a aproximadamente 7,0, o a aproximadamente 7,2, o a aproximadamente 7,4, o a

aproximadamente 7,6, o a aproximadamente 7,8, o al menos 8,0.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse a una temperatura de 25°C a 39°C. Se contempla específicamente que la temperatura del cultivo pueda variarse dependiendo del proceso deseado. Por ejemplo, las células MDCK descritas en el presente documento pueden hacerse crecer a 37°C para la proliferación de las células y a una temperatura inferior (por ejemplo, de 25°C a 35°C) para la producción de material de vacuna (por ejemplo, virus). Las células pueden cultivarse a una temperatura de menos de 30°C, o de menos de 31°C, o de menos de 32°C, o de menos de 33°C, o de menos de 34°C para la producción de material de vacuna. Las células pueden cultivarse a una temperatura de 30°C, o 31°C, o 32°C, o 33°C, o 34°C para la producción de material de vacuna.

Con el fin de generar material de vacuna (por ejemplo, virus) se contempla específicamente que las células MDCK descritas en el presente documento puedan cultivarse de manera que el medio pueda intercambiarse fácilmente (por ejemplo, un sistema de perfusión). Las células pueden cultivarse hasta una densidad celular muy alta, por ejemplo hasta entre 1×10^6 y 25×10^6 células/ml. El contenido en glucosa, glutamina, lactato, así como el valor de pH y pO_2 en el medio y otros parámetros, tales como agitación, conocidos por el experto en la técnica pueden manipularse fácilmente durante el cultivo de las células MDCK de la invención de manera que la densidad celular y/o producción de virus pueden optimizarse.

También se describen en el presente documento métodos para hacer proliferar células (por ejemplo, células MDCK descritas en el presente documento) en cultivo hasta una alta densidad celular cultivando dichas células en un SUB. Pueden cultivarse células MDCK en un sistema de SUB hasta una densidad celular de al menos 5×10^5 células/ml, al menos $7,5 \times 10^5$ células/ml, al menos 1×10^6 células/ml, al menos $2,5 \times 10^6$ células/ml, al menos 5×10^6 células/ml, al menos $7,5 \times 10^6$ células/ml, al menos 10×10^6 , al menos 15×10^6 células/ml, al menos 20×10^6 células/ml o al menos 25×10^6 células/ml. Pueden cultivarse células MDCK en un SUB en medio libre de suero tal como los descritos a continuación (véase, por ejemplo, la sección 8.10) que se ha complementado con glucosa adicional. Por ejemplo, puede utilizarse MediV-105 complementado con 4,5 g/l adicionales de glucosa (concentración de glucosa total de 9,0 g/l). Pueden cultivarse células MDCK en un SUB como células adherentes sobre un microportador. El microportador puede usarse a una concentración de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 g/l. El microportador se usa a una concentración de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 g/l. El SUB puede sembrarse con las células MDCK que van a cultivarse a una densidad de siembra de aproximadamente 5 a aproximadamente 15×10^4 células/ml. La densidad de siembra puede ser de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 14×10^4 células/ml, o entre aproximadamente 7 y aproximadamente 13×10^4 células/ml, o entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12×10^4 células/ml, o entre aproximadamente 9 y aproximadamente 11×10^4 células/ml. Resultará evidente para un experto en la técnica que la densidad de siembra también puede calcularse en una base por microportador. Por consiguiente, el SUB puede sembrarse con las células MDCK que van a cultivarse a una densidad de siembra de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 células/microportador, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 células/microportador, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 células/microportador, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 células/microportador, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 células/microportador, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 células/microportador, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 células/microportador, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 células/microportador, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 células/microportador, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 células/microportador, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 células/microportador, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 células/microportador.

Las células MDCK pueden cultivarse en un SUB de tanque con agitación en el que uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en temperatura, velocidad de agitación, pH, oxígeno disuelto (OD), velocidad de flujo de O_2 y CO_2 se monotorizan y/o se controlan. La temperatura puede mantenerse a entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 42°C, o entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 39°C, o entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 38°C. La temperatura puede mantenerse a aproximadamente entre aproximadamente 36°C y aproximadamente 37°C. La velocidad de agitación puede mantenerse a entre aproximadamente 50 y 150 rpm. La velocidad de agitación puede mantenerse a entre aproximadamente 80 y aproximadamente 120 rpm, o entre aproximadamente 90 y aproximadamente 100 rpm. Las velocidades de agitación se controlan mediante medios bien conocidos en la técnica. El pH del cultivo puede mantenerse a entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5. El pH del cultivo de partida puede ser de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5 y el pH del cultivo se mantiene a de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5 durante el proceso de cultivo. Un experto en la técnica entenderá que el pH inicial puede ser inferior o superior al intervalo deseado y que puede permitirse que el pH aumente o disminuya hasta el nivel deseado (por ejemplo, 7,4) en el que se mantiene. El pH se mantiene mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo el pH puede controlarse rociando CO_2 y/o añadiendo ácido (por ejemplo, HCl) o base (por ejemplo, NaOH) según sea necesario. El intervalo aceptable para el OD puede ser de entre aproximadamente el 100 y aproximadamente el 35%. El OD puede mantenerse a entre aproximadamente el 35% y aproximadamente 50%, o a aproximadamente el 50%. El OD puede no disminuir por debajo de aproximadamente el 35%. Un experto en la técnica entenderá que el OD inicial puede ser del 100% y que puede permitirse que el OD disminuya hasta un nivel predeterminado (por ejemplo, el 50%) en el que se mantiene. El OD se mantiene usando cualquier método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, rociando O_2 . La

velocidad de flujo de O₂ se mantiene a menos de aproximadamente 2,0 l/min. La velocidad de flujo de CO₂ puede mantenerse a menos de aproximadamente 0,4 l/min.

Producción de material de vacuna (por ejemplo, virus)

5 También se describe en el presente documento un método para la producción de virus en cultivo celular en el que se usan células MDCK para producir virus. En el método, las células MDCK descritas en el presente documento pueden usarse para producir virus. El proceso puede comprender las siguientes etapas:

- 10 a. infectar una composición de cultivo celular que comprende una célula MDCK descrita en el presente documento con un virus,
- b. incubar la composición de cultivo celular en condiciones que permiten la replicación del virus; y
- 15 c. aislar virus de la composición de cultivo celular.

Las células MDCK descritas en el presente documento pueden hacerse proliferar antes de la etapa (a) como células adherentes. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden hacerse proliferar antes de la etapa (a) como células no adherentes. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse en el transcurso del proceso en cualquier medio incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos anteriormente. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse en el transcurso del proceso en un medio libre de suero tal como, por ejemplo, MediV-101, MediV-102, MediV-103, MediV-104, MediV-105, MediV-107, M18M y formulaciones APF de los mismos. Las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse en un medio libre de suero complementado con glucosa. Opcionalmente, las células MDCK descritas en el presente documento pueden cultivarse en el transcurso del proceso en un medio que contiene suero (por ejemplo, DMEM + FBS al 10% + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l). Condiciones de cultivo adicionales tales como, por ejemplo, temperatura, pH, pO₂, concentración de CO₂ y densidad celular se describen en detalle anteriormente. Un experto en la técnica puede establecer una combinación de condiciones de cultivo para la proliferación de las células MDCK descritas en el presente documento para la producción de virus.

La temperatura para la proliferación de las células antes de la infección con virus es en una realización de entre 22°C y 40°C. La temperatura para la proliferación de las células antes de la infección con virus puede ser de menos de 39°C, o menos de 38°C, o menos de 37°C, o menos de 36°C, o menos de 35°C, o menos de 34°C, o menos de 33°C, o menos de 32°C, o menos de 30°C, o menos de 28°C, o menos de 26°C, o menos de 24°C. La temperatura para la proliferación de las células antes de la infección con virus puede ser de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 39°C. El cultivo para la proliferación de las células puede llevarse a cabo en una realización del método en un sistema de perfusión, por ejemplo en un fermentador de recipiente con agitación, usando sistemas de retención de células conocidos por el experto en la técnica, tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, filtros de centrifugación, microportadores y similares. El cultivo para la proliferación de las células puede llevarse a cabo en un sistema de SUB.

Las células, por ejemplo, pueden hacerse proliferar en este caso durante de 1 a 20 días, o durante de 3 a 11 días. El intercambio del medio se lleva a cabo en el transcurso de esto, aumentando desde 0 hasta aproximadamente de 1 a 5 volúmenes de fermentador al día. Alternativamente, el medio de crecimiento se complementa con y/o comprende componentes adicionales (por ejemplo, glucosa, mineral traza, aminoácidos, etc.) de manera que no se requiere intercambio de medio. Las células pueden hacerse proliferar hasta altas densidades celulares de esta manera, por ejemplo hasta al menos 1 x10⁶-25x10⁶ células/ml. Las velocidades de perfusión durante el cultivo en el sistema de perfusión pueden regularse por medio del recuento de células, el contenido en glucosa, glutamina o lactato en el medio y por medio de otros parámetros conocidos por el experto en la técnica. Alternativamente, las células pueden cultivarse en un proceso discontinuo o proceso de alimentación discontinua.

En el proceso descrito en el presente documento el pH, el valor de pO₂, la concentración de glucosa y otros parámetros del medio de cultivo para cultivar las células puede regularse durante el cultivo tal como se describió anteriormente usando métodos conocidos por el experto en la técnica.

Una porción del medio puede intercambiarse antes de la etapa (a). La porción del medio que va a intercambiarse puede ser de entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 100%, o entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 80%, o entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 60%, o entre aproximadamente el 66% y aproximadamente el 80%. El medio puede intercambiarse por un volumen igual de medio. El medio puede intercambiarse por un volumen reducido de medio, concentrando eficazmente las células. El medio puede intercambiarse por un medio que tiene la misma o diferente composición. Un medio de crecimiento usado para la proliferación de las células MDCK puede intercambiarse por un medio de infección (es decir, un medio usado durante la infección y replicación viral). Las células MDCK pueden hacerse proliferar en MediV-105, MediV-107 o M18M y antes de la infección una porción del medio se intercambia por un medio de infección. Alternativamente, el medio de crecimiento se complementa con y/o comprende componentes adicionales (por ejemplo, glucosa, mineral traza, aminoácidos, etc.) de manera que no se requiere intercambio de medio. En otra realización específica, el

medio de infección comprende una serina proteasa (por ejemplo, tripsina, TrypLE, etc.). En otras realizaciones en las que el medio no se intercambia, se añade una serina proteasa (por ejemplo, tripsina, TrypLE, etc.) poco antes, durante o poco después de la infección.

- 5 Puede añadirse una proteasa antes de o al mismo tiempo que se infectan las células con virus.

La infección de las células con virus puede llevarse a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección, también abreviada en el presente documento como "MOI") de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 1, o de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 0,0003, o de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 0,0001, o de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,5, o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,003. La infección de las células con virus puede llevarse a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de 0,0001 a 10, o de 0,0005 a 5, o de 0,002 a 0,5 o de 0,001 a 0,003. Alternativamente, la infección de células con virus se determina mediante la concentración final de virus en el cultivo. Por ejemplo, puede añadirse virus a una concentración final de aproximadamente $0,001 \times 10^3/\text{ml}$ a aproximadamente $0,2 \times 10^3/\text{ml}$, o de aproximadamente $0,01 \times 10^3/\text{ml}$ a aproximadamente $2 \times 10^3/\text{ml}$, o de aproximadamente $0,1 \times 10^3/\text{ml}$ a aproximadamente $20 \times 10^3/\text{ml}$, o de aproximadamente $1 \times 10^3/\text{ml}$ a aproximadamente $4 \times 10^3/\text{ml}$. Tras la infección, el cultivo celular infectado se cultiva adicionalmente para replicar los virus, en particular hasta que puede detectarse un efecto citopático máximo o una cantidad máxima de antígeno de virus. Tras la infección, las células pueden cultivarse a una temperatura de entre 22°C y 40°C. Tras la infección con virus las células pueden cultivarse a una temperatura de menos de 39°C, o menos de 38°C, o menos de 37°C, o menos de 36°C, o menos de 35°C, o menos de 34°C, o menos de 33°C, o menos de 32°C, o menos de 30°C, o menos de 28°C, o menos de 26°C, o menos de 24°C. Tras la infección con virus las células pueden cultivarse a una temperatura de 33°C. Tras la infección las células pueden cultivarse a una temperatura de menos de 33°C. Tras la infección las células pueden cultivarse a una temperatura de 31°C. El cultivo de las células puede llevarse a cabo durante de 2 a 10 días. El cultivo puede llevarse a cabo en el sistema de perfusión u opcionalmente en el proceso discontinuo o proceso de alimentación discontinua.

Las células, por ejemplo, pueden cultivarse tras la infección con virus (etapa (b)) de manera que el valor de pH y pO_2 se mantenga tal como se describió anteriormente. Durante el cultivo de las células antes de la etapa (a) y/o la replicación de virus según etapa (b) del proceso, también es posible una sustitución del medio de cultivo celular por medio recién preparado, concentrado de medio o por constituyentes definidos tales como aminoácidos, vitaminas, fracciones lipídicas, fosfatos etc. para optimizar el rendimiento de antígeno. Las células o bien pueden diluirse lentamente mediante la adición adicional de medio o concentrado de medio a lo largo de varios días o bien pueden incubarse durante la perfusión adicional con medio o concentrado de medio. Las velocidades de perfusión pueden regularse a su vez en este caso por medio del recuento de células, el contenido en glucosa, glutamina, lactato o lactato deshidrogenasa en el medio u otros parámetros conocidos por el experto en la técnica. Además es posible una combinación del sistema de perfusión con un proceso de alimentación discontinua.

En el proceso, la cosecha y el aislamiento de los virus producidos (etapa (c)) puede llevarse a cabo tras un periodo suficiente para producir rendimientos de virus adecuados, tal como de 2 a 10 días, u opcionalmente de 3 a 7 días, tras la infección. En el proceso, la cosecha y el aislamiento de los virus producidos (etapa (c)) puede llevarse a cabo 2 días, o 3 días, o 4 días, o 5 días, o tras 6 días, o 7 días, o 8 días, o 9 días, o 10 días tras la infección.

Los virus que pueden producirse en las células MDCK descritas en el presente documento incluyen pero no se limitan a, virus animales, incluyendo las familias de Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Togaviridae, Herpesviridae, Rhabdoviridae, Retroviridae, Reoviridae, Flaviviridae, Adenoviridae, Picornaviridae, Arenaviridae y Poxviridae.

También se han desarrollado en los últimos años sistemas para producir virus influenza en cultivo celular (véanse, por ejemplo, Furminger, en Textbook of Influenza, ed Nicholson, Webster y Hay, págs. 324-332, Blackwell Science (1998); Merten *et al.* en Novel Strategies in The Design and Production of Vaccines, ed Cohen & Shafferman, págs. 141-151, Kluwer Academic (1996)). Normalmente, estos métodos implican la infección de células huésped adecuadas con una cepa de virus seleccionada. Aunque se eliminan muchas de las dificultades relacionadas con la producción de vacunas en huevos de gallina, no todas las cepas patógenas de influenza crecen bien y pueden producirse según métodos de cultivo tisular establecidos. Además, muchas cepas con características deseables, por ejemplo, atenuación, sensibilidad a la temperatura y adaptación al frío, adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas, no se han hecho crecer satisfactoriamente, especialmente a escala comercial, en cultivo tisular usando métodos establecidos.

También se describen en el presente documento líneas de células MDCK que se han adaptado a crecer en medios o bien que contienen suero o bien libres de suero y que pueden soportar la replicación de virus, incluyendo, pero sin limitarse a, influenza, cuando se cultivan. Estas líneas celulares son adecuadas para la replicación económica de virus en cultivo celular para su uso como material de vacuna. Las células MDCK descritas en el presente documento son particularmente útiles para la producción de cepas de influenza adaptadas al frío, sensibles a la temperatura (ca/ts) (por ejemplo, las cepas de influenza encontradas en FluMist®) que no crecen bien usando otras líneas celulares establecidas. Además, las células MDCK descritas en el presente documento son útiles para la producción de cepas de influenza que no pueden hacerse crecer en huevos embrionados tales como virus influenza aviar que

también pueden provocar enfermedad en seres humanos (por ejemplo, una cepa “pandémica”).

Los virus influenza que pueden producirse mediante el proceso descrito en el presente documento en las células MDCK descritas en el presente documento incluyen pero no se limitan a virus reordenantes que incorporan antígenos de hemaglutinina y/o neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra atenuada, sensible a la temperatura, adaptada al frío (ca/ts/att). Por ejemplo, los virus pueden comprender las estructuras principales (o uno o más segmentos de ARNv) de cepas maestras que son una o más de, por ejemplo, sensibles a la temperatura (ts), adaptadas al frío (ca) o atenuadas (att) (por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66, PR8, B/Leningrado/14/17/55, B/14/5/1, B/URSS/60/69, B/Leningrado/179/86, B/Leningrado/14/55, B/Inglaterra/2608/76, etc.). Se conocen en la técnica métodos para la producción de cepas de vacuna de influenza reordenantes o bien en huevos o bien en líneas celulares e incluyen, por ejemplo, Kilbourne, E.D. en *Vaccines* (2ª edición), ed. Plotkin y Mortimer, WB Saunders Co. (1988) y los dados a conocer en las publicaciones de patente PCT de solicitud PCT n.º WO 05/062820 y WO 03/091401, y en las patentes estadounidenses n.ºs 6.951.754, 6.887.699, 6.649.372, 6.544.785, 6.001.634, 5.854.037, 5.824.536, 5.840.520, 5.820.871, 5.786.199 y 5.166.057 y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.ºs 20060019350, 20050158342, 20050037487, 20050266026, 20050186563, 20050221489, 20050032043, 20040142003, 20030035814 y 20020164770. Otros virus influenza que pueden producirse mediante los procesos de la de la invención en las células MDCK descritas en el presente documento incluyen virus influenza recombinantes que pueden expresar un producto génico heterólogo, véanse por ejemplo las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2004/0241139 y 2004/0253273.

Las células pueden hacerse proliferar y las células se infectan entonces con virus influenza. En determinadas realizaciones, la infección se lleva a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de 0,0001 a 10, o de 0,0005 a 5, o de 0,002 a 0,5 de 0,0001 a 0,002 o de 0,00001 a 0,002. La infección puede llevarse a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,5, o de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,002 o de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 0,002. Opcionalmente puede añadirse una proteasa que provoca la escisión de la proteína precursora de hemaglutinina [HA₀] y por tanto la adsorción de los virus sobre las células. La adición de una proteasa puede llevarse a cabo poco antes, simultáneamente con o poco después de la infección de las células con virus influenza. Si la adición se lleva a cabo simultáneamente con la infección, la proteasa o bien puede añadirse directamente al cultivo celular que va a infectarse o, por ejemplo, como un concentrado junto con el inóculo de virus. La proteasa puede ser una serina proteasa, o una cisteína proteasa, o una asparagina proteasa. Puede usarse tripsina. Puede usarse tripsina tratada con TPCK. Puede usarse la proteasa de *Streptomyces griseus* descrita en la solicitud estadounidense n.º 11/455.818. La tripsina puede ser de una fuente animal o, más preferiblemente, es de una fuente recombinante.

Puede añadirse tripsina al cultivo celular hasta una concentración final de 1 a 5000 mU/ml, o de 5 a 1000 mU/ml, o de 100 a 500 mU/ml. Puede añadirse tripsina al cultivo celular hasta una concentración final de 1 a 200 µg/ml, o de 5 a 50 µg/ml, o de 5 a 30 µg/ml en el medio de cultivo. Durante el cultivo adicional de las células infectadas según la etapa (iii) del proceso según la invención, puede llevarse a cabo la reactivación de la tripsina mediante la adición nueva de tripsina en el caso del proceso discontinuo o de alimentación discontinua o en el caso del sistema de perfusión mediante la adición continua de una disolución de tripsina o mediante adición intermitente.

Tras la infección, el cultivo celular infectado se cultiva adicionalmente para replicar los virus, en particular hasta que puede detectarse un efecto citopático máximo o una cantidad máxima de virus y/o antígeno de virus. El cultivo de las células puede llevarse a cabo durante de 2 a 10 días. El cultivo puede llevarse a cabo a su vez en el sistema de perfusión u opcionalmente en el proceso discontinuo o de alimentación discontinua. Las células pueden cultivarse a una temperatura de 25°C a 36°C, o de 29°C a 34°C, tras la infección con virus influenza. El cultivo de las células infectadas a temperaturas por debajo de 33°C, en particular en los intervalos de temperatura indicados anteriormente, conduce a la producción de rendimientos superiores de determinados virus influenza, tales como, por ejemplo cepas B (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense 2006/0153872). Además, se contempla el cultivo de las células infectadas a temperaturas por debajo de 35°C para la producción de virus influenza sensible a la temperatura, adaptado al frío (ts/ca). Se contempla que los virus ts/ca también puedan estar atenuados (att). Las células pueden cultivarse a una temperatura de menos de 30°C, o de menos de 31°C, o de menos de 32°C, o de menos de 33°C, o de menos de 34°C para la producción de cepas de influenza ts/ca. Las células pueden cultivarse a una temperatura de 31°C para la producción de cepas B de virus influenza.

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

En el proceso, la cosecha y el aislamiento de los virus influenza producidos (etapa (iii)) puede llevarse a cabo tras un periodo suficiente para producir rendimientos de virus adecuados, tal como de 2 a 10 días, o 3 a 7 días, tras la infección. Normalmente se recuperan los virus del medio de cultivo, en el que se han hecho crecer las células infectadas. Normalmente se clarifica el medio bruto antes de la concentración de virus influenza. Los métodos comunes incluyen filtración, ultrafiltración, adsorción sobre sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, puede clarificarse en primer lugar el medio bruto de cultivos infectados mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para eliminar los residuos celulares y otra materia particulada grande, por

ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Alternativamente, se filtra el medio a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,8 µm para eliminar células intactas y otra materia particulada grande. Opcionalmente; se centrifuga entonces el sobrenadante de medio clarificado para sedimentar los virus influenza, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Tras la resuspensión del sedimento de virus en un tampón apropiado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,0001 M) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, puede concentrarse el virus mediante centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa (al 60%-12%) o tartrato de potasio (al 50%-10%). Son adecuados gradientes o bien continuos o bien escalonados, por ejemplo, un gradiente de sacarosa de entre el 12% y el 60% en cuatro etapas del 12%. Se centrifugan los gradientes a una velocidad y durante un tiempo suficientes para que los virus se concentren en una banda visible para su recuperación.

Alternativamente, y para la mayoría de las aplicaciones comerciales a gran escala; el virus se leviga de los gradientes de densidad usando un rotor de centrifuga zonal que funciona en un modo continuo. Se proporcionan detalles adicionales suficientes para guiar a un experto en la preparación de virus influenza a partir de cultivo celular, por ejemplo, en Furminger, en *Textbook of Influenza* págs. 324-332 Nicholson *et al.* (ed); Merten *et al.*, en *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* págs. 141-151 Cohen & Shafferman (ed) y la patente estadounidense n.º 5.690.937. Si se desea, los virus recuperados pueden almacenarse a -80°C en presencia de un estabilizador, tal como sacarosa-fosfato-glutamato (SPG).

El virus puede tratarse con Benzonase® u otra endonucleasa no específica. Opcionalmente, el tratamiento con Benzonase® se produce de manera temprana en la cosecha y el aislamiento de los virus influenza producidos. En el proceso, tras el tratamiento con Benzonase®, el material puede clarificarse. Los métodos útiles para la clarificación incluyen pero no se limitan a filtración de flujo directo (DFF). Las etapas adicionales que pueden utilizarse para la cosecha y el aislamiento del virus influenza producido (etapa (iii)) incluyen pero no se limitan a filtración de flujo tangencial (TFF), cromatografía de afinidad así como cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de hidroxipatita. Puede usarse cromatografía de afinidad en el proceso. Un experto en la técnica entenderá que están disponibles una variedad de medios de cromatografía de afinidad con propiedades de separación similares, por ejemplo están disponibles numerosos medios de cromatografía de afinidad para la concentración y purificación de varios virus y proteínas virales. Puede utilizarse el medio de afinidad sulfato de Cellufine™ (Chisso Corp.) para la cromatografía de afinidad. Puede utilizarse FluSelect (GE Healthcare) para la cromatografía de afinidad. El virus puede tratarse con Benzonase® al mismo tiempo que un proceso de cromatografía de afinidad. Se usa cromatografía de membrana en el proceso. Se usa cromatografía de intercambio iónico en el proceso. Puede usarse cromatografía de intercambio catiónico en el proceso. Puede realizarse la cromatografía de intercambio catiónico a pH alto. Puede usarse cromatografía de intercambio aniónico en el proceso. Puede realizarse la cromatografía de intercambio aniónico a pH bajo. Las membranas aniónicas útiles para cromatografía de intercambio iónico incluyen, pero no se limitan a, adsorbentes de membrana aniónica (por ejemplo, Sartobind® Q15, D15) y adsorbentes de membrana catiónica (por ejemplo, Sartobind® S15 y C15). Se muestran a modo de ejemplo otras etapas en la sección de ejemplos a continuación.

Composiciones de vacuna y métodos de uso

También se describen en el presente documento virus (por ejemplo, influenza) que pueden obtenerse mediante un proceso de la invención. Estos virus pueden formularse mediante métodos conocidos para proporcionar una vacuna para su administración a seres humanos o animales. Los virus pueden estar presentes como partículas de virus intactos (por ejemplo, virus atenuados vivos) o como virus inactivos/disgregados (por ejemplo, tratados con detergentes de formaldehído). Opcionalmente, puede aislarse un componente viral definido (por ejemplo, proteína) de los virus mediante métodos conocidos por el experto en la técnica, y usarse en la preparación de una vacuna. Se conocen bien en la técnica métodos para la generación y formulación de partículas de virus inactivos/disgregados y se han utilizado durante más de 40 años.

La formulación de partículas de virus intactos (por ejemplo, virus atenuados vivos) puede incluir etapas adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, un intercambio de tampón mediante filtración para dar una formulación final seguido por una etapa de esterilización. Los tampones útiles para una formulación de este tipo pueden contener sacarosa 200 mM y un tampón fosfato o histidina de pH 7,0-7,2 con la adición de otros excipientes de aminoácido tales como arginina. Pueden añadirse hidrolizados de proteína de estabilización tales como colágeno o gelatina (por ejemplo, gelatina porcina, de pescado, aviar). Las vacunas/disoluciones virales finales descritas en el presente documento pueden comprender virus vivos que son estables en forma líquida durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su almacenamiento "en el campo" (por ejemplo, en venta y comercialización cuando se refrigera a 2-8°C, 4°C, 5°C, etc.) a lo largo de toda una estación de vacunación contra la gripe (por ejemplo, normalmente desde aproximadamente septiembre hasta marzo en el hemisferio norte). Por tanto, se desea que las composiciones de virus/vacuna conserven su potencia o pierdan su potencia a una velocidad aceptable a lo largo del periodo de almacenamiento. En otras realizaciones, tales disoluciones/vacunas son estables en forma líquida a desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C, por ejemplo, la temperatura de la nevera. Por ejemplo, se describen métodos y composiciones para formular una vacuna contra la gripe atenuada estable en la nevera en la publicación de patente PCT n.º WO/2006/041819; véase también la publicación de patente PCT WO/2005/014862.

Por tanto, también se describe en el presente documento una formulación de vacuna estable en la nevera que

comprende uno o más de lo siguiente (dentro del 10% de variación de uno o más componentes) en las formulaciones finales: arginina al 1-5%; gelatina al 1-4%; sacarosa al 5-10% (opcionalmente en un tampón fosfato); ácido glutámico al 0,01-0,1% (monosodio, monohidratado); fosfato de potasio 10-150 mM e histidina 80-150 mM.

La formulación de vacuna puede comprender uno o más de lo siguiente (dentro del 10% de variación de uno o más componentes): arginina al 1-2%; gelatina al 2%; sacarosa al 7-10% (opcionalmente en un tampón fosfato); e histidina 100 mM. En otra realización específica, la formulación de vacuna comprende uno o más de lo siguiente (dentro del 10% de variación de uno o más componentes): arginina al 1-2%; gelatina al 1%; y sacarosa al 7-10% en un tampón fosfato.

También se describe en el presente documento una formulación de vacuna estable en la nevera que comprende uno o más de lo siguiente en las formulaciones finales: sacarosa: al 6-8% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1-2% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidratado al 0,05-0,1% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes tales como de pescado o aviar) al 0,5-2% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1-2%; y fosfato de potasio monobásico al 0,25-1% p/v.

La formulación de vacuna puede comprender uno o más de lo siguiente: sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094 p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v. En otra realización específica, la formulación de vacuna comprende todo lo siguiente: sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v.

La formulación de vacuna puede comprender todo lo siguiente (dentro del 10% de variación de uno o más componentes): sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v. La formulación de vacuna puede comprender todo lo siguiente (dentro del 10% de variación de uno o más componentes): sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v. Las formulaciones pueden estar en tampón (por ejemplo, un tampón fosfato de potasio (pH 7,0-7,2)). Las formulaciones de vacuna pueden comprender todo lo siguiente (dentro del 20% de variación de uno o más componentes): sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v.

La formulación de vacuna puede comprender todo lo siguiente (dentro del 30% de variación de uno o más componentes): sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v. Todavía en otra realización específica, la formulación de vacuna comprende todo lo siguiente (dentro del 40% de variación de uno o más componentes): sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v.

La formulación de vacuna puede comprender todo lo siguiente (dentro del 1% de variación de uno o más componentes): sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v. En otra realización específica, la formulación de vacuna comprende todo lo siguiente (dentro del 3% de variación de uno o más componentes): sacarosa: al 6,84% peso/volumen (p/v); monoclórhidrato de arginina al 1,21% p/v; ácido glutámico, monosodio monohidrato al 0,094% p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de tipo A (u otras fuentes) al 1% p/v; fosfato de potasio dibásico al 1,13%; y fosfato de potasio monobásico al 0,48% p/v. La formulación de vacuna pueden contener, por ejemplo, fosfato de potasio (por ejemplo, al menos 50 mM, o al menos 100 mM, o al menos 200 mM, o al menos 250 mM) como tampón o, alternativamente, histidina (por ejemplo, al menos 50 mM, o al menos 100 mM, o al menos 200 mM, o al menos 250 mM).

Opcionalmente, puede utilizarse secado por pulverización, un proceso de secado rápido mediante el cual la alimentación líquida de la formulación se atomiza por pulverización para dar gotitas finas bajo una corriente de gas calentado seco, para extender el tiempo de almacenamiento de una formulación de vacuna. La evaporación de las gotitas finas da como resultado polvos secos compuestos por los solutos disueltos (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0042972).

Generalmente, pueden administrarse profilácticamente virus o componentes virales en un portador o excipiente apropiado para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas de virus. Normalmente, el portador o excipiente es un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, disolución

salina acuosa, disoluciones salinas tamponadas acuosas, disoluciones de dextrosa acuosas, disoluciones de glicerol acuosas, etanol o combinaciones de los mismos. La preparación de tales disoluciones garantizando la esterilidad, el pH, la isotonicidad y la estabilidad se efectúa según protocolos establecidos en la técnica. Generalmente, se selecciona un portador o excipiente para minimizar efectos alérgicos y otros efectos no deseados y para adecuarse a la vía de administración particular, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

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

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

VIRUS INFLUENZA

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

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

Se producen virus reordenantes para que incorporen antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra aprobada también denominada virus donador maestro (VDM). FluMist® usa cepas de VDM adaptadas al frío, atenuadas, sensibles a la temperatura aprobadas (por ejemplo, A/AnnArbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66).

Varios métodos son útiles para la generación de virus reordenantes incluyendo métodos basados en huevos y más recientemente métodos de cultivo celular. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 03/091401; WO 05/062820 y las patentes estadounidenses n.^{os} 6.544.785; 6.649.372; 6.951.75, y las solicitudes de patente estadounidense n.^{os} 11/455.818, 11/455.734 y 11/501.067. Se contempla que las células MDCK, los medios y los métodos descritos en el presente documento son útiles para la producción de virus influenza incluyendo, pero sin limitarse a, las cepas de influenza dadas a conocer en el presente documento (por ejemplo, A/AnnArbor/6/60 y B/AnnArbor/1/66) y virus reordenantes que comprenden genes de las A/AnnArbor/6/60, B/AnnArbor/1/66, PR8. Se contempla además que las células MDCK, los medios y los métodos dados a conocer en el presente documento son útiles para la producción de virus influenza, incluyendo virus reordenantes, que tienen uno o más de los siguientes fenotipos, sensible a la temperatura, adaptado al frío, atenuado. Pueden generarse reordenantes mediante técnicas de reordenamiento clásicas, por ejemplo mediante métodos de coinfección u opcionalmente mediante técnicas de rescate de plásmido (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 03/091401 y WO 05/062820; patentes estadounidenses n.^{os} 6.544.785, 6.649.372, 6.951.754, 6.887.699, 6.001.634, 5.854.037, 5.824.536, 5.840.520, 5.820.871, 5.786.199 y 5.166.057; publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.^{os} 20060019350, 20050158342, 20050037487, 20050266026, 20050186563, 20050221489, 20050032043, 20040142003, 20030035814 y 20020164770; y Neumann *et al.* (1999) Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9345-9350; Fodor *et al.* (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J. Virol* 73:9679-9682; Hoffmann *et al.* (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6108-6113; WO 01/83794; Hoffmann y Webster (2000), Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids, 81:2843-2847; y Hoffmann *et al.* (2002), Rescue of influenza B. viruses from 8 plasmids, 99(17): 11411-11416.

Por consiguiente, también se describe en el presente documento una célula MDCK descrita en el presente documento que comprende uno o más segmentos genómicos de un virus influenza. La célula puede comprender los ocho segmentos genómicos de un virus influenza. Los ocho segmentos genómicos pueden ser cada uno del mismo virus influenza. Los ocho segmentos genómicos puede ser de uno, dos o más virus influenza diferentes. Los ocho segmentos genómicos pueden comprender dos segmentos que codifican para HA y NA, respectivamente, de cualquier cepa de influenza conocida por un experto en la técnica sin limitación y los restantes segmentos genómicos son de un virus influenza adaptado al frío y/o sensible a la temperatura y/o atenuado. La célula puede comprender cualquier segmento genómico de influenza descrito en cualquiera de las publicaciones descritas anteriormente.

Puntos específicos

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. También se describen en el presente documento los siguientes puntos.

1. Una célula de riñón canino Madin-Darby (MCDK), en la que una composición de cultivo celular que comprende una pluralidad de las células MDCK soporta la replicación de un virus influenza atenuado, adaptado al frío, sensible a la temperatura hasta un logaritmo en base 10 de la mediana de la dosis de infección en cultivo tisular por mililitro ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml) de al menos aproximadamente 7,0 o hasta un logaritmo en base 10 de unidades de focos fluorescentes por mililitro ($\log_{10}$ FFU/ml) de al menos aproximadamente 7,0.

2. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,2 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,2.

3. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,4 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,4.

4. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,6 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,6.

5. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,8 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,8.

6. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos 8,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,0.

7. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos 8,2 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,2.

8. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos 8,4 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,4.

9. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos 8,6 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,6.

10. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos 8,8 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,8.
- 5 11. La célula MDCK del punto 1, en la que las células MDCK soportan la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos 9,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 9,0.
12. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK crece en medio libre de suero.
- 10 13. La célula MDCK del punto 1, en la que el medio libre de suero es un medio libre de proteínas animales.
14. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK es adherente.
- 15 15. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK no es adherente.
16. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK no es tumorigénica.
17. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK no es oncogénica.
- 20 18. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK se deriva de una línea de células MDCK identificada mediante el n.º de registro de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) CCL34.
19. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK se deriva de una línea de células MDCK identificada mediante el n.º de registro de la ATCC PTA-6500, PTA-6501, PTA-6502 o PTA-6503.
- 25 20. La célula MDCK del punto 1, en la que la célula MDCK se identifica mediante el n.º de registro de la ATCC PTA-7909 o PTA-7910.
21. La célula MDCK de la realización 1, en la que el virus influenza es un virus influenza A.
- 30 22. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza es un virus influenza B.
23. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza es un virus adaptado al frío.
- 35 24. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza es un virus sensible a la temperatura.
25. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza es un virus atenuado.
26. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza es un virus atenuado, adaptado al frío y sensible a la temperatura virus.
- 40 27. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza comprende uno o más segmentos génicos de un virus influenza sensible a la temperatura, atenuado y adaptado al frío.
- 45 28. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza comprende uno o más segmentos génicos de la cepa de influenza A/Ann Arbor/6/60.
29. La célula MDCK del punto 1, en la que el virus influenza comprende uno o más segmentos génicos de B/Ann Arbor/1/66.
- 50 30. Un método para hacer proliferar la célula MDCK de cualquiera de los puntos anteriores hasta una densidad celular de al menos aproximadamente 1×10^6 células/ml en un sistema de SUB que comprende inocular un medio de cultivo celular con la célula MDCK de cualquiera de las realizaciones anteriores a una densidad de siembra de entre aproximadamente 8×10^4 y aproximadamente 12×10^4 células/ml y cultivar las células mientras se mantienen una o más condiciones de cultivo seleccionadas del grupo que consiste en:
 - a. una velocidad de agitación de entre aproximadamente 50 y 150 rpm;
 - b. un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5;
 - 60 c. oxígeno disuelto (OD) entre aproximadamente el 35% y aproximadamente el 100%; y
 - d. una temperatura de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 42°C.
- 65 31. El método del punto 30, en el que el medio de cultivo celular es un medio libre de suero.

32. El método del punto 30, en el que el medio de cultivo celular es un medio libre de proteínas animales.
33. El método del punto 30, en el que el medio de cultivo celular es MediV-105 complementado con glucosa, de M-32 o MediV-107.
- 5 34. El método del punto 30, en el que la velocidad de agitación es de entre aproximadamente 90 y aproximadamente 100 rpm.
- 10 35. El método del punto 30, en el que el OD es de entre aproximadamente el 35% y aproximadamente el 100%.
36. El método del punto 30, en el la temperatura es de entre aproximadamente 36°C y aproximadamente 38°C.
37. El método del punto 30, en el que se una un microportador para cultivar una célula MDCK adherente.
- 15 38. El método del punto 37, en el que la concentración de microportador es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 g/l.
39. Una composición de cultivo celular producida mediante el método de uno cualquiera del punto 30 al punto 38.
- 20 40. Una composición de cultivo celular que comprende células MCDK y un medio de cultivo celular, en la que la composición de cultivo celular soporta la replicación de un virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,0.
- 25 41. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,2 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,2.
42. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,4 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,4.
- 30 43. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,6 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,6.
- 35 44. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,8 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,8.
- 40 45. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,0.
- 45 46. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,2 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,2.
47. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,4 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,4.
- 50 48. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,6 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,6.
- 55 49. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,8 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,8.
- 60 50. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular de MDCK soporta la replicación del virus influenza hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 9,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 9,0.
- 65 51. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular no comprende suero animal.

52. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular no comprende una proteína purificada de un animal.
- 5 53. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular comprende una proteína expresada de manera recombinante.
54. La composición de cultivo celular del punto 53, en la que la proteína se expresa por al menos una de las células MDCK.
- 10 55. La composición de cultivo celular del punto 53, en la que la proteína se expresa en un sistema de expresión recombinante y luego se añade a la composición de cultivo celular.
56. La composición de cultivo celular del punto 53, en la que la proteína expresada de manera recombinante es insulina o tripsina.
- 15 57. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que al menos algunas de las células MDCK son adherentes.
58. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK son adherentes.
- 20 59. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que al menos algunas de las células MDCK no son adherentes.
60. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK no son adherentes.
- 25 61. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK no son tumorigénicas.
62. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se derivan de la línea de células MDCK identificada mediante el n.º de registro de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) CCL34.
- 30 63. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se derivan de una línea de células MDCK identificada mediante el n.º de registro de la ATCC PTA-6500, PTA-6501, PTA-6502 o PTA-6503.
64. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se identifican mediante el n.º de registro de la ATCC PTA-7909 o PTA-7910.
- 35 65. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus influenza es un virus influenza A.
66. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus influenza es un virus influenza B.
- 40 67. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus influenza es un virus adaptado al frío.
68. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus influenza es un virus atenuado.
69. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus influenza comprende uno o más segmentos génicos de un virus influenza sensible a la temperatura, atenuado y adaptado al frío.
- 45 70. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus influenza comprende uno o más segmentos génicos de la cepa de influenza A/Ann Arbor/6/60.
- 50 71. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus influenza comprende uno o más segmentos génicos de B/Ann Arbor/1/66.
72. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se cultivan a entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 33°C durante la replicación del virus influenza.
- 55 73. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK no comprenden ADN oncogénico detectable.
74. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular no comprende micoplasmas detectables.
- 60 75. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular no comprende bacterias detectables.
- 65 76. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que la composición de cultivo celular no comprende un virus detectable distinto de virus influenza.

77. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que el virus detectable es un virus que infecta células caninas o humanas.
- 5 78. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK no comprenden un virus latente.
79. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK no comprenden un retrovirus.
- 10 80. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se hacen crecer hasta una densidad celular de al menos aproximadamente 1×10^5 células/ml.
81. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se hacen crecer hasta una densidad celular de al menos aproximadamente 5×10^5 células/ml.
- 15 82. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se hacen crecer hasta una densidad celular de al menos aproximadamente 1×10^6 células/ml.
83. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se hacen crecer hasta una densidad celular de al menos aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml.
- 20 84. La composición de cultivo celular del punto 40, en la que las células MDCK se hacen crecer hasta una densidad celular de al menos aproximadamente 5×10^6 células/ml.
85. Un método para producir virus influenza en cultivo celular, que comprende:
- 25 a. infectar la composición de cultivo celular de cualquiera de los puntos 40-84 con un virus influenza,
- b. incubar la composición de cultivo celular en condiciones que permiten la replicación del virus influenza; y
- 30 c. aislar virus influenza de la composición de cultivo celular.
86. El método del punto 85, en el que se añade medio nuevo o componentes del medio adicionales al cultivo celular antes de o durante la etapa (a).
- 35 87. El método del punto 85, en el que no se elimina o se elimina algo del medio de cultivo celular y se reemplaza por medio nuevo antes de o durante la etapa (a).
88. El método del punto 85, en el que la etapa (a) se lleva a cabo a una multiplicidad de infección (MOI) de entre aproximadamente 0,00001 y aproximadamente 0,00003 FFU/célula.
- 40 89. El método del punto 85, en el que la etapa (a) se lleva a cabo a una MOI de entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 0,0003 FFU/célula.
90. El método del punto 85, en el que la etapa (a) se lleva a cabo a una MOI de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,003 FFU/célula.
- 45 91. El método del punto 85, en el que las condiciones de la etapa (b) se seleccionan del grupo que consiste en:
- a. una velocidad de agitación de entre aproximadamente 50 y 150 rpm;
- 50 b. un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5;
- c. oxígeno disuelto (OD) entre aproximadamente el 35% y aproximadamente el 100%; y
- 55 d. una temperatura de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 35°C.
92. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,0.
- 60 93. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,2 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,2.
94. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,4 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,4.
- 65 95. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos

aproximadamente 7,6 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,6.

96. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 7,8 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 7,8.

97. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,0.

98. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,2 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,2.

99. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,4 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,4.

100. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,6 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,6.

101. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 8,8 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 8,8.

102. El método del punto 85, en el que el virus influenza se replica hasta un $\log_{10}$ TCID₅₀/ml de al menos aproximadamente 9,0 y/o hasta un $\log_{10}$ FFU/ml de al menos aproximadamente 9,0.

103. Un virus influenza producido según el método de 85.

104. Una composición inmunogénica que comprende polipéptidos del virus influenza del punto 103 en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

105. Una composición inmunogénica que comprende el virus influenza del punto 103 en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

106. La composición inmunogénica del punto 105, en la que la composición inmunogénica es estable en la nevera.

107. Un método de eliminación de contaminantes de ADN de una preparación viral que comprende:

(a) hacer pasar la preparación viral sobre medios de cromatografía de afinidad en condiciones en las que los contaminantes de ADN no se retienen sobre los medios de cromatografía de afinidad y el virus presente en la preparación viral se retiene;

(b) lavar los medios de cromatografía de afinidad para eliminar los contaminantes de ADN; y

(c) eluir el virus presente en la preparación viral de los medios de cromatografía de afinidad.

108. El método del punto 107, en el que los medios de cromatografía de afinidad son resina de sulfato de Cellufine.

109. El método del punto 107, en el que entre las etapas (a) y (b) se hace pasar una preparación de endonucleasa no específica sobre los medios de cromatografía de afinidad.

110. El método del punto 108, en el que la endonucleasa no específica es una preparación de Benzonase que comprende Benzonase en tampón 1X SP a aproximadamente pH 7,2.

111. El método del punto 107, en el que la preparación viral es una preparación de virus influenza.

112. El método del punto 108, en el que la preparación de virus influenza se preparó a partir de células de mamífero.

113. El método del punto 112, en el que las células de mamífero son células MDCK o células Vero o células PerC6.

114. El método del punto 107, en el que las condiciones usadas en la etapa (a) son tampón 1X SP a aproximadamente pH 7,2.

115. El método del punto 107, en el que el virus presente en la preparación viral se eluye en tampón 1X SP que contiene NaCl aproximadamente 1 M a aproximadamente pH 7,2.

Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan para el fin

de ilustración.

Ejemplo 1: Identificación de una línea de células MDCK que soporta una alta replicación viral en medios que contienen suero

Este ejemplo describe la identificación y selección de una línea de células MDCK que soporta la replicación de virus influenza hasta altos títulos cuando se cultivó la línea de células MDCK en medios de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que comprenden suero bovino fetal (FBS) al 10%. El proceso se explica resumidamente en la figura 5A.

Se descongeló un vial de células MDCK (n.º de registro de la ATCC CCL-34; lote 1805449; pase 54) obtenido de la ATCC y se inoculó en un frasco T-25 (Corning) que contenía 10 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco con L-glutamina (DMEM) y suero bovino fetal al 10% (FBS, definido). Se incubaron las células (pase 55) a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ con el $5\pm 1\%$ de CO_2 durante 3 días. En el día 3, se sometieron a pase las células a un frasco T-225 (pase 56). Tres días tras la siembra, se sometieron a pase las células a 4 x frascos T-225 (pase 57). Para cada uno de los pases en DMEM con L-glutamina y FBS al 10% en un frasco T-25 o T-225, el procedimiento fue como viene a continuación.

Se lavaron las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca^{++} y Mg^{++} (DPBS), y se añadieron 1,5 ml (para T-25) o 7,5 ml (para T-225) de tripsina al 0,25% a las células. Se incubó la monocapa de células y se permitió que se desprendiera durante de 15 a 20 minutos, momento en el que se añadieron 1,5 ml (para el frasco T-75) o 7,5 ml (para el frasco T-225) de DMEM con L-glutamina y FBS al 10% para neutralizar la tripsina. Entonces se contaron las células usando un hemocitómetro, y se transfirió la cantidad necesaria para inocular 5×10^4 células por ml a un frasco T-225 que contenía 100 ml de DMEM con L-glutamina y FBS al 10% y se incubó como anteriormente durante 3 días. Se tripsinizaron las células de 4 frascos T-225, se reunieron y se añadió medio de crecimiento que contenía suero tal como se describió anteriormente. Entonces se mezclaron las células y se contaron. Se centrifugó la suspensión celular y se resuspendió el sedimento celular con 10 ml de DMEM con L-glutamina y FBS al 10%. Se contó de nuevo esta suspensión. Se añadieron diez ml de medio de congelación 2X (DMEM con FBS al 10% con L-glutamina y dimetilsulfóxido al 15% v/v), se mezclaron las células concienzudamente y se tomaron alícuotas de 1 ml en cada uno de 20 crioviales. Se congelaron las células a -80°C en recipientes de congelador Nalgene, y entonces se transfirieron para su almacenamiento en fase de vapor en nitrógeno líquido. Las células congeladas representaban las células MDCK en el pase 57 y se denominan en el presente documento lote 1 de Pre-MCB de MDCK.

A continuación, se descongeló un vial del lote 1 de Pre-MCB de MDCK y se inoculó en un frasco T75 que contenía 35 ml de DMEM y FBS al 10%. Se incubaron las células (pase 58) a 37°C con el 5% de CO_2 durante 3 días. En el día 3 se sometieron a pase las células a 2 x frascos T225 (pase 59). Tres días tras la siembra, se sometieron a pase las células a 4 x frascos T225 (pase 60). En el día 3 tras la siembra, se realizó un intercambio de medio completo. Cuatro días tras la siembra, se sometieron a pase las células a 25 x frascos T225 (pase 61). Para cada uno de los pases en DMEM con L-glutamina y FBS al 10% en un frasco T75 o T225, el procedimiento fue como viene a continuación.

Se lavaron las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca^{++} y Mg^{++} (DPBS), y se añadieron 3 ml (para T75) o 7,5 ml (para T225) de tripsina al 0,25% a las células. Se incubó la monocapa de células y se permitió que se desprendiera durante de 15 a 20 minutos, momento en el que se añadieron 3 ml (para T75) o 7,5 ml (para frasco T225) de DMEM con L-glutamina y FBS al 10% para neutralizar la tripsina. Entonces se contaron las células en un hemocitómetro, y se transfirió la cantidad necesaria para inocular 5×10^4 células por ml a un frasco T225 que contenía 100 ml de DMEM con L-glutamina y FBS al 10%, y se incubó como anteriormente durante 3 días. Se tripsinizaron las células de 24 de 25 frascos T225, se reunieron, y se añadió medio de crecimiento que contenía suero. Se centrifugó la suspensión celular, y se resuspendió el sedimento celular con 50 ml de DMEM con L-glutamina y FBS al 10%.

Entonces se contó esta suspensión. Para preparar 60 ml de 1×10^7 células/ml de suspensión celular, se combinaron 39,5 ml de suspensión celular con 20,5 ml de medio DMEM con FBS al 10%. Entonces se añadieron 60 ml de medio de congelación 2X (DMEM con FBS al 10% con L-glutamina y dimetilsulfóxido al 15% v/v) a 60 ml de 1×10^7 células/ml de suspensión celular, se mezclaron las células concienzudamente y se tomaron alícuotas de 1 ml en cada uno de 100 crioviales. Se congelaron las células a -60°C en recipientes de congelación Nalgene, y entonces se transfirieron para su almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células congeladas representaban las células MDCK en el pase 61. Se denominaron estos viales lote 2 de Pre-MCB de MDCK. Se depositó este banco en la ATCC y se identifica mediante el número de registro de la ATCC PTA-6500.

A continuación, se descongeló un vial del lote 2 de Pre-MCB de MDCK (pase 61) y se inoculó en un frasco T75 que contenía 35 ml de DMEM y FBS al 10%. Se incubaron las células (pase 62) a 37°C con el 5% de CO_2 durante 3 días. En el día 3 se sometieron a pase las células a 2 x frascos T75 (pase 63). Se realizaron 3 pases adicionales a un nuevo frasco T75 seguido por un pase a un frasco T225 (pase 67).

A continuación, se tripsinizaron las células y se clonaron mediante un método de dilución. En particular, se

sembraron las células a 0,5 células por 100 µl por pocillo en placas de 96 pocillos (razón 1:1 de medio nuevo con respecto a condicionado). El siguiente día, se visualizaron las células bajo el microscopio y se identificaron los pocillos que contenían una célula, entonces se devolvieron las placas a la incubación. Tras 7 días de incubación, se comprobaron las placas para evaluar el crecimiento celular y se añadieron otros 100 µl de medio de crecimiento nuevo a cada pocillo. Tres días más tarde, se realizó un intercambio de medio completo (200 µl por pocillo). Dos semanas tras la siembra de clonación inicial, se tripsinizaron las células y se sometieron a pase a 2 conjuntos de placas de 24 pocillos si alcanzaban el 100% de confluencia. Si las células no habían alcanzado el 100% de confluencia, volvieron a alimentarse con medio de crecimiento nuevo.

Se expandieron los clones secuencialmente (placa de 24 pocillos → frascos T25 o placas de 6 pocillos → frasco T75 o T225) y se seleccionaron un total de 54 clones tal como se muestra en la tabla 1, a continuación, y se congelaron en el pase 4 o bien 5 tras la clonación en DMEM con FBS al 10% con DMSO al 7,5% y se almacenaron en nitrógeno líquido. Además, se aislaron los clones 56, 57 y 58 a partir de una segunda tanda de selección realizada esencialmente tal como se describió anteriormente.

Tabla 1. Lista de 54 clones de MDCK con suero (en orden de congelación)

ID de clon	ID de clon	ID de clon	ID de clon	ID de clon	ID de clon
1	10	19	28	37	46
2	11	20	29	38	47
3	12	21	30	39	48
4	13	22	31	40	49
5	14	23	55	41	50
6	15	24	33	42	51
7	16	25	34	43	52
8	17	26	35	44	53
9	18	27	36	45	54

Se realizó el examen inicial de la productividad de virus de los clones usando uno de los conjuntos de placas de 24 pocillos producidos anteriormente. Para realizar esto, se infectaron las células, cultivadas durante 3 días en DMEM con glutamina 4 mM, con la cepa de influenza A/Nueva Caledonia reordenante a una MOI de 0,001. Se añadió tripsina TPCK 500 mU/ml una vez en el momento de la infección. Se determinó el título de virus usando el ensayo de TCID₅₀ semiautomatizado (n=12 por muestra) tal como se describe en el ejemplo 5, a continuación. El título de virus obtenido a partir de cada clon variaba de desde 7,0 hasta 8,5, con una distribución tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de los títulos virales de 54 clones hechos crecer en DMEM que contenía FBS al 10%

Intervalo del título (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Número de clones (total de 54)
7,0-7,5	6
7,6-8,0	35
8,1-8,5	12
>8,5	1

Basándose en los datos de productividad de virus, se seleccionaron seis clones para análisis adicional: los clones 1, 5, 36, 39, 40 y 55. Se expandieron los clones en frascos T y se usó un conjunto de T-25 (8 frascos por clon) para la infección con reordenantes de A/Nueva Caledonia, A/Panamá y B/Jilin a una MOI de 0,001 usando DMEM + glutamina 4 mM como medio tras la infección (2 frascos por cepa de virus). Se cosecharon estos frascos 4 días tras la infección y se analizaron muestras de cada frasco para determinar la potencia usando el ensayo de TCID₅₀ semiautomatizado (n=12 por frasco, n=24 por cepa de virus) del ejemplo 5. Los resultados de estos experimentos se presentan como figura 1, que muestra que los clones 1 y 55, que son los más altos productores para el reordenante de A/Nueva Caledonia, son también los más altos productores para los reordenantes de A/Panamá y B/Jilin. Por consiguiente, se seleccionó el clon 1 para la subclonación y adaptación adicionales a medio libre de suero.

En tandas adicionales de selección realizadas tal como se describió anteriormente, se seleccionaron más de 1000 clones por su capacidad para producir altos títulos de A/Nueva Caledonia. Sesenta y tres de estos clones se seleccionaron por su capacidad para producir altos títulos de reordenantes de A/Panamá y B/Jilin, ninguno producía más virus que el clon 1. Por consiguiente, no se seleccionó ninguno de estos clones para su estudio adicional y no

se presentan datos referentes a estos clones en el presente documento.

A continuación, se descongeló el clon 1 (P4/P71, 4 pases desde el aislamiento a partir de un único clon, 71 pases totales) y se inoculó en un frasco T75 que contenía 35 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco/F12 de Ham con L-glutamina (DMEM/F12) y FBS al 10%. Se incubaron las células a 37°C con el 5% de CO₂ durante 3 días. En el día 3, se sometieron a pase las células a un frasco T225. Entonces se sometieron a pase las células 8 veces en o bien un frasco T75 o bien un frasco T225 cada 3 ó 4 días tras la siembra. Tras estos pases, se tripsinizaron las células (P13/P80) y se subclonaron mediante dilución tal como sigue.

Se sembraron las células a 0,5 células por 100 µl por pocillo en 10 x placas de 96 pocillos (razón 1:1 de medio nuevo con respecto a condicionado). El siguiente día, se visualizaron las células (P1/P81, P1 desde el subclón, pase total P81) bajo el microscopio y se marcaron los pocillos que contenía una célula por pocillo. Se permitió que las células crecieran durante 7 días y se comprobaron las placas para observar si los pocillos marcados contenían células en crecimiento. Se alimentaron las células con 100 µl de medio de crecimiento nuevo en este momento, y entonces se realizó un intercambio de medio completo (200 µl por pocillo) 3 días más tarde. Dos semanas tras la siembra de células inicial, se tripsinizaron clones de células individuales y se sometieron a pase a una placa de 96 pocillos si alcanzaban > 50% de confluencia. Las células con menos del 50% de confluencia volvieron a alimentarse con medio de crecimiento nuevo y se permitió que continuaran creciendo. Se expandieron secuencialmente los clones que alcanzaban > 50% de confluencia (placa de 24 pocillos → placas de 6 pocillos → frasco T75) y se congelaron un total de 63 subclones en el pase 5 o bien 6 desde el comienzo de esta tanda de subclonación en DMEM/F12 con FBS al 10% con DMSO al 7,5% y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Durante la expansión clonal, se establecieron también los clones en 3 x placas de 96 pocillos para la infección con virus (reordenantes de A/Panamá y B/Jilin) a una MOI de 0,001. Se hicieron crecer las células en DMEM/F12 con glutamina 4 mM, se infectaron las células a los 3 días tras la siembra usando DMEM/F12 con glutamina 4 mM como medio tras la infección, y se cosecharon los virus 4 días tras la infección y se estabilizaron con fosfato de sacarosa. Se determinó el título de virus A/Panamá usando un ensayo de FFA tal como se describe en el ejemplo 4, a continuación. El título de virus A/Panamá producido por cada subclón variaba de desde 7,0 hasta 8,5, con una distribución tal como se muestra en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3. Distribución de los títulos virales a partir de 63 subclones del clon 1 hecho crecer en DMEM + FBS al 10%

Intervalo del título (Log ₁₀ FFU/ml)	Número de subclones (total de 63)
< 6,1	28
6,2-6,9	18
7,0-7,5	13
≥7,6 (menos de 8,0)	4

De los 63 clones, el subclón 1-A (P6/P86), el subclón 1-B (P5/P85) y el subclón 1-C (P6/P86) de MDCK producían un título de virus de 7,6 log₁₀ FFU/ml, mientras que el subclón 1-D producía un título de virus de 7,8 log₁₀ FFU/ml.

Ejemplo 2: Adaptación de clones de células MDCK a crecimiento en medio libre de suero

Este ejemplo describe la adaptación de los clones 1, 55, 56, 57 y 58 y los subclones 1-A, 1-B (P5/P85), 1-C y 1-D de MDCK a crecimiento en medio libre de suero MediV 105. Los clones 56, 57 y 58 se derivaron de células MDCK (n.º de registro de la ATCC CCL-34) y se adaptaron a crecimiento en medio que contenía suero de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1. El proceso se explica resumidamente en la figura 5B.

En primer lugar, se descongeló un vial del subclón 1-D de clon de MDCK (congelado en el pase 5 desde el subclón, P85 en total) y se inoculó en un frasco T75 que contenía 35 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco/F12 de Ham (DMEM/F12) con L-glutamina y suero bovino fetal (FBS, definido) al 10%, y se incubó a 37°C con el 5% de CO₂ durante 3 días. En el día 3 se sometieron a pase las células a un frasco T225 (pase 7/P87). A continuación, se adaptaron las células del subclón D de MDCK en medio libre de suero MediV 105 durante 5 pases.

En el pase 5 en MediV 105, se congelaron las células como un banco de registro. Además, se estableció un frasco de células (clon 1-D) para comprobar la estabilidad celular en medio libre de suero MediV 105. Las células del subclón D de MDCK SF comenzaron a morir tras 8 pases en medio libre de suero MediV 105.

Además, se adaptaron los clones 1, 55, 56, 57 y 58 y los subclones 1-A, 1-B (P5/P85) y C de MDCK con suero a medio libre de suero MediV 105. En primer lugar, se descongeló un vial de cada clon 1, 55, 56, 57 y 58 y subclón 1-A, 1-B (P5/P85) y C de MDCK con suero en un frasco T75 que contenía 35 ml de medio DMEM/F12 con FBS al 10% y se incubó a 37°C con el 5% de CO₂ durante 3 días. Se tripsinizaron las células y se sembraron en un nuevo frasco T225 a una densidad de siembra de 5 x 10⁴ células/ml. En el día 3 tras la siembra, se sometieron a pase las células

a un frasco T75 en medio de crecimiento que contenía suero.

Para cada uno de los pases en DMEM/F12 con L-glutamina y FBS al 10% en un frasco T75 o T225, el procedimiento fue como viene a continuación. Se lavaron las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca^{++} y Mg^{++} (DPBS) y se añadieron 3 ml (para el frasco T75 flask) o 7,5 ml (para el T225) de TrypLE a las células. Se incubó la monocapa de células y se permitió que se desprendiera durante 15-20 minutos, momento en el que se añadieron 3 ml (para T75) o 7,5 ml (para el frasco T225) de DMEM/F12 con FBS al 10% con L-glutamina para neutralizar la actividad de TrypLE. Entonces se contaron las células mediante recuento de células Cedex, y se transfirió la cantidad necesaria para inocular 5×10^4 células por ml a un frasco T75 o frasco T225 que contenía suficiente medio como para llevar el volumen hasta 35 ml (T75) o 100 ml (T225) de DMEM con FBS al 10% con L-glutamina, y se incubó como anteriormente durante 3 ó 4 días.

A continuación, se adaptó cada uno de los clones en frascos T75 (3 pases en medio con suero tras la descongelación) para el crecimiento en medio libre de suero MediV 105. Se sometieron a pase las células de los frascos T75 durante 3 pases en frascos T75 que contenían 35 ml de MediV 105. En el cuarto pase, se sometieron a pase las células a un frasco T225 que contenía 100 ml de MediV 105. Se sembraron las células del frasco T225 en 2 ó 3 frascos T225 basándose en el recuento de células para el quinto pase. En el día 3 o el día 4 tras la siembra, se congelaron los clones 1, 56 y 57 y los subclones 1-A, 1-B, 1-C y 1-D como banco de registro. Se sometieron a pase cada uno de los clones 55 y 58 una vez adicional en medio libre de suero antes de que las células se dispusieran en bancos.

Para cada uno de los pases en medio libre de suero MediV 105 en un frasco T75 o T225, el procedimiento fue como viene a continuación, para el primer pase en MediV 105, se eliminó el medio gastado del frasco T75 con células en el pase 3 tras la descongelación del vial, se lavaron las células con DPBS, se añadieron 3 ml de TrypLE y se incubaron las células y se permitió que se desprendiesen durante 15-20 minutos. Entonces se añadieron 3 ml de disolución de inhibidor de tripsina de frijol (Worthington) para neutralizar la TrypLE, y se contaron las células mediante un contador de células Cedex. Se transfirió la cantidad de células necesaria para inocular 5×10^4 células por ml de medio a un frasco T75 que contenía 35 ml de MediV 105. Se incubaron todos los frascos a 37°C con el 5% de CO_2 durante 3-4 días, momento en el que las células se separaron de nuevo enzimáticamente tal como se describió anteriormente excepto por el uso de 2,5 ml (para T75) o 5 ml (para T225) de TrypLE, luego 2,5 ml (para T75) o 5 ml (para T225) de disolución de inhibidor de tripsina de frijol usada para detener la actividad de TrypLE, y se transfirieron las suspensiones celulares a frascos con medio libre de suero nuevo. Se calcularon todas las siembras para inocular 5×10^4 células por ml de medio.

Para la disposición en bancos de cada clon/subclón, el procedimiento fue como viene a continuación: Se tripsinizaron las células de los múltiples frascos, se reunieron y se añadió disolución de neutralización de tripsina. Entonces se mezclaron las células y se contaron. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio gastado guardado para preparar 1×10^7 células/ml de suspensión celular. A continuación, se añadió medio de congelación 2X (MediV 105 con dimetilsulfóxido al 15% v/v y un volumen igual de medio gastado), se mezclaron las células concienzudamente y se colocaron alícuotas de 1 ml en crioviales de tamaño de 2 ml. Se designaron estos viales como bancos de registro de MDCK SF. Se congelaron las células a -60°C en recipientes de congelación Nalgene y entonces se transfirieron para su almacenamiento en nitrógeno líquido. La figura 5 es un diagrama de flujo de todo el proceso de selección y adaptación para el clon 1 y el subclón 1-B.

Junto con la disposición en bancos, se estableció un frasco T75 de cada clon adaptado a libre de suero para determinar la estabilidad del crecimiento celular en medio libre de suero y el estudio de infectividad de virus. En el estudio, se sembraron las células a 5×10^4 células por ml de medio y se sometieron a pase cada 3 ó 4 días tras la siembra. Los clones 56 y 57 comenzaron a morir en el sexto pase en MediV 105.

Se continuó cultivando cada uno de los otros clones y subclones en MediV 105. En el pase 9 ó 10, se establecieron 5 frascos T75 para cada clon para la infección con virus. Se infectaron los clones con reordenantes de A/Nueva Caledonia, A/Hiroshima, B/Malasia y A/Vietnam a una MOI de 0,001, usando DMEM/F12 con glutamina 4 mM + tripsina TPCK 500 mU/ml como medio tras la infección. Se cosecharon los virus en los días 3 y 4 tras la infección y se estabilizaron con 10 x tampón fosfato de sacarosa. Se determinaron los títulos de virus mediante el ensayo FFA tal como se describe a continuación en el ejemplo 4. Los resultados de estos experimentos (datos no mostrados) mostraban que los subclones del clon 1 producían más virus que los otros clones de células MDCK sometidos a prueba. Por consiguiente, se seleccionaron los subclones 1-A, 1-B y 1-C para experimentos adicionales para evaluar el crecimiento celular en MediV 105. Los resultados de este experimento se muestran como figura 2. Tal como se muestra en la figura 2, cada uno de los subclones 1-A, 1-B y 1-C presentaba características de crecimiento esencialmente similares.

Además, volvieron a someterse a prueba los subclones 1-A, 1-B y 1-C para determinar la infectividad de virus en el pase 12. Se infectaron 9 x frascos T75 para cada subclón con virus influenza en las mismas condiciones que en el pase 9, descrito de manera inmediatamente anterior, por duplicado (2 frascos T75 por clon por cepa de virus). Se presentan los resultados de este experimento como figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, cada uno de los subclones soportaba el crecimiento de los virus sometidos a prueba hasta un título relativamente alto, y ninguno de

los diferentes subclones soportaba el título más alto de cada cepa de virus sometida a prueba.

Finalmente, para evaluar los efectos del medio MediV 105 sobre el crecimiento de virus, se evaluó la infectividad de virus para los subclones 1-A, 1-B y 1-C en medio tanto MediV 105 como OptiPro™ (GIBCO), mientras que se sometió a prueba el subclón 1-D en medio OptiPro™ solo, tal como se describió anteriormente. Se presentan los resultados en tablas de cada uno de estos experimentos de infectividad de virus como figura 4. Tal como se muestra en la figura 4, no se observaron diferencias significativas en la productividad de virus entre los dos medios.

Ejemplo 3: Comparación del crecimiento de células MDCK en MediV 105 y M18M

Este ejemplo describe los resultados de un experimento para evaluar el crecimiento relativo de Células MDCK en medios MediV 105 y M18M. Las formulaciones de MediV 105 y M18M se describen en el ejemplo 10, a continuación.

En estos experimentos, se descongeló 1 vial del subclón 1-A adaptado a libre de suero y se inoculó en un frasco T-75 que contenía o bien MediV 105 o bien M 18M, respectivamente. Entonces se colocaron los frascos T-75 en un incubador a 37°C al que se le suministra el 5% de CO₂ y se permitió que las células crecieran en estas condiciones durante de 3 a 4 días. Se monitorizaron la viabilidad y velocidad de crecimiento celular al final de la incubación tripsinizando las células de los frascos T-75 seguido por recuento de las células totales y viables usando un contador de células Cedex o a lo largo de las siguientes 88 horas mediante contadores Cedex y/o Nucleo.

Los resultados de este experimento se presentan como figura 6. Tal como se muestra en la figura 6, el subclón 1-A podía replicarse en tanto MediV 105 como M18M. Sin embargo, disminuía la viabilidad de las células a lo largo del tiempo en M18M, mientras que la viabilidad celular en MediV 105 permanecía relativamente constante. Además, se calcularon los tiempos de duplicación de las células MDCK y se presentan como figura 7. La figura 7 indica que el tiempo de duplicación del subclón 1-A de células MDCK era de 39 horas en MediV 105 y de 36 horas en M18M.

Ejemplo 4: Comparación del crecimiento de células MDCK sobre diferentes microportadores

Este ejemplo describe los resultados de experimentos diseñados para evaluar el crecimiento de células MDCK en medios M18 usando diferentes microportadores. En particular, se comparó el crecimiento de células MDCK para los microportadores cytodex 1, cytodex 3, cytopore 1 y cytopore 2 (GE Healthcare).

En los experimentos, se inoculó el subclón 1-A de células MDCK un frasco de 125 ml que contenía medios M18. A continuación, se añadieron a cada frasco cytodex 1, cytodex 3, cytopore 1 o cytopore 2 2 g/l, respectivamente. Se determinó la densidad de células MDCK no unidas a los 30 y 60 minutos tras la inoculación tal como se muestra en la figura 8. Tal como se observa en la figura 8, las células MDCK se unían rápidamente a cada uno de los diferentes microportadores, y en última instancia se unían mejor a los microportadores cytopore que a los microportadores cytodex.

Además, se hicieron crecer las células durante aproximadamente 5 días en M18 en presencia de los diferentes microportadores (30 ml de microportador p/v en 125 ml de medios con agitación a 120 RPM), y se determinó diariamente la densidad celular total mediante tripsinización seguido por recuento con Cedex. Los resultados de este experimento se presentan como figura 9. Tal como se muestra en la figura 9, los microportadores cytodex producían mayores densidades celulares en relación con los microportadores cytopore. Además, cytodex 3 producía una mayor densidad celular que cytodex 1.

Ejemplo 5: Replicación de virus influenza en células MDCK

Se sembraron frascos T-75 a 5x10⁴ células/ml (35 ml de DMEM + FBS al 10%+ glutamina 4 mM) y se hicieron crecer en un incubador mantenido a 37°C y el 5% de CO₂ durante 3 días. Se tripsinizaron las células de uno de estos frascos T con tripsina EDTA y se contaron usando el método de exclusión de azul tripano. Entonces se infectaron los frascos T restantes tal como sigue. Se eliminó por aspiración el medio de crecimiento y se lavaron las células dos veces con 10 ml de DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) por frasco. Se determinó la cantidad de virus para infectar cada frasco T a la multiplicidad de infección (MOI) deseada de (por ejemplo, de 0,01 a 0,001) según la ecuación a continuación:

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

Definiéndose MOI como las partículas de virus por célula añadida.

Entonces se añadió la cantidad requerida de virus a 35 ml de medio tras la infección en cada frasco T (DMEM + glutamina 4 mM + tripsina TPCK 500 mU/ml). Entonces se incubaron los frascos T a 33°C, el 5% de CO₂ y se tomaron muestras cada día durante 6 días. Se añadió un décimo del volumen de muestra de 10X SP a cada muestra como estabilizador y se almacenaron las muestras a <-70°C antes de las pruebas de infectividad.

Se determinó la concentración de virus presente en cada muestra según un ensayo de mediana de la dosis infecciosa en cultivo tisular (TCID₅₀) que mide viriones infecciosos. En resumen, se hicieron crecer células MDCK hasta lograr monocapas confluentes en placas de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron diluciones en serie de muestra de virus influenza ca/ts. Las muestras en la placa de ensayo de células MDCK se diluían normalmente hasta diluciones finales de 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰. Los pocillos en las columnas 1-5 y 8-12 contenían muestra de virus diluido y los pocillos en las columnas 6-7 recibieron sólo diluyente de virus y sirvieron como controles de células. Este formato produjo dos puntos de datos (n=2) para cada dilución de muestra por placa. La replicación del virus en las células MDCK dio como resultado muerte celular y efecto citopático (CPE). También se liberaron virus de progenie al sobrenadante de cultivo. El virus de progenie infectó a otras células, repitiendo la infección y dando como resultado la destrucción final de la monocapa. La infección de las células de la monocapa duró durante un periodo de seis días a 33 ± 1°C en un entorno de CO₂. Entonces se retiraron las placas del incubador, se desechó el medio de los pocillos y se añadieron 100 µl de MEM/EBSS + 1X aminoácidos no esenciales + glutamina 2 mM + penicilina/estreptomicina + MTT a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 3-4 h a 37°C y el 5% de CO₂ y se determinó el número de células que mostraban CPE mediante inspección visual del color formado en cada pocillo (amarillo/naranja indica pocillos con CPE y morado liso que indica sin CPE). Se usó el número de pocillos que muestran CPE en cada mitad de placa para calcular el título (log₁₀ TCID₅₀/ml) basándose en la modificación de Karber del método de Reed-Muench.

Ejemplo 6: Ensayo de focos fluorescentes para determinar el crecimiento viral

Se hicieron crecer células MDCK en placas negras de 96 pocillos a lo largo de 4 días en DMEM/EBSS+ 1X aminoácidos no esenciales + glutamina 2 mM + PEN/Strep. Entonces se infectó cada pocillo con las muestras virales diluidas en serie (por ejemplo, cepas de influenza B ca/ts (B/Hong Kong/330/01 y B/Yamanashi/166/98)) y se incubaron durante aproximadamente 20 h a 33 ± 1°C en un entorno de CO₂. Se fijaron las placas infectadas con virus y se inmunotñieron tal como sigue para determinar el título de virus de las muestras. Se eliminó el medio que contenía virus de cada placa y se lavaron las placas una vez con 200 µl/pocillo con DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) seguido por fijación en 200 µl/pocillo de formalina al 4% (v/v) fría en PBS durante 15 minutos. Se lavaron las placas dos veces con 200 µl/pocillo de DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) seguido por incubación de las células con anticuerpo primario específico para o bien cepas A o bien cepas B. Se diluyeron los anticuerpos primarios hasta la dilución deseada en saponina al 0,1%, BSA al 1% en PBS. Tras la incubación durante una hora, se eliminó el anticuerpo primario, se lavaron las células tres veces con Tween 20 al 0,1% en PBS y se incubaron los pocillos con anticuerpo secundario conjugado con colorante fluorescente (por ejemplo, anticuerpo de conejo anti-oveja marcado con FITC) preparado hasta la dilución deseada en saponina al 0,1%, BSA al 1% en PBS. Tras lavar dos veces tal como se describió anteriormente y secar con toallitas de papel, se visualizaron los pocillos con tinción fluorescente diariamente usando un microscopio de fluorescencia y se tomaron las imágenes diariamente usando el programa SPOT.

Ejemplo 7: Ensayos para someter a prueba células MDCK para determinar la cariología, tumorigenicidad y agentes accidentales

Este ejemplo describe ensayos representativos adecuados para someter a prueba células MDCK para determinar la cariología, tumorigenicidad y la presencia de agentes accidentales.

PRUEBAS DE CARIOLOGÍA:

En resumen, se hacen crecer células MDCK para las pruebas en frascos T-225, se mantienen y se subcultivan tal como se describió anteriormente. Cuando se cree que las células tienen suficientes células mitóticas, se recogen las células para el análisis mitótico. Entonces se tratan las células con colcemida (0,02 µg/ml) durante 150 minutos a 37°C. Entonces se recogen las células mediante tripsinización y se centrifugan durante 5 minutos a 200 X g. Se elimina el sobrenadante por aspiración y se resuspenden las células en disolución hipotónica precalentada y se incuban a 37°C durante 10 minutos. Se sedimentan las células hinchadas mediante centrifugación y entonces se fijan mediante incubación en disolución de Carnoy (metanol:ácido acético glacial 3:1) a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se centrifugan de nuevo las células y se lavan al menos dos veces con fijador de Carnoy. Tras la última centrifugación, se resuspenden las células en de 1 a 3 ml de fijador nuevo para producir una suspensión celular opalescente. Se colocan gotas de la suspensión celular final sobre portaobjetos limpios y se secan al aire.

Se tiñen las células mediante la adición de disolución de tinción de Wright en tampón fosfato a los portaobjetos e incubando durante 7-10 minutos. Entonces se lavan los portaobjetos con agua corriente tras 7-10 minutos y entonces se secan al aire. Se exploran las células con objetivos de bajo aumento (10X) para encontrar células en el estadio de metafase de división celular y se analizan los cromosomas de las células en metafase por medio de una lente de inmersión en aceite de gran aumento (100X). Se analizan aproximadamente 100 células en metafase para detectar anomalías citogénicas y el recuento de cromosomas. Se exploran aproximadamente 1000 células para determinar la frecuencia poliploidía y el índice mitótico (porcentaje de células que experimentan mitosis).

PRUEBAS DE ESTERILIDAD: ESTERILIDAD BACTERIOSTÁTICA, FUNGISTÁTICA Y DE CUATRO MEDIOS:

Las pruebas bacteriostática y fungistática determinan si hay algún efecto inhibitorio para el crecimiento de organismos control (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus Niger*) en una muestra de prueba. En resumen, se inocula el artículo de prueba en tres tubos de TSB (medio de digestión de caseína de soja), cuatro tubos de TIO (medio de tioglicolato fluido), dos tubos de SAB (agar de dextrosa de Sabourand) y un tubo de PYG (extracto de levadura y peptona). Entonces se inocula cada inóculo de organismo control que contiene menos de 100 ufc de organismo control en el tipo de medio apropiado. Los controles positivos pueden consistir en *Bacillus subtilis* en TSB y TIO, *Candida albicans* en TSB y SAB (a 20-25°C y 30-35°C), *Clostridium sporogenes* en TIO y PYG, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger* en TIO y/o TSB. El control negativo es PBS estéril. Se incuban los medios durante 3-5 días y se comprueban para detectar crecimiento de organismos.

Para someter a prueba si un cultivo de prueba cumple los requisitos de esterilidad definidos en USP 26, EP y 21CFR610.12, se inocula el cultivo de prueba en dos tubos de TSB (medio de digestión de caseína de soja), dos tubos de TIO (medio de tioglicolato fluido), tres tubos de SAB (agar de dextrosa de Sabourand) y dos tubos de PYG (extracto de levadura y peptona). Se incuban los medios a las temperaturas apropiadas (se incuban las inclinaciones de SAB a dos temperaturas) y se observan todos los tubos a lo largo de un periodo de 14 días comprobándose los tubos en el tercer/cuarto o quinto día, el séptimo o el octavo día y el decimocuarto día de pruebas. Cualquier tubo inoculado con artículo de prueba que parezca turbio se siembra en placa y se realizan tinciones de Gram en la placa para determinar el tipo de tinción de Gram del/de los organismo(s) contenido(s) en la muestra de prueba. Los controles negativos son PBS estéril.

ENSAYO DE MICOPLASMAS/MICOPLASMASTASIS:

Se expanden las células y se cultivan en frascos T tal como se explicó anteriormente. Se preparan lisados celulares a una concentración de 5×10^5 células/ml y se congelan a -70°C. Entonces se somete a prueba el artículo de prueba para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma orale* y *Mycoplasma hyorhinis* o bien en caldo de agar/placas y/o bien en células VERO.

Para el ensayo de aislamiento en agar, se somete a prueba el artículo de prueba o bien con adiciones conocidas o sin adiciones en placas de agar o botellas de caldo. Se realizan adiciones conocidas del artículo de prueba con *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma orale* para lograr una dilución de 10 a 100 ufc/0,2 ml (para la prueba de agar) y de 10 a 100 ufc/10 ml (para el ensayo de semicaldo). De una porción de la muestra de prueba no se realizan adiciones. Se inoculan 4 botellas de caldo semisólido con 10 ml cada una de adiciones conocidas (2 botellas) o sin adiciones (2 botellas). Se incuba una botella de cada uno de adiciones conocidas/sin adiciones o bien de manera aerobia o bien de manera anaerobia a temperaturas apropiadas. Se inoculan 10 placas de agar de tipo A y 10 placas de agar de tipo B con cada muestra de adiciones conocidas o muestra sin adiciones. Se incuban la mitad de las placas de agar de tipo A y las placas de agar de tipo B o bien de manera aerobia o bien de manera anaerobia a temperaturas apropiadas. Caldo semisólido no inoculado con micoplasmas sirve como control negativo no inoculado. Se observan todas las botellas de caldo durante 21 días. Cada botella de caldo (con excepción del control negativo no inoculado) se subcultiva en los días 3, 7 y 14 sobre placas de agar de tipo A o placas de agar de tipo B (10 placas cada una, 0,2 ml/placa) y se incuba en las mismas condiciones que la botella apropiada. Se examinan una vez al día durante 21 días.

Para el ensayo de cultivo de células VERO potenciado, se somete a prueba el artículo de prueba con adiciones conocidas o sin adiciones. Se realizan adiciones conocidas del artículo de prueba con *M. orale* y *M. hyorhinis* a una concentración de 10-100 ufc /0,2 ml. Se inoculan cada uno de los artículos de prueba con adiciones conocidas, artículos de prueba sin adiciones, controles positivos y controles negativos en frascos T-75 de cultivos de células VERO. Tras 3-5 días de incubación, se raspan las células de cada frasco y se congelan de manera instantánea. Se inoculan dos décimos de un ml de lisado celular de cada matraz en cada pocillo de una placa de seis pocillos que contiene células VERO. Además, se inoculan controles positivos y negativos en pocillos apropiados de placas de seis pocillos que contienen células VERO. Tras 3-5 días, se fijan las células y se tiñen con colorante HOECHT de unión a ADN y se evalúan para determinar la presencia de micoplasmas.

PRUEBA DE TUMORIGENICIDAD EN RATONES DESNUDOS:

Se realiza la evaluación de la formación de tumores en ratones atímicos desnudos (nu/nu) tal como sigue. En resumen, se les inyecta a aproximadamente doscientos treinta ratones atímicos (4 semanas de edad) por vía subcutánea 0,2 ml (1×10^7 células/ratones) de o bien control positivo (células HeLa), control negativo (solución salina tamponada con fosfato (PBS)) o bien las células de prueba (células MDCK). Se aleatorizan los animales antes de la inyección y se realizan las inyecciones en todos los ratones usando una aguja de calibre 22 el mismo día. Se observan todos los animales cada día laborable y se palpa el sitio de inyección dos veces a la semana para detectar el desarrollo de lesiones durante un periodo de ochenta y cuatro días. Se mide cada lesión y se mantienen los animales siempre que no haya un aumento visible en el tamaño de la lesión durante un máximo de 6 meses. Los animales que parezcan moribundos se sacrificarán. Estos animales y todos los ratones que sobreviven hasta el final

del periodo de observación de 6 meses se sacrifican y se les realiza la necropsia. Se analizan el sitio de inyección, los pulmones, los ganglios linfáticos escapulares y las lesiones macroscópicas mediante métodos histopatológicos.

ENSAYOS ADICIONALES:

5

Se realizan otras pruebas de anticuerpos específicos y/o PCR a modo de ejemplo para agentes virales disponibles tal como se muestra en la tabla 4, a continuación.

Tabla 4. Procedimientos adicionales de prueba

Pruebas generales	PCR* / Ac específicos
Esterilidad	VAA tipos 1 y 2
Micoplasmas	CMVH
Agentes accidentales <i>in vitro</i> (múltiples líneas celulares)	VEB
Agentes accidentales <i>in vivo</i>	VHS
PERT	Hepatitis A, B & C
Cocultivo	VHH 6, 7 y 8
Cariología	VIH 1 y 2
Microscopía electrónica	VPH
Tumorigenicidad usando células intactas	VLTH I y II
Oncogenicidad usando ADN celular	Poliomavirus (virus BK y JC)
Oncogenicidad usando lisado celular	Circovirus
Virus bovinos según 9CFR	Parvovirus canino
Virus porcinos según 9CFR	Moquillo canino
	Adenovirus
	SV40

10

Ejemplo 8: Proceso y formulación de material de vacuna

El uso de una tecnología de microportador altamente escalable, similar a la usada para la producción de la vacuna de la polio actualmente autorizada, puede aplicarse a la producción de influenza en células MDCK, tal como se comentó en el ejemplo 4, anteriormente. Perlas esféricas hechas de dextrano soportan un crecimiento excelente de células MDCK y en biorreactores de 2 a 10 l. Se encontró que las células MDCK originales hechas crecer en medio MediV 105 u OptiPro™ podían crecer sobre microportadores Cytodex 3 hasta una densidad de 2×10^6 núcleos por ml en modo discontinuo en tanto frascos centrifugadores como células MDCK que se han hecho crecer hasta $> 2,5 \times 10^6$ células/ml en biorreactores hasta una escala de 10 l.

15

20

Se someten a prueba estas células MDCK (o células MDCK no adherentes similares) para determinar la producción de cepas de influenza de vacuna hasta un alto título en un proceso libre de suero y se comparó con la productividad obtenida usando células hechas crecer con suero en frascos T. Para la fabricación clínica, se produce virus influenza en células MDCK a la escala de 20 l o 150 l, mientras que la producción a escala comercial utiliza biorreactores de hasta aproximadamente 2.500 l. La figura 10 explica resumidamente un proceso que puede usarse para el aumento a escala del cultivo celular hasta niveles de producción comerciales. En primer lugar se expande secuencialmente el banco de células de trabajo desde un frasco T-75 hasta frascos T-225 hasta frascos centrifugadores de 1 litro hasta un biorreactor de 20 litros, luego de 300 litros que finalmente se expande hasta un biorreactor de 2500 litros. Cuando se obtiene la densidad celular óptima, se inocula el cultivo con la cepa de vacuna. Entonces se recoge a granel el virus del sobrenadante de cultivo. El ejemplo 12 detalla la implementación de biorreactores de uso único (SUB) para la producción de material viral de alto título, que puede usarse para la producción de material de vacuna.

25

30

El proceso de purificación para las vacunas contra la gripe basadas en cultivo celular se modela sobre la purificación de vacunas contra la gripe basadas en huevo (véanse, por ejemplo, la publicación PCT WO 05/014862 y la solicitud de patente PCT PCT/US05/035614 presentada el 4 de octubre de 2005). La purificación de materiales de vacunas virales a partir de células puede incluir cualquiera de o todos los siguientes procesos, homogeneización, clarificación, centrifugación, ultrafiltración, adsorción sobre sulfato de bario y elución, filtración de flujo tangencial, ultracentrifugación en gradiente de densidad, cromatografía y esterilización mediante filtración. También pueden incluirse otras etapas de purificación. Por ejemplo, puede clarificarse en primer lugar medio bruto de cultivos infectados o cosecha de virus mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente

35

40

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

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

Se incorporan etapas de caracterización en proceso en el esquema de purificación para monitorizar la producción. Las etapas de caracterización que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, el ensayo de focos fluorescentes (descrito como ejemplo 6, y conocido en la técnica, véase por ejemplo, Stokes *et al.*, 1988, J Clin Microbiol. 26:1263-6) que usa un método de tinción fluorescente y unión a anticuerpo sencillo para determinar la infectividad de virus. Se usa la determinación de ADN y proteína totales que puede realizarse usando numerosos métodos conocidos por un experto en la técnica para determinar el porcentaje de las impurezas iniciales que quedan. Puede determinarse la actividad específica de la preparación calculando la infectividad viral por cantidad de vacuna (por ejemplo, infectividad/mg).

Se explica resumidamente en la figura 11A un proceso de purificación que puede usarse. En resumen, se estabiliza la cosecha viral de influenza monovalente con un tampón adecuado (por ejemplo, tampón fosfato de sacarosa). Entonces se añade Benzonase, una endonucleasa no específica, a la cosecha viral estabilizada para descomponer el ADN para dar fragmentos de menos de 300 pares de bases. Tras el tratamiento con Benzonase, se somete la cosecha de virus a filtración para eliminar cualquier célula MDCK intacta restante y la mayor parte de los residuos celulares. En particular, puede utilizarse filtración de flujo directo (DFF). Se determinan fácilmente diversas membranas de filtro con diferentes tamaños de poro, composiciones de las membranas y configuraciones (tales como filtro individual o de múltiples medios) y parámetros del proceso, incluyendo caudal máximo y factor de aumento a escala. Entonces se concentra la cosecha de virus clarificada mediante filtración de flujo tangencial (TFF) usando membranas de ultrafiltración y entonces se diafiltra el virus concentrado frente a un tampón adecuado (por ejemplo, tampón fosfato de sacarosa). Entonces se somete la cosecha concentrada, diafiltrada a cromatografía en columna o cromatografía en membrana. Pueden usarse cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico para eliminar adicionalmente ADN y proteínas de células MDCK. Entonces se concentra la cosecha de virus purificada de manera cromatográfica y se diafiltra a un tampón de formulación y, finalmente, se somete a esterilización por filtración. Se explica resumidamente en la figura 11B un proceso de purificación alternativo que puede usarse que combina la etapa de Benzonase® con cromatografía de afinidad. El uso de un proceso de este

tipo puede reducir las etapas de procesamiento posteriores. En resumen, se estabiliza la cosecha viral de influenza monovalente con un tampón adecuado (por ejemplo, tampón fosfato de sacarosa). Se clarifica el virus estabilizado mediante filtración, por ejemplo mediante filtración de flujo directo (DFF) usando filtros de 1,2 y 0,45 μm . Entonces se condiciona/concentra el virus clarificado mediante TFF usando membranas de ultrafiltración y entonces se diafiltra el virus concentrado frente a un tampón adecuado (por ejemplo, tampón fosfato de sacarosa) usando, por ejemplo TFF de 500 KD (5X UF / 5X DF). Entonces se somete el virus condicionado a tratamiento con Benzonase® en columna y entonces se concentra el eluato de virus purificado y se diafiltra a un tampón de formulación usando, por ejemplo, procesos de TFF de 500 KD y 8X DF. Entonces se esteriliza por filtración el volumen de virus formulado, por ejemplo a través de filtros de 0,45 y 0,2 μm .

CROMATOGRAFÍA EN SULFATO DE CELLUFINE

Se determinó que el ADN de MDCK contiene un fragmento resistente a Benzonase® de ~12kB y que no se eliminaba mediante TFF o ultracentrifugación usando un gradiente de densidad de sacarosa (datos no mostrados). Tal como se describió anteriormente, se utiliza cromatografía para garantizar la eliminación de todos los contaminantes. La resina de cromatografía sulfato de Cellufine consiste en éster sulfato unido covalentemente en la posición 6 de celobiosa y unido a una perla de celulosa. La resina imita la afinidad de heparina o sulfato de dextrano. Se sometió a prueba una cromatografía en columna usando sulfato de Cellufine (CS) y se demostró que elimina eficazmente la banda de ADN contaminante. En resumen, se equilibró una columna de 2,6 x 2 cm (10 ml) en tampón A (1X SP (sacarosa 218 mM, fosfato de potasio 11 mM), pH 7,2) y se cargó el virus purificado mediante TFF (reordenante de A/Nueva Caledonia). Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de tampón A y se eluyó con un gradiente del 0-100% de tampón B (1X SP + NaCl 1 M, pH 7,2). Se mantuvo el caudal a 3 ml/min. Se muestra el perfil de OD en el panel izquierdo de la figura 12A. Se muestran en la tabla 5 el contenido en ADN, HAU total y la infectividad mediante FFA del material de partida, la fracción no retenida y las fracciones de elución de la columna de CS.

Tabla 5. Cromatografía en sulfato de Cellufine

Muestra	ADN total (μg)	HAU total ($\text{Log}_{10}/\text{ml}$)	Infectividad mediante FFA (por ml)
Material de TFF/UF	26,7	5,8	$1,5 \times 10^{10}$
Fracción no retenida	12,7 (47%)	4,0 (1,6%)	$6,5 \times 10^7$ (0,4%)
Eluato	8,5 (32%)	5,75 (88%)	$1,1 \times 10^{10}$ (70%)

Se analizaron el material de partida, la fracción no retenida y las fracciones de elución de la columna de CS mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 12A, panel derecho). El contaminante de ADN está presente en tanto el material de partida (carril 2) como la fracción no retenida (carril 3) pero está ausente en el material eluido de la columna (carril 4). Estos datos indican que el uso de esta resina de cromatografía de afinidad es más eficaz que la ultracentrifugación sola en la eliminación de contaminantes de los medios de cultivo y las células huésped.

TRATAMIENTO CON BENZONASE® EN COLUMNA

Para reducir las etapas de manipulación y potenciar la pureza, el tratamiento con Benzonase® puede combinarse con la cromatografía en sulfato de Cellufine. Se muestra en la figura 12B el esquema para la degradación del ADNbc de MDCK usando tratamiento con Benzonase® en columna.

Los detalles del proceso son tal como sigue: Todo el proceso se lleva a cabo a 22°C (temperatura ambiente). Se calienta el virus purificado mediante TFF hasta 22-24°C antes de realizar la cromatografía según sea necesario. La carga sobre la columna se basa en la infectividad total de unidad de virus por ensayo FFA. La carga objetivo sobre la columna es 9 - 9,5 log_{10} FFU por ml de volumen de columna. Los caudales para el equilibrado, la carga, los lavados y la elución siguen siendo iguales (155 cm/h) excepto porque el caudal se reduce tal como se muestra en la tabla 6 mientras se lava con tampón 1X SP que contiene Benzonase®. Se equilibra la columna (1x15 cm) con 1X SP (sacarosa 218 mM - fosfato de potasio 11 mM, pH 7,0 $\pm$ 0,2) hasta que la conductividad y el pH alcanzan 2-3 mS/cm y 7,0 $\pm$ 0,2, respectivamente. Se carga el virus sobre la columna y se recoge la fracción no retenida. Tras la finalización de la carga, se lava la columna (lavado n.º 1) con 1 volumen de columna (VC) de 1X SP y se recoge el lavado junto con la fracción no retenida. Entonces se lava la columna (lavado n.º 2) a diferentes caudales (que oscilan entre 0,33, 0,46, 0,65, 0,98 y 1,3 ml/min. para cada experimento realizado repitiendo las etapas 1-3 con el mismo material de carga de virus) con 2,5 VC de 1X SP que contiene MgCl_2 2 mM y 50 unidades de Benzonase® por ml de 1X SP. Tras el lavado n.º 2, se lava la columna con otros 2 VC de 1X SP (lavado n.º 3). Se eluye el virus de la columna usando 1X SP que contiene NaCl 1 M. Se recoge el material eluido tan pronto como el valor de A_{280} nm alcanza 5 mAU y se continua recogiendo hasta que la absorbancia a A_{280} nm regresa a 5 mAU. Se limpia la columna con 5 VC de NaOH 0,1 N y se deja en base hasta que se use de nuevo. Se capturan los datos para la ejecución de cromatografía en la hoja de datos al final de este protocolo. Pueden hacerse múltiples copias de la hoja de datos para cada ejecución de cromatografía realizada.

Tabla 6. Tiempo de contacto de Benzonase® con virus y velocidad de flujo para las ejecuciones 1-5

Ejecución n.º	Volumen de lavado (lavado n.º 2)	Caudal (ml/min)	Tiempo de contacto de Benzonase con virus (min)	Velocidad de flujo (cm/h)
1	2,5 VC	0,33	102	25
2	2,5 VC	0,46	73	35
3	2,5 VC	0,65	51	50
4	2,5 VC	0,98	34	75
5	2,5 VC	1,3	26	100

Se cuantifica el ADNbc de MDCK residual en la fracción de cromatografía eluida usando el kit de ensayo de cuantificación PicoGreen tal como se describe por Invitrogen. Se mide la fluorescencia usando el lector de placas fluorescencia Gemini EM de Molecular Devices y se calcula la cantidad de degradación de ADNbc usando el software SoftMax Pro versión 4.8.

La tabla 7 resume los rendimientos de purificación para varias ejecuciones de desarrollo usando tanto el tratamiento con Benzonase® en bolsa como el tratamiento con Benzonase® en columna.

Ejemplo 9: Modelos animales preclínicos

El hurón es un modelo animal robusto usado para evaluar la atenuación e inmunogenicidad de vacunas contra la gripe atenuadas y cepas de vacunas de componentes. Se compara el rendimiento de cepas de influenza derivadas de células producidas a partir del cultivo de células MDCK con las mismas cepas producidas en huevos. La comparación directa de estos materiales en estudios controlados permite un alto nivel de garantía de la comparabilidad de estos productos virales.

Con el fin de evaluar la capacidad de las dos vacunas para infectar o lograr una “toma” en el hurón, se anestesian ligeramente los animales y se les inocula por vía intranasal las preparaciones virales producidas o bien en células o bien en huevos. Se recoge material de lavado nasal a varios puntos de tiempo tras la inoculación y se evalúa la cantidad de virus mediante uno de varios métodos disponibles con el fin de evaluar la cinética y el grado de replicación viral en el tracto respiratorio superior de los animales. Se realizan los experimentos con un intervalo de dosis e incluyen múltiples cepas y diferentes mezclas trivalentes para generalizar la infectividad relativa de cepas hechas crecer en cultivo celular a cepas producidas en huevos. Se usan también estos mismos estudios para evaluar la inmunogenicidad de las cepas de influenza, una propiedad que está vinculada inherentemente a la capacidad de los virus para iniciar la infección. Se extrae sangre de los animales y se recogen lavados nasales a diversos puntos (semanas) tras la inoculación; se usan estas muestras para evaluar las respuestas de IgA nasal y anticuerpos séricos a la infección. La culminación de estos datos, la infectividad, las respuestas de anticuerpos mucosales y anticuerpos séricos se usarán para comparar y evaluar la infectividad relativa de la vacuna producida en células con la vacuna producida en huevos. Se predice que el desenlace más probable es que las cepas de vacuna producidas en células y huevos tienen infectividad e inmunogenicidad similares. Si la vacuna derivada de células parece que es más infectiva o más inmunogénica que el producto derivado de huevos, se realizan estudios adicionales que evalúan la posibilidad de una dosificación inferior.

Tabla 7. Sumario del proceso posterior de TVCC-1

Ejecución de Dev	Dev 2	Dev 3	Dev 4	Dev 5	Dev 6	Dev 7	Dev 8	Dev 9	CTM #2
Cepa	A/Wis	A/Wis	A/NC	B/Mal	B/Mal	A/NC	A/Wis	B/Mal	B/Mal
Cosecha (h)	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	48	48	48
Columna	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG100	BPG100	BPG100	BPG100	BPG100
Carga (log10/ml)	8,32	8,73	8,76	8,40	9,18	9,44	9,33	8,97	9,56
Proceso*	TVCC-1a	VCC-1a	TVCC-1a	TVCC-1b	TVCC-1b	TVCC-1b	TVCC-1b	TVCC-1b	TVCC-1b
Título de VH (CCD)	8,4	8,4	8,4	8,3	8,6	8,4	8,6	8,0	8,3
Título de VH (PD)	7,7^	8,4	8,6	8,1	8,3	8,3	8,4	7,9	8,3
Título final	8,3	8,5	8,5	8,5	8,9	8,6	9,2	9,0	9,7
Rendimiento global §	60,9%	27,0%	6,3%	25,4%	22,0%	1,2%	30,4%	56,3%	57,5%
ADN de H (ng/ml)	n/a	200	480	n/a	720	10800	3440	2070	2050
ADN a granel (ng/dosis) PicoGreen	76,7	n/a	36,4	31,9	n/a	n/a	0,4	0,3	0,06

ADN a granel (ng/dosis) PCR	n/a	n/a	0,92	n/a	0,23	0,18	0,032	0,164	n/a
HCP de VH (µg/ml)	278	392	269	231	250	233	135	174	74
HCP a granel (µg/dosis)	1,10	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,13	0,29	0,14
Benzonase® (ng/ml)	0,9	n/a	0,69	2,1	6,6	3,6	0,27	0,52	LOD

Nota:

* TVCC-1a: Tratamiento con Benzonase® en bolsa; TVCC-1a: Tratamiento con Benzonase® en columna

^ Ensayo FFA basado en anti-NA en lugar de anti-HA

§ Basado en el título de VH-PD

5

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

10

15

Estas evaluaciones de comparabilidad deben proporcionar una perspectiva significativa sobre el potencial bioquímico y/o las diferencias biofísicas del producto de virus primario y demuestran el impacto de estas diferencias epigenéticas sobre el rendimiento de las cepas ca/ts/att medido sometiendo a pase en primer lugar el virus en células humanas o estudios en animales. Basándose en la información de secuencia hasta la fecha, no se espera que haya un impacto sobre el rendimiento inmunogénico de cepas ca/ts/att resultante de la producción en células MDCK.

20

25

Los hurones son un modelo animal bien documentado para la gripe y se usan de manera rutinaria para evaluar el fenotipo de atenuación y la inmunogenicidad de cepas ca/ts/att. En general, se usan animales de 8-10 semanas de edad para evaluar la atenuación; normalmente los diseños de estudio evalúan n=3-5 animales por prueba o grupo control. Se evalúan los estudios de inmunogenicidad en animales de 8 semanas a 6 meses de edad y requieren generalmente n=3-5 animales por artículo de prueba o grupo control. Estos números proporcionan información suficiente para obtener comparaciones válidas estadísticamente o importantes de manera observacional entre grupos. Durante la mayoría de los estudios, pueden notarse signos similares a la gripe, pero no es probable. Los hurones no presentan signos de disminución del apetito o del peso, descarga nasal u ocular; la observación de signos de enfermedad similar a la gripe es una parte necesaria del estudio y no se justifican intervenciones tales como analgesia. Otros signos de molestias, tales como úlceras abiertas o pérdida de peso significativa, darían como resultado una eliminación apropiada del animal tras la discusión con el veterinario encargado.

30

35

Ejemplo 10: Formulación de medio libre de suero para cultivo celular

Este ejemplo describe varias formulaciones de medios libres de suero adecuados para el cultivo de células de la invención. Aunque se han descrito determinados de tales medios anteriormente, para completitud y facilidad de uso, se describe cada uno en su totalidad a continuación.

40

Formulación de medio libre de suero de Taub: El medio de Taub (Taub y Livingston, 1981, Ann NY Acad Sci., 372: 406) es una formulación de medio libre de suero que consiste en DMEM/F12 de HAM (1:1) que contiene glucosa 4,5 g/l y glutamina 4 mM como formulación de medio basal, a la que se añaden las hormonas/los factores tal como se indica en la tabla 8.

45

Tabla 8. Hormonas y factores de crecimiento añadidos a formulaciones de medios libres de suero

Nombre del componente	Concentración final
Insulina	5 µg/ml
Transferrina	5 µg/ml
Triyodotironina (T3)	5×10^{-12} M
Hidro cortisona	5×10^{-8} M
Prostaglandina E1	25 ng/ml
Selenito de sodio	10^{-8} M

- Se prepara SFM de Taub nuevo en el momento del pase o vuelve a alimentarse mediante la adición de disoluciones madre de complementos de hormonas a medio DMEM/F12 de Ham SF + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l + selenito de sodio 10^{-8} M. Se preparan 100 ml de medio de Taub mediante la adición de 100 μ l de disolución madre de insulina (5 mg/ml), 100 μ l de disolución madre de transferrina (5 mg/ml), 100 μ l de disolución madre de triyodotironina (T3) (5×10^{-9} M), 5 μ l de disolución madre de hidrocortisona (10^{-3} M) y 500 μ l de disolución madre de prostaglandina E1 (50 μ g/ml) a medio DMEM/F12 de Ham basal + glutamina 4 mM + glucosa 4,5 g/l + selenito de sodio 10^{-8} M. Se preparan todas las disoluciones madre tal como sigue:
- 10 Disolución madre de insulina – Se prepara una disolución madre de 5 mg/ml disolviendo la cantidad apropiada de insulina en HCl 0,01 N. Se hace pasar la disolución a través de un filtro de calidad de esterilización de 0,2 micrómetros y se alícuota en un criovial Nalgene y se almacena a 4-20°C.
- 15 Disolución madre de transferrina – Se prepara una disolución madre de 5 mg/ml disolviendo la cantidad apropiada de transferrina en agua MilliQ. Se hace pasar la disolución a través de un filtro de calidad de esterilización y entonces se alícuota en un criovial Nalgene y se almacena a $< -20^{\circ}\text{C}$.
- 20 Disolución madre de triyodotironina (T3) – Se prepara una disolución madre disolviendo la cantidad apropiada de T3 en NaOH 0,02 N para obtener una disolución 10^{-4} M. Se diluye adicionalmente esta disolución madre hasta una concentración de disolución madre 5×10^{-9} M con NaOH 0,02 N, se hace pasar a través de un filtro de calidad de esterilización, se alícuota en un criovial Nalgene y se almacena a $< -20^{\circ}\text{C}$.
- 25 Disolución madre de hidrocortisona – Se prepara una disolución madre 10^{-3} M disolviendo la cantidad apropiada de hidrocortisona en alcohol étílico al 100% y se alícuota en crioviales Nalgene. Se almacenan los viales a 4°C durante 3-4 meses.
- Disolución madre de prostaglandina E1 – Se prepara una disolución madre 50 μ g/ml disolviendo la cantidad apropiada de PGE1 en alcohol étílico estéril al 100% y se alícuota en un criovial Nalgene y se almacena a $< -20^{\circ}\text{C}$.
- 30 Disolución madre de Na_2SeO_3 – Se prepara una disolución madre 10^{-2} M disolviendo la cantidad apropiada de selenuro de sodio en agua WFI o agua MilliQ. Se diluye esto adicionalmente en agua hasta una concentración final de 10^{-5} M, se hace pasar a través de un filtro de calidad de esterilización y se almacena a 4°C.
- 35 Disolución madre de citrato de amonio férrico (FAC) – Se prepara una disolución madre 200 mg/l disolviendo la cantidad apropiada de citrato de amonio férrico en agua WFI o agua MilliQ, se hace pasar a través de un filtro de calidad de esterilización y se almacena a 4°C.
- 40 Disolución madre de tropolona – Se prepara una disolución madre 250 mg/l disolviendo la cantidad apropiada de tropolona en agua WFI o agua MilliQ, se hace pasar a través de un filtro de calidad de esterilización y se almacena a 4°C.
- Formulación de medios libres de suero MediV (MediV 101, 102, 103, 104 y 105):* Cada formulación de medio libre de suero MediV usa medio de Taub como medio basal y añade complementos tal como sigue:
- 45 MediV 101: Medio de Taub + peptona de trigo E1 2,5 g/l de Organo Technie (n.º de cat. 19559). Se almacena la peptona de trigo E1 en agua como una disolución madre 250 g/l estéril.
- MediV 102: Medio de Taub + 100 X concentrado lipídico definido químicamente de GIBCO BRL (n.º de cat. 11905) añadido hasta una concentración final de 1X.
- 50 MediV 103: Medio de Taub + concentrado lipídico de concentración final 1X de GIBCO + peptona de trigo E1 2,5 g/l de Organo Technie.
- MediV 104: Medio de Taub + concentrado lipídico de concentración final 1X de GIBCO + peptona de trigo E1 2,5 g/l de Organo Technie + EGF 5 μ l/L (múltiples fuentes).
- 55 MediV 105: Medio de Taub sin transferrina + concentrado lipídico de concentración final 1X de GIBCO + peptona de trigo E1 de 2,5 g/l de Organo Technie + EGF 5 μ g/l + citrato de amonio férrico 0,2 mg/l + tropolona 0,25 mg/l.
- 60 M-32: MediV 105 que tiene una concentración de glucosa de entre 4 g/l y 4,5 g/l + disoluciones de oligoelementos A, B y C (tabla 9) a una concentración final de 1X. Opcionalmente, se complementa M-32 con de 4 g/l a 4,5 g/l adicionales de glucosa (M-32+G)
- 65 MediV 107: Otro medio libre de suero basado en MediV 105 que incluye determinados oligoelementos. La formulación final de MediV 107 se muestra en la tabla 10.

Formulación de medios M18M: Además, M18M es otro medio libre de suero que puede usarse para cultivar células de la invención. M18M es un medio libre de suero basado en polvo de DMNSO-7 que contiene complementos tal como se expone en la tabla 11, a continuación.

5

Tabla 9. Disoluciones de oligoelementos 1000X A, B y C

Dis. de oligoelementos A		Dis. de oligoelementos C	
Componentes	mg/l	Componentes	mg/l
CuSO ₄ •5H ₂ O	1,60	AlCl ₃ •6H ₂ O	1,20
ZnSO ₄ •7H ₂ O	863,00	AgNO ₃	0,17
Selenito•2Na	17,30	Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	2,55
Citrato férrico	1155,10	KBr	0,12
Dis. de oligoelementos B		CdCl ₂	2,28
Componentes	mg/l	CoCl ₂ •6H ₂ O	2,38
MnSO ₄ •H ₂ O	0,17	CrCl ₃ (anhidro)	0,32
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	140,00	NaF	4,20
NH ₄ VO ₃	0,65	GeO ₂	0,53
NiSO ₄ •6H ₂ O	0,13	KI	0,17
SnCl ₂ (anhidro)	0,12	RbCl	1,21
Ácido molíbdico, sal de amonio	1,24	ZrOCl ₂ •8H ₂ O	3,22

Tabla 10. Formulación de MediV 107

Componente	g/l
Sales	
Cloruro de calcio, anhidro	0,1166
Cloruro de magnesio	0,0286
Sulfato de magnesio, anhidro	0,0488
Cloruro de potasio	0,3118
Cloruro de sodio	6,8600
Fosfato de sodio, monobásico, monohidratado	0,0625
Fosfato de sodio, dibásico, anhidro	0,0710
Hidratos de carbono	
MOPS	3,1389
Putrescina, 2HCl	0,0001
Piruvato de sodio	0,0550
Nucleósidos	
Adenosina	0,0175
Guanosina	0,0175
Hipoxantina, sal de Na	0,0103
D-Ribosa	0,0175
Timidina	0,0004
Uridina	0,0175
Aminoácidos	
L-Alanina	0,0223

L-Arginina HCl	0,2739
L-Asparagina H ₂ O	0,0339
Ácido L-aspártico	0,0333
L-Cisteína HCl H ₂ O	0,0686
Ácido L-glutámico	0,0368
Glicina	0,0338
L-Histidina HCl H ₂ O	0,0735
L-Isoleucina	0,1069
L-Leucina	0,1115
L-Lisina HCl	0,1638
L-Metionina	0,0323
L-Fenilalanina	0,0685
L-Prolina	0,0403
L-Serina	0,0473
L-Treonina	0,1011
L-Triptófano	0,0192
L-Tirosina 2Na, dihidratada	0,0918
L-Valina	0,0997
Vitaminas	
d-Biotina (vit B7 y vit H)	0,0000035
D-Pantotenato de calcio	0,00224
Cloruro de colina	0,00898
Cianocobalamina (vit B12)	0,00068
Ácido fólico	0,00265
mio-Inositol	0,0126
Niacinamida	0,00202
Piridoxina HCl (vit B6)	0,002031
Riboflavina	0,000219
Tiamina HCl (vit B1)	0,00217
∞ Ácido linoleico, sal de sodio	0,000045
∞ Ácido DL-lipoico	0,000105
Tropolona	0,00025
Metales traza	
NH ₄ VO ₃	6,5E-07
AgNO ₃	1,7E-07
Cloruro de aluminio 6H ₂ O	0,0000012
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	2,55E-06
Cloruro de cadmio (CdCl ₂)	2,28E-06
Cloruro de cromo (CrCl ₃ , anhidro)	3,2E-07
Cloruro de cobalto 6H ₂ O	2,38E-06
Sulfato cúprico, pentahidratado	0,0000029

Nitrato férrico, nonahidratado	0,00005
Citrato de amonio férrico	0,0014
Sulfato ferroso, heptahidratado	0,000417
GeO ₂	5,3E-07
MnSO ₄ H ₂ O	1,7E-07
Sal de amonio de ácido molíbdico	1,24E-06
Sulfato níqueloso (NiSO ₄ 6H ₂ O)	1,3E-07
Bromuro de potasio	1,2E-07
Yoduro de potasio	1,7E-07
Cloruro de rubidio	1 21E-06
Selenito de sodio	0,000019
Fluoruro de sodio	0,0000042
Meta-Silicato de sodio 9H ₂ O	0,00014
Cloruro estanoso	1,2E-07
Sulfato de zinc, heptahidratado	0001295
ZrOCl ₂ 8H ₂ O	3,22E-06
Otros componentes	
CDLC	3X
Glucosa (45%)	4,5 g/l
L-Glutamina (200 mM)	4 mM
Lípidos CD (100X)	3X
Peptona de trigo (25%)	2,5 q/l
Insulina (5 mg/ml)	5 ug/ml
T ₃ (5x10 ⁻⁹ M)	5x10 ⁻¹² M
Hidrocortisona (10 ⁻³ M)	5x10 ⁻⁸ M
PGE1 (50 µg/ml)	25 ng/ml
EGF (1 µg/ml)	5 ug/l
Osmolalidad	360
pH	7,2 - 7,4

Tabla 11. Formulación de M18M

Componente	Cantidad o concentración final
Concentrado de polvo de DMNSO-7	21,22 g/l
Dis. madre de citrato de amonio férrico (FAC) (1000X)	1 ml/l
Polietilenglicol	2 g/l
β-Mercaptoetanol	55 µm
Etanolamina	2,44 mg/ml
Tropolona	5 µM
Peptona de trigo	2,5 g/l
2-Hidroxipropil-b-ciclodextrina	125 mg/l
L-Prolina	183,4 mg/l

Sulfato de cobre	1,6 µg/l
CS5-20 (fuente de colesterol)	25 mg/l
Concentrado lipídico definido químicamente (CDLC)	10 ml/l
Sal de sodio de triyodo-L-tironina (T3)	5 pM
Bicarbonato de sodio	3,024 g/l
Glutamina	4 mM
Cloruro de colina	50 mg/l
L-Serina	60,9 mg/l
Insulina	20 mg/l
PGE	250 ng/l
Hidrocortisona	5 ⁻¹¹ M
EGF	5 µg/l

Ejemplo 11: Crecimiento de virus influenza hasta títulos muy altos

Este ejemplo describe los resultados de experimentos que muestran el crecimiento de virus influenza sensibles a la temperatura, adaptados al frío y atenuados hasta un título muy alto. En particular, estos experimentos dieron como resultado títulos de virus de log₁₀ TCID₅₀/ml de 9 para cuatro de tales virus.

Se hace crecer el subclón 1-A o 1-B de MDCK en o bien MediV 105 o bien M18M durante tres días tras la siembra, entonces inmediatamente antes de la infección se elimina el medio de crecimiento y se añade medio nuevo, tal como medio MediV 105; M18M o DMEM/F12 complementado con glucosa 4,5 g/l, glutamina 4 mM y TrypLE (1:100) (Invitrogen). Entonces se infectan las células con virus influenza sensibles a la temperatura, adaptados al frío, atenuados reordenantes que comprenden la estructura principal de FluMist™ (por ejemplo, todos los segmentos génicos excepto los que codifican para las proteínas HA y NA) y las proteínas HA y NA de A/Nueva Caledonia, A/Wisconsin, A/Vietnam o B/Malasia.

Se presentan los resultados de un experimento en la tabla 12. La tabla 12 demuestra que estos procedimientos pueden dar como resultado títulos virales de al menos log₁₀ TCID₅₀/ml de 8,2 y tan altos como log₁₀ TCID₅₀/ml de 9,1 a los 2, 3, 4 y 5 días tras la infección. Estos datos indican que un cambio de medio o una complementación de nutrientes agotados antes de o durante la infección dará como resultado un aumento en los rendimientos virales.

Tabla 12. Crecimiento hasta títulos > log₁₀ TCID₅₀/ml de 8,0

Cepas		2 DPI	3 DPI	4 DPI	5 DPI	Control
ca A/Nueva Caledonia	N.º 1	9,0 ± 0,06	9,0 ± 0,12	8,7 ± 0,00	8,7 ± 0,06	7,8 ± 0,06
ca A/Nueva Caledonia	N.º 2	8,9 ± 0,06	9,0 ± 0,06	8,9 ± 0,10	8,8 ± 0,00	
ca A/Wisconsin	N.º 1	8,5 ± 0,06	8,6 ± 0,06	8,6 ± 0,00	8,5 ± 0,06	8,3 ± 0,00
ca A/Wisconsin	N. 2	8,4 ± 0,06	8,7 ± 0,06	8,9 ± 0,12	8,8 ± 0,10	
ca A/Vietnam	N.º 1	8,8 ± 0,00	9,1 ± 0,06	9,0 ± 0,10	9,0 ± 0,00	8,2 ± 0,06
ca A/Vietnam	N.º 2	8,8 ± 0,06	9,0 ± 0,06	9,1 ± 0,06	9,0 ± 0,10	
ca B/Malasia	N.º 1	8,5 ± 0,00	8,5 ± 0,00	8,3 ± 0,00	8,2 ± 0,06	7,9 ± 0,15
ca B/Malasia	N.º 2	8,5 ± 0,00	8,4 ± 0,00	8,3 ± 0,00	8,2 ± 0,00	

Ejemplo 12: Proceso de biorreactor de uso único

Los biorreactores o fermentadores convencionales (es decir, reactores de vidrio o acero inoxidable) usados normalmente para la producción de material de vacuna requieren limpieza, esterilización y validación antes de cada uso. Para mitigar la necesidad de limpieza y validación, se ha desarrollado un proceso de cultivo celular desechable usando tecnología de biorreactor desechable. Este proceso permite un tiempo de procesamiento acortado, proporciona ahorros de costes significativos y reduce la infraestructura requerida para la producción de material de vacuna. El proceso usa un biorreactor de uso único (SUB). Están disponibles comercialmente numerosos sistemas de SUB y pueden utilizarse en el proceso. En resumen, el proceso de SUB implica el crecimiento de células MDCK

SF sobre microportadores en medio de crecimiento durante ~4 días, seguido por infección de células con el virus influenza tras realizar un intercambio de medio de reemplazo del medio de crecimiento por el medio de infección. Alternativamente, la infección de las células con el virus influenza puede realizarse directamente, sin intercambio de medio. Las células para sembrar el SUB pueden ser adherentes y pueden obtenerse de frascos rotatorios u otro método de cultivo fácilmente escalable usado para el crecimiento de células adherentes.

Estudios piloto demostraron que aunque velocidades de agitación de 50-100 rpm soportaban el crecimiento celular, células hechas crecer a 90-100 rpm conducían a un crecimiento celular mejorado. No se sometieron a prueba velocidades de agitación superiores en estos estudios. Estudios piloto también demostraron que una concentración de microportador de aproximadamente 2-3 g/l y una densidad de siembra de células de $\sim 9,0 \times 10^4$ células/ml (corresponde a ~ 10 -15 células/MC) conducían a rendimientos virales y crecimiento celular mejorados. Además, el uso de un medio complementado con glucosa también dio como resultado rendimientos virales y crecimiento celular mejorados. Basándose en estos y otros estudios pilotos, se desarrollaron métodos de SUB con y sin intercambio de medio antes de la infección.

MATERIALES

Se usó el SUB A de Hyclone (Hyclone, n.^{os} de piezas SH30715,01, SH30720,01 y SH3B1744,01) para este conjunto de experimentos. El SUB consiste en tres componentes principales: 1. Recipiente de soporte externo con un impulsor de mezclador completo con unidad de control y una camisa calentadora eléctrica, 2. Recipiente BioProcess de biorreactor de uso único (BPC) – completo con mezclador, rociador, orificios de entrada y de salida de filtro de ventilación, más orificios para la integración de sondas de sensor y 3. Varilla de árbol de mezclador que se inserta en el biorreactor BPC a través del motor del impulsor de mezclado y se fija en el conjunto de agitador desechable. Pueden hacerse numerosas alteraciones por encargo en uno o más componentes del aparato de SUB, por ejemplo el orificio de salida puede ampliarse para facilitar la cosecha e intercambio de medio, de manera similar y en línea un filtro de microportador también puede facilitar la cosecha e intercambio de medio.

Se utiliza MedIV 105 (véase la sección 8.10) o MedIV 105 más glucosa 4,5 g/l adicional (concentración final de 9,0 g/l, denominado “MedIV 105+G”) como medio de crecimiento. Cuando se utiliza MedIV 105 el cultivo puede complementarse con glucosa 20 mM en el día 2 a 3 tras la inoculación para impedir el agotamiento de glucosa. La concentración de glucosa inicial superior de MedIV+G puede eliminar la necesidad de complementación de glucosa.

El medio de infección consiste en DMEM/F12, glucosa, glutamina y TrypLE selecto. La tabla 13 muestra los componentes y la concentración de cada uno en el medio de infección.

Tabla 13. Medio de infección

Componente	Concentración final	Cantidad añadida por litro de DMEM/F12
DMEM/F12	1 l/l	1000 ml
Glucosa	4,5 g/l	10 ml
L-glutamina	4 mM	20 ml
TrypLE selecto	de 1:33 a 1:100	20 ml

MÉTODO CON INTERCAMBIO DE MEDIO

Se prepara una disolución madre de microportador hinchando el microportador en tampón seguido por un lavado con tampón y esterilización. Antes del uso se elimina el tampón y se añade el medio apropiado. Por ejemplo se empapan 60 g de microportador Cytodex 3 (2 g/l de volumen de trabajo total en SUB) en 3,0 l de PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} de pH 7,4 (Cytodex3 50 ml/g) en un frasco de alimentación de vidrio de 5 l durante al menos 3 horas a temperatura ambiente. Entonces se elimina el sobrenadante mediante aspiración y se reemplaza por 1,5 l de PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} nuevo de pH 7,4. Entonces se esterilizan los microportadores esterilizando en autoclave este frasco de alimentación a 121°C durante 30 minutos. Justo antes de la inoculación se elimina la disolución de PBS mediante aspiración y se añaden 4,0 l de medio DMEM/F12 y se añaden los microportadores estériles al SUB en condiciones estériles. Alternativamente, los microportadores Cytodex 3 pueden esterilizarse *in situ* (es decir, dentro de las bolsas de SUB) usando irradiación γ .

Se obtienen células del clon 1-B para sembrar el SUB aumentando a escala a partir de 1 vial congelado. Se hacen crecer las células en MedIV 105 o MedIV 105+G y pueden aumentarse a escala tal como sigue: en el día 1 se descongela un vial en un frasco T-75; en el día 3 se dividen las células en frascos T-225 (densidad de siembra $\approx 5 \times 10^4$ células/ml); en el día 7 se dividen las células en frascos rotatorios (densidad de siembra $\approx 6,7 \times 10^4$ células/ml); en el día 10 se dividen las células en frascos rotatorios adicionales (densidad de siembra $\approx 6,7 \times 10^4$ células/ml); en el día 14 se tripsinizan las células de ~ 30 -36 frascos rotatorios y se usan para inocular el biorreactor SUB. Los parámetros de inoculación se indican en la tabla 14. Se transfieren las células tripsinizadas reunidas recogidas de

los frascos rotatorios al SUB que contiene microportadores Cytodex 3 en 30 l de medio SFMV105 a través de la línea de adición de inóculo del BPC usando una bomba peristáltica. Los cultivos pueden complementarse con glucosa 20 mM en el día 3 tras la inoculación para impedir el agotamiento de glucosa.

- 5 Se hacen crecer las células durante 4 días en las condiciones de parámetros de crecimiento detalladas en la tabla 15. Se controla el pH usando el controlador Applikon, inicialmente rociando CO₂ y en fases de cultivos posteriores añadiendo base (NaOH, 1 M). Se controla el OD a $\geq 50\%$ usando el controlador Applikon rociando O₂. Durante el crecimiento celular es aceptable que el OD sea tan alto como el 100% y caiga hasta tan bajo como el 35%. Se controla la temperatura a los valores apropiados con el controlador Hyclone. Se controla la agitación con el controlador Hyclone a 100 rpm.

Tabla 14. Parámetros de inoculación

Volumen de trabajo	30±1 l
Concentración de microportador (MC)	de 2 a 3±0,2 g/l
Cantidad de microportador	de 60 a 90±1 g
Células/MC (calculado)	15±5
Densidad de siembra (células/ml)	9,0±1,5 x 10 ⁴

Tabla 15. Parámetros de crecimiento

Agitación	100±10 rpm
Temperatura	37 (±0,5)°C
pH	7,4 (±0,1)
Oxígeno disuelto (OD) [saturación de aire]	$\geq 35\%$ [controlado al 50%]
Caudal de O ₂ [máximo] (l/min)	1,0±0,2
Caudal de CO ₂ [máximo] (l/min)	0,20±0,04

- 15 Se realiza la infección a los 4±0,5 días tras la siembra. Antes de la infección, puede realizarse un recuento de núcleos. Las células deben alcanzar entre 0,5-2,0x10⁶ células/ml en este momento y se espera generalmente que alcancen una densidad celular de al menos $\sim 1 \times 10^6$ células/ml. Tras contarse los núcleos si se desea, se inhabilitan todos los bucles de control y se permite que las perlas de microportador se sedimenten durante ~ 45 minutos.
- 20 Entonces se realiza un intercambio de medio en el que se bombea el medio de crecimiento fuera a través del orificio de intercambio del SUB y se añade medio de infección a través del orificio de adición de medio hasta un volumen final de 30 l. Se eliminan aproximadamente 20-24 l y se añade la misma cantidad de medio de infección nuevo. Esto corresponde a un intercambio de medio de aproximadamente el 66-80%. Los parámetros para la infección se facilitan en la tabla 16.

Tabla 16. Parámetros para la infección

Volumen de trabajo	30 l
Agitación	100±10 rpm
Temperatura	33 (±0,5)°C
pH	7,4 (±0,1)
Oxígeno disuelto (OD) [saturación de aire]	$\geq 35\%$ [controlado al 50%]
Caudal de O ₂ [máximo] (l/min)	1,0±0,2
Caudal de CO ₂ [máximo] (L/min)	0,20±0,04

La infección puede realizarse a una MOI (multiplicidad de infección) de $\sim 0,001$ - 0,003 FFU/célula (en referencia a la fórmula a continuación).

Cantidad de virus en μ l añadida a S.U.B. = células totales en SUB x MOI (FFU/célula) / 10⁶ título FFA de virus (FFU/ml) x 1000

Alternativamente, para minimizar las etapas del proceso pueden añadirse 2x10³ FFU/ml de virus. Esto corresponde a una MOI de $\sim 0,001$ -0,003 FFU/célula. En estas condiciones la cantidad de virus en ml añadida a S.U.B

= volumen en el reactor (ml) x 2×10^3 FFU/ml / $10^{\text{título FFA de virus}}$ (FFU/ml) x 1000

Pueden utilizarse procedimientos de toma de muestras en proceso en varias etapas para la monitorización. Se recogen 2 x 10 ml de suspensión celular antes de la infección diariamente desde el día 0 hasta el día 4 tras la siembra para el recuento de núcleos, el análisis de imágenes y pH y metabolitos (glucosa, glutamina, lactato, NH_4^+). Se extraen muestras de 2 x 5 ml tras la infección en el día 2 y día 3 tras la infección. Se estabilizan las muestras con fosfato de sacarosa (razón de fosfato de sacarosa con respecto a sobrenadante de virus = 1:9). Estas muestras se congelarán inmediatamente y se almacenarán a -80°C y pueden usarse para determinar los títulos virales.

- 10 Se obtiene la cosecha de virus en el día 3 tras la infección (+/-12 h). Se desconectan los controladores en el SUB y Applikon y se permite que los microportadores se sedimenten durante al menos 45 min. Entonces se transfiere el sobrenadante a una bolsa desechable estéril y se estabiliza con fosfato de sacarosa a una razón 1:9 ratio (V/V) (fosfato de sacarosa:cosecha de virus = 1:9). El fosfato de sacarosa debe añadirse en volumen y no en peso.

15 RESULTADOS CON INTERCAMBIO DE MEDIO

Se resumen aquí los resultados de múltiples ejecuciones de producción en SUB sometiendo a prueba los diferentes parámetros de medio, inoculación e infección descritos en la sección 8.12.2. Tal como se muestra en la tabla 18, toda la variación sometida a pruebas dio como resultado títulos virales pico de al menos $8,0 \log_{10}$ FFU/ml lo que demuestra que el proceso de SUB con intercambio de medio es robusto.

Para una ejecución de producción de B/Malasia (ejecución A en SUB) la concentración de microportador (MC) era de 3 g/l de volumen de trabajo (30 l) y la densidad de siembra de células era de 10 células/MC o $\sim 9,0 \times 10^4$ células/ml. Se complementó el cultivo con 20 mM de glucosa en el día 3 tras la inoculación para impedir el agotamiento de glucosa. Se usó el subclón 1-B de MDCK y la densidad celular alcanzó $\sim 1,3 \times 10^6$ células/ml para el día 4 tras la inoculación. Se mantuvieron los parámetros de crecimiento restantes mostrados en la tabla 15 tal como se describe a lo largo de toda la fase de crecimiento. La tabla 17 muestra los datos de crecimiento de células y el tiempo de duplicación para la ejecución de producción de B/Malasia. Se representa gráficamente la curva de crecimiento celular en la figura 13, así como el análisis de metabolitos de glucosa, lactato, glutamina y concentración de ión amonio medidos mediante Bioprofile para la ejecución de producción de B/Malasia.

Tabla 17. Crecimiento celular

Tiempo (h)	Densidad celular total x 10^6 células/ml	Tiempo de duplicación (h)
0,15	0,09	
21,67	0,10	141,55
46,00	0,30	15,35
65,33	0,60	19,57
70,00	0,69	21,84
88,83	1,30	20,61

El tiempo de duplicación es de aproximadamente 20 h durante la fase exponencial. En el día 4 tras la siembra se intercambió ~67% del medio por medio de infección (véase anteriormente) que contiene TrypLE selecto a una concentración final de 1:100. Entonces se infectaron las células con B/Malasia/2506/04 a una MOI de 0,001 FFU/célula. Se mantuvieron los parámetros de infección mostrados en la tabla 16 a lo largo de toda la fase de infección. Se analizaron muestras tomadas a los 2 y 3 días tras la infección (dpi) usando el ensayo fluorescente focal (FFA) para determinar la infectividad de virus. Se observó que el título de virus alcanzaba un pico a ~2 dpi a alrededor de $8,0 \log_{10}$ FFU/ml. Aunque los títulos virales pico obtenidos usando TrypLE a una concentración final de 1:100 a partir de esta y otras ejecuciones eran de al menos $8,0 \log_{10}$ FFU/ml, se observaron ocasionalmente títulos inferiores (datos no mostrados), y por tanto se usaron generalmente concentraciones de TrypLE superiores (de 1:33 a 1:50).

Se realizaron dos ejecuciones de SUB usando una concentración de microportador de 2 g/l y MedIV 105+G como medio de crecimiento sin ninguna complementación de glucosa adicional. Se usó el subclón 1-B de MDCK a una densidad de siembra de $\sim 9,0 \times 10^4$ células/ml (corresponde a ~15 células/MC). Antes de la infección se intercambió ~80% del medio y se añadió TrypLE selecto a una concentración final de 1:100 (ejecución B de SUB) o 1:50 (ejecución C de SUB). Se infectaron las células a una concentración de virus de 2×10^3 FFU/ml. Los títulos virales pico para estas ejecuciones fueron de $8,4 \log_{10}$ FFU/ml de A/Wisconsin (ejecución B de SUB) y $8,7 \log_{10}$ FFU/ml de A/Nueva Caledonia (ejecución C de SUB).

Se realizaron seis ejecuciones de producción adicionales (ejecuciones D – I de SUB) usando una concentración de microportador de 2 g/l y MedIV 105+G como medio de crecimiento sin ninguna complementación de glucosa

adicional. Como anteriormente se usó el subclón 1-B de MDCK a una densidad de siembra de $\sim 9,0 \times 10^4$ células/ml, que corresponde en este caso a ~ 15 células/MC. Se mantuvieron los parámetros de crecimiento restantes tal como se detalla en la tabla 15. En el día 4 $\pm$ 0,5 tras la siembra se eliminó $\sim 66\%$ del medio de crecimiento (MedIV 105+G) y se añadió la misma cantidad de medio de infección (véase la tabla 13) que contenía TrypLE selecto a una concentración final de 1:33. Entonces se infectaron las células con A/Nueva Caledonia/20/99; A/Wisconsin/67/05; o B/Malasia/ 2506/04 a una concentración de virus de 2×10^3 FFU/ml y se mantuvieron los parámetros de infección mostrados en la tabla 16 a lo largo de toda la fase de infección. Se muestran los títulos virales pico para las ejecuciones de SUB en la tabla 18 y oscilan entre 8,55-8,75 $\log_{10}$ FFU/ml. Los perfiles de crecimiento, glucosa, lactato, glutamina e ión amonio eran comparables a lo observado para la ejecución A de SUB (véase la figura 13 y datos no mostrados).

Tabla 18. Títulos virales pico para ejecuciones de SUB

Ejecución de SUB	Título pico ($\log_{10}$ FFU/ml)	Virus	Ejecución de SUB	Título pico ($\log_{10}$ FFU/ml)	Virus
A	8,0	B/Malaysia	F	8,7	A/Nueva Caledonia
B	8,4	A/Wisconsin	G	8,8	A/Nueva Caledonia
C	8,7	A/New Caledonia	H	8,6	A/Wisconsin
D	8,6	B/Malasia	I	8,6	A/Wisconsin
E	8,7	B/Malasia			

RESULTADOS SIN INTERCAMBIO DE MEDIO

La eliminación de la etapa de intercambio de medio reducirá costes y mejorará la eficacia del proceso. Pruebas iniciales a una dilución de TrypLE de 1:100 ($\sim 0,01x$) sugerían que el medio de crecimiento condicionado puede comprender uno o más componentes que inhiben la acción de TrypLE y por tanto inhiben el crecimiento de virus (datos no mostrados). Se realizaron experimentos piloto en los que se varió la concentración de TrypLE. En resumen, se hicieron crecer células MDCK en un biorreactor de 2 l durante 4 días en condiciones convencionales (cultivo madre). Entonces se usó el cultivo madre para inocular frascos de agitación con diferentes niveles de intercambio de medio y concentraciones de TrypLE, justo antes de la infección con A/Nueva Caledonia. Se usaron cuatro diluciones/concentraciones diferentes de TrypLE 1:100 ($\sim 0,01x$); 1:50 ($\sim 0,02x$); 1:33 ($\sim 0,03x$); y 1:25 ($\sim 0,04x$). Se tomaron muestras de los frascos a 2 y 3 dpi para determinar el título de virus. Se representan gráficamente los títulos virales obtenidos para cada razón de intercambio de medio a 2 y 3 dpi en la figura 14A. Estos datos muestran que incluso sin ningún intercambio de medio, la adición de TrypLE a 1:25-1:33 produce un título cercano a 8 $\log_{10}$ FFU/ml. Basándose en estos datos una dilución 1:16 de TrypLE debe producir un alto título sin ningún intercambio de medio. Se realizó un experimento similar a concentraciones de TrypLE superiores. En resumen, se preparó un cultivo madre tal como se describió anteriormente y se usó para inocular frascos de agitación sin intercambio de medio a 1:1-1:25 (que corresponde a concentraciones de TrypLE de 0,5x-0,04x) justo antes de la infección con A/Nueva Caledonia. Se determinó el título viral pico a 2 y 3 dpi y se representó gráficamente en la figura 14B. En este caso, se obtuvieron títulos virales de más de 8 log para la primera vez sin intercambio de medio. Estos datos indican que la concentración de TrypLE óptima es de una dilución de entre 1:25-1:12,5 y que concentraciones superiores de TrypLE no mejoran el rendimiento viral. Basándose en estos resultados se examinó la producción de dos cepas virales adicionales, B/Malasia/2506/04 y A/Vietnam/1203/2004, con y sin intercambio de medio (usando dilución 1:33 y 1: 12,5 de TrypLE, respectivamente). Se representan gráficamente los títulos virales a lo largo del tiempo en la figura 14C. Los títulos virales pico para B/Malasia/2506/04 fueron de 8,9 y 8,7 $\log_{10}$ FFU/ml (con y sin intercambio de medio, respectivamente). De manera similar, los títulos virales pico para A/Vietnam/1203/2004 fueron de 8,6 y 8,0 $\log_{10}$ FFU/ml (con y sin intercambio de medio, respectivamente). Por tanto, el aumento de la cantidad de TrypLE hasta una dilución 1:12,5 (que corresponde a 0,08x) puede compensar los efectos de los medios condicionados dando como resultado títulos virales pico sin intercambio de medio de al menos 8 $\log_{10}$ FFU/ml.

Ejemplo 13: Optimización de MOI

Debido a la aparición continua (o aparición de nuevo) de cepas de influenza diferentes, cada estación se generan nuevas vacunas de influenza basándose en las cepas de influenza circulantes. Desgraciadamente, algunas cepas de vacuna de influenza (por ejemplo, cepas de vacuna reordenantes sensibles a la temperatura, adaptadas al frío) son más difíciles de hacer crecer hasta títulos altos. El título del biorreactor no sólo define la capacidad de producción, sino que también afecta al coste fabricación del producto, por lo que es deseable mejorar el título viral (es decir, el título viral pico). Tal como se mencionó anteriormente, se han examinado varios parámetros para optimizar la productividad de cepas de vacuna. Aquí se resumen los resultados de los estudios para aumentar la productividad (es decir, el título viral) para varias cepas. Estos estudios identificaron la MOI (partículas virales usadas para infección por célula MDCK) como un parámetro que puede someterse a prueba y ajustarse fácilmente para optimizar el rendimiento y permitir el rápido aumento a escala y la producción de cepas de vacuna estacionales y pandémicas.

Estos estudios se llevaron a cabo haciendo crecer células MDCK subclón 1-B en un biorreactor e infectando las células en frascos de agitación con diferentes cantidades de virus. Los detalles del estudio son los siguientes: Se inocularon perlas microportadoras Cytodex 3 que contienen M-32 +G a 2 g/l con células MDCK subclón 1-B a ~15 células/microportador en un recipiente de biorreactor de 3 l. Se hicieron crecer las células a 37°C, 90 rpm, pH 7,4 y OD del 50% (controlado usando rociado de O₂ y CO₂). A ~ 4 días tras la siembra (dps), se intercambió el 66% del medio de crecimiento en el biorreactor con medio de infección (DMEM/F12 + D-glucosa 4,5g/l + L-glutamina 4 mM + 1XTrypLE seleccionado a una dilución final de 1:33). Se transfirieron cantidades iguales de cultivo (30 ml) a diferentes frascos de agitación de 125 ml. Se infectaron estos frascos de agitación con diferentes cantidades de una cepa de virus específica (es decir, 2, 20, 200, 2000 y 20000 FFU/ml, correspondientes a aproximadamente 1x10⁻⁶, 1x10⁻⁵, 1x10⁻⁴, 1x10⁻³ y 1x10⁻² FFU/célula, respectivamente). Tras la infección, se incubaron los frascos a 33°C y 100 rpm. Se monitorizaron varios parámetros incluyendo la densidad de células viables, la concentración de metabolitos (tanto antes como después de la infección), así como el título viral en diversos momentos tras la infección (por ejemplo, 1, 2, 3 y 4 días tras la infección (dpi)). Los resultados del título viral pico para cuatro cepas sometidas a prueba en estos estudios se muestran en la tabla 19. Para cada cepa sometida a prueba, se observó que el título viral pico aumentaba cuando se reducía la MOI desde ~1x10⁻³ FFU/célula (la MOI usada en el proceso de SUB descrito en la sección 8.12 anterior) hasta ~1x10⁻⁴ FFU/célula. El aumento observado en el título pico viral osciló entre 0,3 log₁₀ FFU/ml hasta 1,3 log₁₀ FFU/ml. Debe observarse que en algunos casos los títulos virales pico se obtuvieron en días diferentes tras la infección (es decir, 2 dpi o 3 dpi). Esto puede deberse a diferencias en las cinéticas de amplificación viral a una MOI inferior de 1x10⁻⁴ FFU/célula en comparación con una MOI de 1x10⁻³ FFU/célula, si se observa esta tendencia en biorreactores de producción, los tiempos de cosecha viral deben ajustarse en consecuencia.

Se realizó un estudio en biorreactor para confirmar los resultados del frasco de agitación. Para este estudio, se prepararon cinco cultivos celulares maestros paralelos en biorreactores de 3 l tal como se describió anteriormente. La densidad de células viables y los perfiles de metabolismo celular de glutamina, NH₄⁺, glucosa y lactato fueron comparables en todos los biorreactores (datos no mostrados). A ~4 días tras la siembra (dps), se intercambió el 66% del medio de crecimiento en los biorreactores por medio de infección DMEM/F12 + D-glucosa 4,5 + L-glutamina 4 mM + 10X TrypLE seleccionado a una dilución final de 1:330). Se infectaron los cinco cultivos con A/Isas Salomón/3/06 en diferentes cantidades de 2, 20, 200, 2000 ó 20000 FFU/ml (correspondientes a MOI de aproximadamente 1x10⁻⁶, 1x10⁻⁵, 1x10⁻⁴, 1x10⁻³ y 1x10⁻² FFU/célula, respectivamente) y se incubaron a 33°C. El resto de los parámetros de crecimiento tras la infección fueron los mismos que para el crecimiento de los cultivos celulares maestros antes de las infecciones. La figura 15 representa gráficamente el título viral a lo largo del tiempo (horas tras la infección) obtenido usando diferentes MOI. La zona en recuadros (extendida a la derecha) muestra que a los tres días tras la infección el cultivo infectado a 2000 FFU/ml tenía un título viral pico de 8,3 log₁₀FFU/ml mientras que el cultivo infectado a 20 FFU/ml tenía un título viral pico de 8,5 log₁₀FFU/ml (una mejora de 0,2 log₁₀FFU/ml). De manera similar, a los cuatro días tras la infección el cultivo infectado a 2 FFU/ml también alcanzó un título pico de 8,5 log₁₀FFU/ml. Juntos, estos estudios indican que la disminución de la MOI puede dar como resultado títulos virales aumentados y que un método de este tipo puede demostrar ser útil para aumentar el rendimiento de producción de determinadas cepas de vacuna. Estos estudios indican además que el tiempo de cosecha óptimo puede tener que determinarse basándose en la MOI usada.

Tabla 19. Optimización de MOI en frascos de agitación

Cepa de virus	Título de virus pico a MOI (en FFU/célula) de		Mejora en el título
	0,001-0,003*	0,0001**	
A/Wisconsin/67/05	8,7	9	0,3 Log ₁₀ FFU/ml
A/Isas Salomón/3/06	8,3	9,2	0,9 Log ₁₀ FFU /ml
A/California/07/2004	7,1	7,9	0,8 Log ₁₀ FFU /ml
A/Hong Kong/491 H5+ 486 N1/1997	7,9	9,2***	1,3 Log ₁₀ FFU /ml

Nota:

* MOI para proceso similar a SUB = 2000 FFU/ml

**MOI corresponde a 200 FFU/ml

*** Título viral pico observado a MOI de 1,0E-06 FFU/célula

Ejemplo 14: Transferencia perla a perla

El cultivo de células a gran escala requiere aumento a escala del número de células en el cultivo. Cuando se usan células adherentes, el proceso de aumento a escala generalmente implica disociación secuencial de células de frascos o microportadores, por ejemplo mediante tratamiento con proteasa, dilución de las células disociadas en un frasco mayor o en un mayor número de microportadores. Minimizar el número de etapas de lavado y/o cambio de medio durante el proceso de aumento a escala puede potenciar la eficacia y reducir la probabilidad de contaminación. El método de SUB descrito anteriormente requiere el uso de células cosechadas de 30 a 36 frascos

rotatorios separados, cada uno de las cuales debe someterse a tripsinización y cosecha por separado. A continuación se describe un método que puede utilizarse para reducir el número de etapas de manipulación usadas para aumentar a escala desde un recipiente de 3 l hasta un recipiente de 20 l. Pueden implementarse estrategias similares para el uso en un proceso de biorreactor mayor tal como el proceso de SUB de 30 l descrito anteriormente.

Preparación de biorreactor de 3 l: 1. Añadir 4 g de Cytodex3 a un biorreactor de 3 l. Añadir 500 ml de DPBS (PBS w/o Ca, Mg) para hidratar los microportadores durante 4 - 6 horas. 2. Usar el tubo de inmersión para retirar 300 ml de DPBS sin alterar los microportadores del fondo. Añadir 300 ml de DPBS recién preparado y someter a autoclave el recipiente durante 30 minutos a 121°C. 3. Una vez que se ha enfriado el reactor, retirar 300 ml de DPBS y añadir 300 ml de medio (M-32) al recipiente. Agitar el contenido del recipiente durante 10 minutos a 200 rpm hasta mezclar completamente el contenido del reactor y quitar todos los microportadores del fondo del recipiente. 4. Detener la agitación y retirar 300 ml de medio una vez que todos los microportadores han sedimentado. 5. Añadir 1,6 l de medio basal recién preparado al interior del reactor y permitir que los parámetros se estabilicen durante la noche. Los parámetros del proceso son: pH 7,2, temperatura 37°C, agitación 120 rpm, tasa de rociado de aire 50 ml/min.

Preparación de biorreactor de 20 l: Añadir 28 g de Cytodex3 a una botella de 5 l. Añadir 3 l de DPBS (w/o Ca, Mg) para hidratar los microportadores durante 4 - 6 horas. Retirar 2 l de DPBS sin alterar los microportadores del fondo. Añadir 2 l de DPBS recién preparado y someter a autoclave el recipiente durante 30 minutos a 121°C. 2. Retirar 2 l de DPBS y añadir 2 l de medio a la botella. Agitar la botella vigorosamente para garantizar que los microportadores estén en suspensión. Permitir que los microportadores sedimenten antes de retirar 2 l de medio. Añadir medio recién preparado a los microportadores para llevar la disolución de microportador a un volumen total de 3 l. 3. Añadir medio recién preparado y disolución de microportador disolución para garantizar que el volumen total en el biorreactor es de 14 l y permitir que los parámetros se estabilicen durante la noche. Los parámetros del proceso son: pH 7,2, temperatura 37°C, agitación 120 rpm, tasa de rociado de aire 400 ml/min.

Operación de fase de crecimiento de biorreactor de 3 l: Calibrar el pH y las lecturas de oxígeno disuelto tras la toma de muestras y el análisis a través de NOVA Bioprofile. 2. Añadir el cultivo cosechado de fábricas de células para inocular el biorreactor a una densidad celular objetivo de 9E4 células/ml (15 células por perla microportadora). Añadir medio para alcanzar un volumen de trabajo total de 2 l. 3. Iniciar el control de la D.O. con un punto de ajuste del 50%. 4. Tomar muestras cada día para el análisis con NOVA, Nucleocounter y para obtención de imágenes en microscopio.

Protocolo de transferencia perla a perla a escala: Tas 96 horas de crecimiento celular en el recipiente de 3 l, apagar el agitador, el flujo de gas y los controles de OD y temperatura. Permitir que los microportadores sedimenten. 2. Retirar medio (> 80%) a través del tubo de inmersión pero garantizar que los microportadores no se alteran del fondo del recipiente. 3. Añadir DPBS (PBS w/o Ca, Mg) para aumentar el volumen hasta el volumen de trabajo original. 4. Aumentar en punto de ajuste de agitación hasta 180 rpm. Encender el agitador durante un periodo de 10 minutos para lavar los microportadores de cualquier medio restante. 5. Apagar el agitador y permitir que los microportadores sedimenten al fondo. 6. Retirar ~50% del líquido en el biorreactor a través del tubo de inmersión. Asegurarse de que la sonda de temperatura y el agitador están todavía completamente sumergidos tras la retirada. (El volumen restante es de aproximadamente 1 l). 7. Encender el agitador y el control de temperatura. Esperar hasta que la temperatura en el reactor sea de 37°C. 8. Añadir 5X TrypLE (5-7% del volumen restante) al biorreactor. 9. Añadir carbonato de sodio 1 M para ajustar el pH del contenido del reactor hasta 7,9 +/- 0,1. 10. Permitir la tripsinización durante 50 +/- 10 minutos con toma de muestras intermitente y observación al microscopio para asegurarse de que las células se han desprendido. 11. Añadir 5X de inhibidor de tripsina de fríjol (LBTI) exactamente en el mismo volumen que TrypLE. 12. Añadir medio recién preparado para llevar el volumen hasta el volumen de trabajo original (2 l). 13. Transferir todo el contenido del reactor al biorreactor de 20 l (división 1:8).

Parámetros de infección: En las condiciones de transferencia perla a perla utilizadas aquí, las células mostraron un crecimiento ligeramente más lento tras la transferencia perla a perla que conduce a infección, retrasándose en un día (infección en ~día 5) en comparación con la transferencia a partir de frascos rotatorios (infección en ~día 4). La infección se realizó cuando se alcanzó la densidad celular ~1x10 células/ml esencialmente tal como se describe para el proceso de SUB (véase la sección 8.12 anterior). Aunque la infección se retrasó en un día, los títulos virales pico usando transferencia perla a perla fueron comparables a los obtenidos usando condiciones de transferencia similares a las descritas en la sección 8.12 anterior (véase la tabla 20). Por consiguiente, el uso de métodos de transferencia perla a perla puede reducir el número de manipulaciones sin sacrificar el rendimiento viral.

Tabla 20. Título de virus pico

Cepa de virus	Transferencia perla a perla	Transferencia a partir de frascos rotatorios
B/Malasia/2506/04	8,8	8,5
A/Wisconsin/67/05	8,5	8,5
A/Islas Salomón/3/06	8,1	8,2

REIVINDICACIONES

1. Célula de riñón canino Madin-Darby (MDCK) identificada mediante el n.º de registro de la ATCC PTA-7909 o el n.º de registro de la ATCC PTA-7910, en la que una composición de cultivo celular que comprende una pluralidad de las células MDCK soporta la replicación de un virus influenza adaptado al frío hasta un logaritmo en base 10 de la mediana de la dosis de infección en cultivo tisular por mililitro ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml) de 7,8 o mayor o hasta un logaritmo en base 10 de unidades de focos fluorescentes por mililitro ($\log_{10}$ FFU/ml) de 7,8 o mayor.
2. Célula MDCK según la reivindicación 1, en la que las células MDCK son adherentes, no tumorigénicas y/o no oncogénicas.
3. Célula MDCK según la reivindicación 1 ó 2, en la que el virus influenza está atenuado y es sensible a la temperatura.
4. Célula MDCK según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el virus influenza comprende uno o más segmentos génicos de la cepa de influenza A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66.
5. Célula MDCK según la reivindicación 1, 2, 3 ó 4, en la que la composición comprende un medio de cultivo celular libre de suero seleccionado del grupo que consiste en:
 - a) MediV-105, en el que MediV-105 es medio de Taub sin transferrina (es decir, una mezcla 50:50 de DMEM y F12 de Ham complementado con hormonas, insulina 5 µg/ml, prostaglandina E1 25 ng/ml, hidrocortisona 50 nM, triyodotironina 5 pM y Na₂SeO₃ 10 nM, glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 2,2 g/l y L-glutamina 4 mM), y se complementa adicionalmente con concentrado lipídico de concentración final 1X, peptona de trigo E1 2,5 g/l, EGF 5 µg/l, citrato de amonio férrico 0,2 mg/l y tropolona 0,25 mg/l;
 - b) MediV-105 complementado con glucosa;
 - c) MediV-107 (que tiene una formulación final tal como se muestra en la tabla 10);
 - d) MediV-107 complementado con glucosa;
 - e) M-32 (es decir, MediV-105 que tiene una concentración de glucosa de entre 4 g/l y 4,5 g/l y que está complementado adicionalmente con oligoelementos A, B y C tal como se muestra en la tabla 9 a una concentración final de 1X); y
 - f) M-32 complementado con glucosa.
6. Método para producir un virus influenza adaptado al frío en cultivo celular, que comprende:
 - (a) cultivar las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un biorreactor de uso único (SUB) en presencia de microportadores en condiciones de cultivo que incluyen una velocidad de agitación de entre 50 y 150 rpm, produciendo de ese modo células cultivadas;
 - (b) infectar las células cultivadas con un virus influenza adaptado al frío, produciendo de ese modo células infectadas;
 - (c) incubar las células infectadas en condiciones que permiten la replicación del virus influenza; y
 - (d) aislar el virus influenza de las células cultivadas.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la velocidad de agitación es de 80 rpm a 120 rpm.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la velocidad de agitación es de 90 rpm a 100 rpm.
9. Método según la reivindicación 6, 7 u 8, en el que
 - (i) se añaden medio nuevo o componentes adicionales del medio al cultivo celular durante la etapa (a) y/o la etapa (b); o
 - (ii) se intercambia una porción del medio antes de la etapa (a).
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que se añade una proteasa antes de o durante la etapa (b).
11. Método según la reivindicación 6, 7 u 8, en el que no se elimina ni se sustituye o se elimina y se sustituye algo

del medio de cultivo celular por medio nuevo antes de o durante la etapa (b).

5 12. Método según la reivindicación 6, 7 u 8, en el que se añade una proteasa poco antes, simultáneamente con o poco después de la etapa (b), en el que la proteasa provoca la escisión de la proteína precursora de hemaglutinina [HA0] y por tanto la adsorción de los virus sobre las células.

13. Método según la reivindicación 10 ó 12, en el que la proteasa es una serina proteasa.

10 14. Método según la reivindicación 13, en el que la proteasa es tripsina.

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que la etapa (b) se lleva a cabo a una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,00001 FFU/célula y 1 FFU/célula.

15 16. Método según la reivindicación 15, en el que la etapa (b) se lleva a cabo a una MOI de entre 0,001 FFU/célula y 0,003 FFU/célula.

17. Método según la reivindicación 15, en el que la etapa (b) se lleva a cabo a una MOI de entre 0,00001 FFU/célula y 0,0003 FFU/célula.

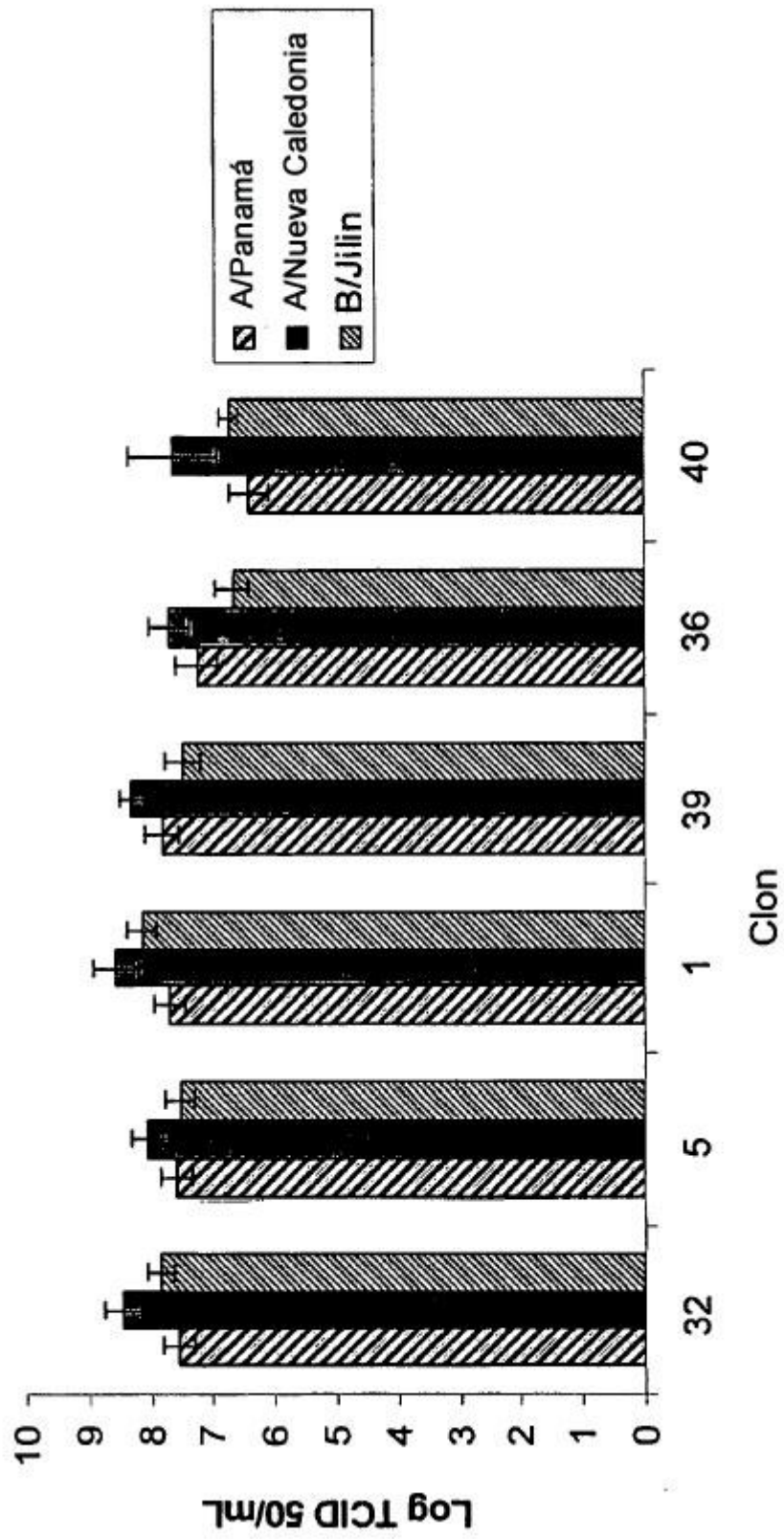


FIG. 1

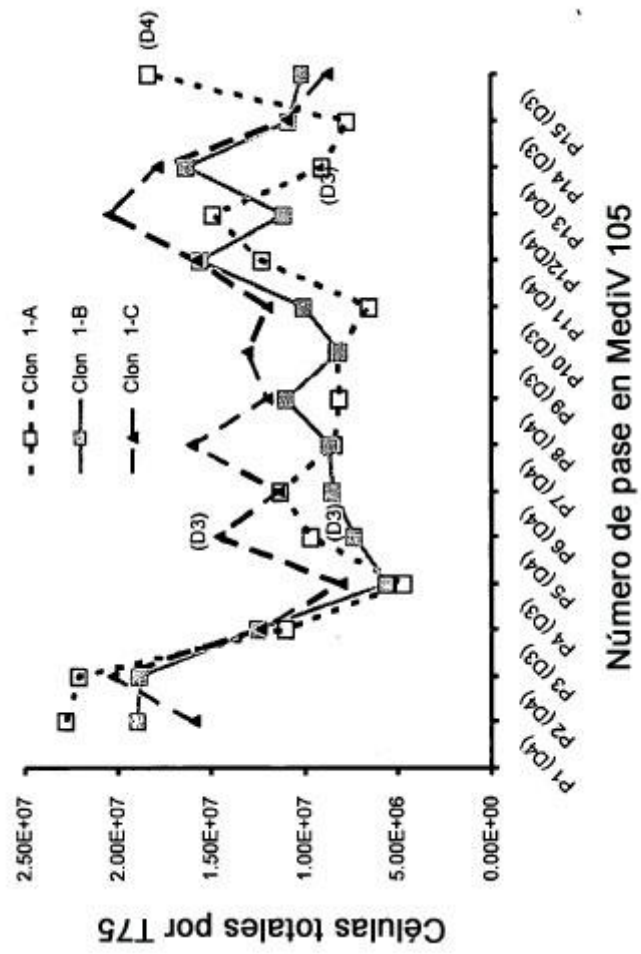


FIG. 2

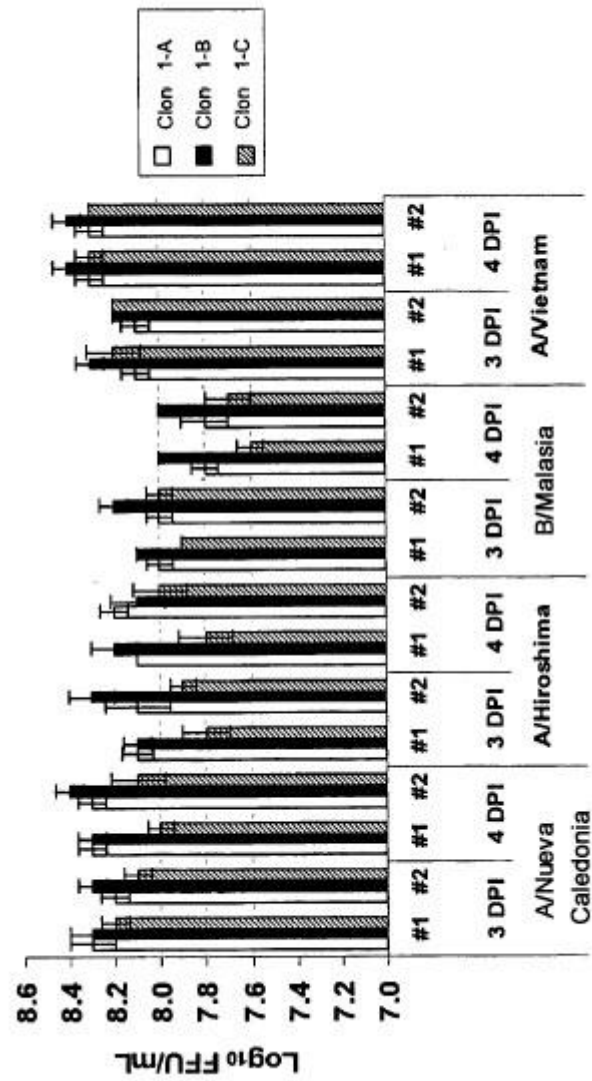
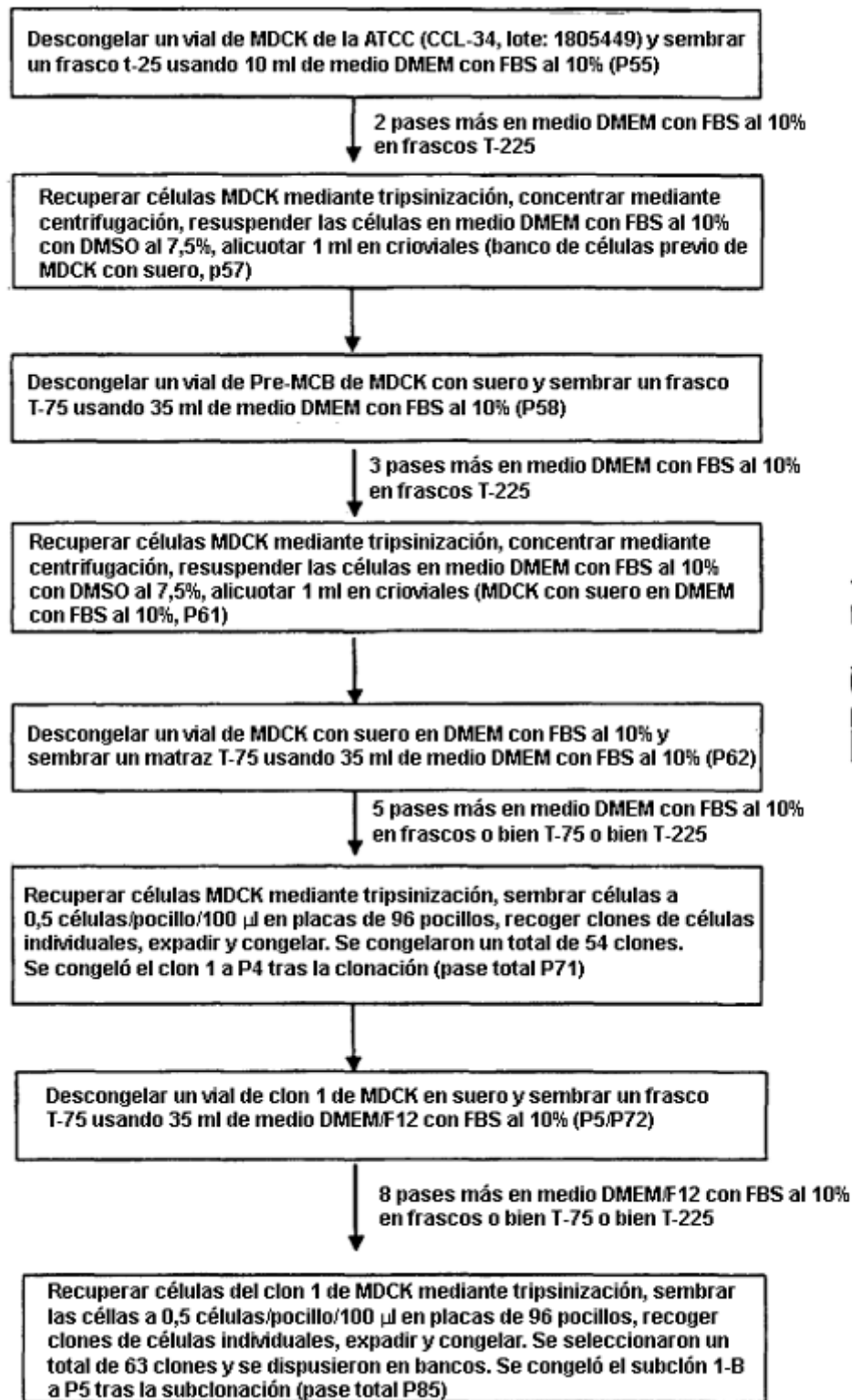


FIG. 3

Subelón	Medios	A/Nueva Caledonia (log10 FFU/mL)						A/Hiroshima (log10 FFU/mL)						B/Malasia (log10 FFU/mL)						A/Vietnam (log10 FFU/mL)					
		3 DPI			4 DPI			3 DPI			4 DPI			3 DPI			4 DPI			3 DPI			4 DPI		
		Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	Frasco n.º 2	Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	Frasco n.º 2	Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	Frasco n.º 2	Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	Frasco n.º 2	Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	Frasco n.º 2	Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	Frasco n.º 2	Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	Frasco n.º 2	Frasco n.º 1	Frasco n.º 2	
1-A	Opti-Pro	8.2+ 0.06	8.2+ 0.06	8.4+ 0.06	8.4+ 0.06	8.2+ 0.15	8.1+ 0.12	8.2+ 0.06	8.2+ 0.06	8.1+ 0.12	8.3+ 0.10	8.3+ 0.12	8.2+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	
1-B		8.3+ 0.06	8.4+ 0.06	8.4+ 0.06	8.4+ 0.10	8.3+ 0.10	8.3+ 0.12	8.3+ 0.10	8.2+ 0.12	8.3+ 0.12	8.2+ 0.12	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06		
1-D		8.3+ 0.00	8.3+ 0.06	8.3+ 0.10	8.3+ 0.06	8.4+ 0.06	8.2+ 0.21	8.4+ 0.06	8.1+ 0.06	8.2+ 0.06	8.1+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06		
1-C		8.4+ 0.06	8.5+ 0.06	8.4+ 0.00	8.4+ 0.10	8.2+ 0.06	8.2+ 0.06	8.2+ 0.06	8.2+ 0.06	8.2+ 0.06	8.1+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	
1-A	MediV- 105	8.3+ 0.10	8.2+ 0.06	8.3+ 0.06	8.3+ 0.06	8.1+ 0.07	8.1+ 0.14	8.1+ 0.07	8.1+ 0.14	8.1+ 0.14	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06	8.0+ 0.06		
1-B		8.3+ 0.10	8.3+ 0.06	8.4+ 0.06	8.4+ 0.06	8.1+ 0.06	8.3+ 0.10	8.1+ 0.06	8.2+ 0.10	8.3+ 0.10	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06	8.1+ 0.06		
1-C		8.2+ 0.06	8.1+ 0.00	8.0+ 0.06	8.1+ 0.12	7.8+ 0.10	7.9+ 0.06	7.8+ 0.10	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	7.8+ 0.12	
Control de ensayo		9.1+ 0.06	9.1+ 0.06	9.2+ 0.06	9.1+ 0.10	8.3+ 0.06	8.3+ 0.00	8.3+ 0.06	8.2+ 0.06	8.3+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06	7.9+ 0.06		

FIG. 4



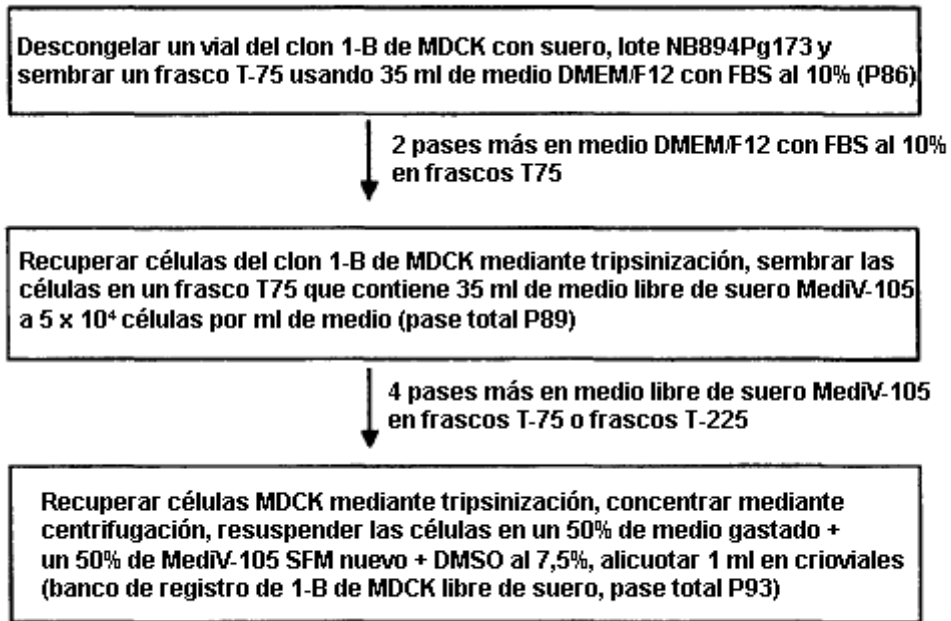


FIG. 5B

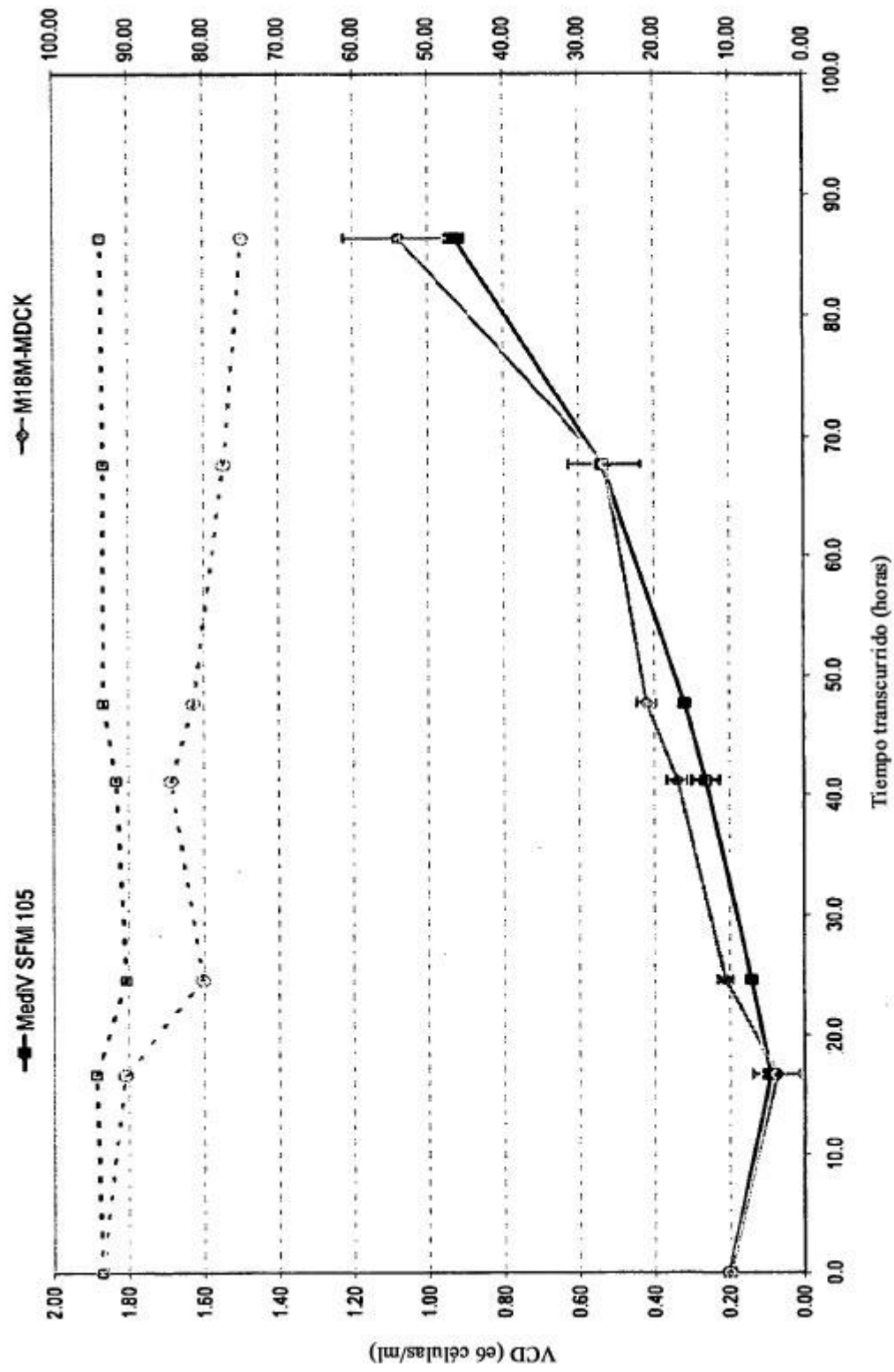


FIG. 6

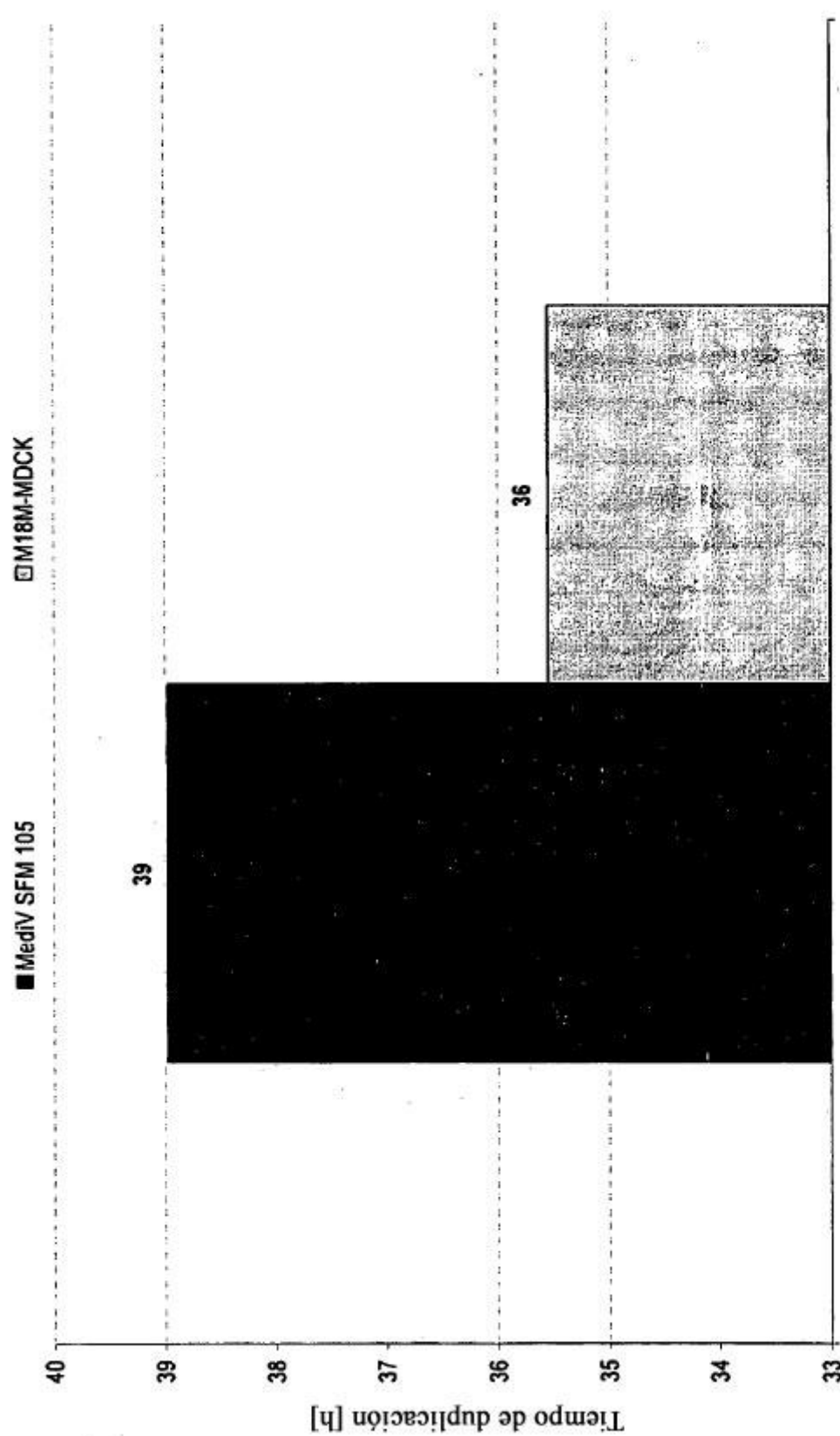


FIG. 7

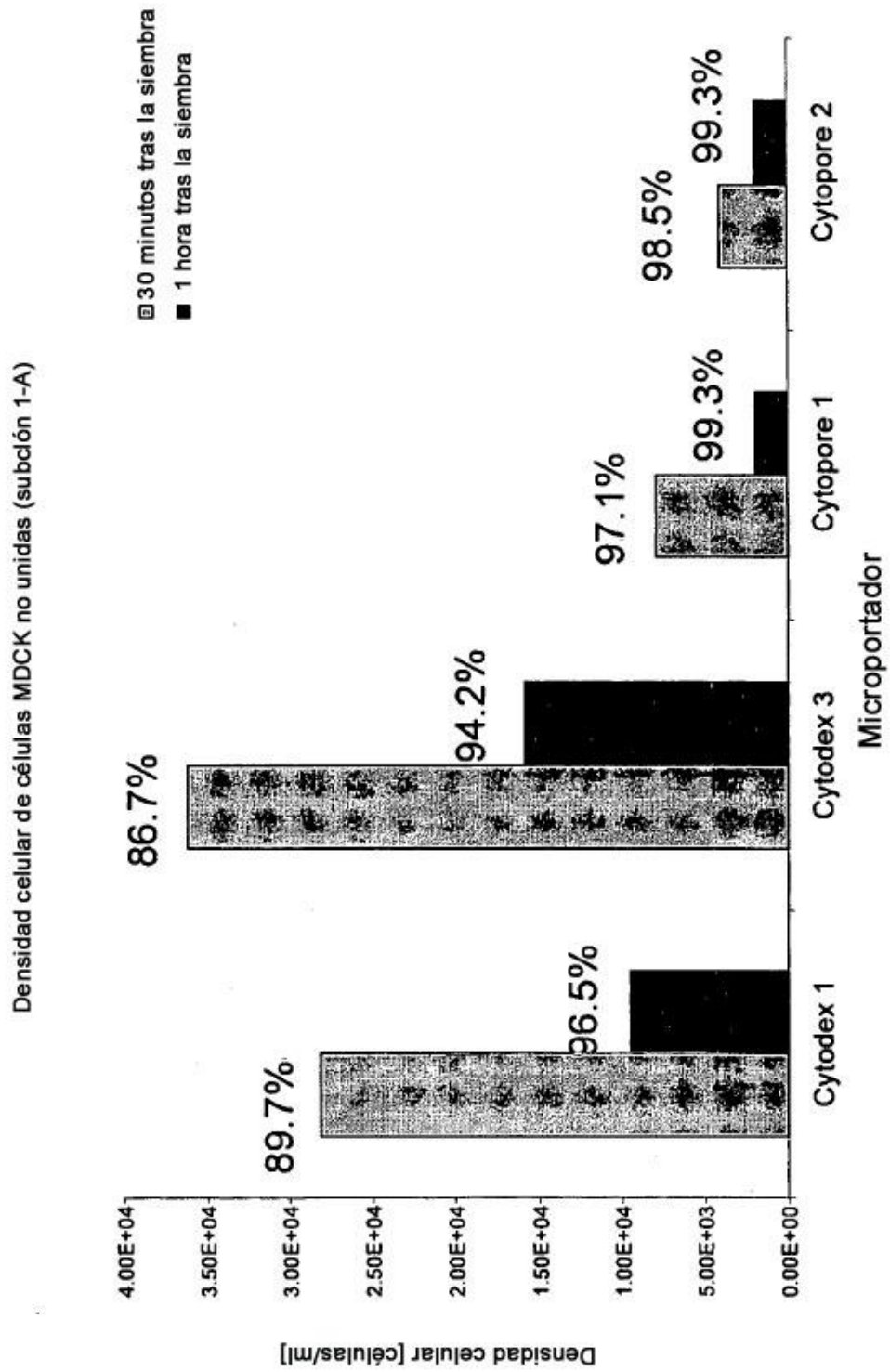


FIG. 8

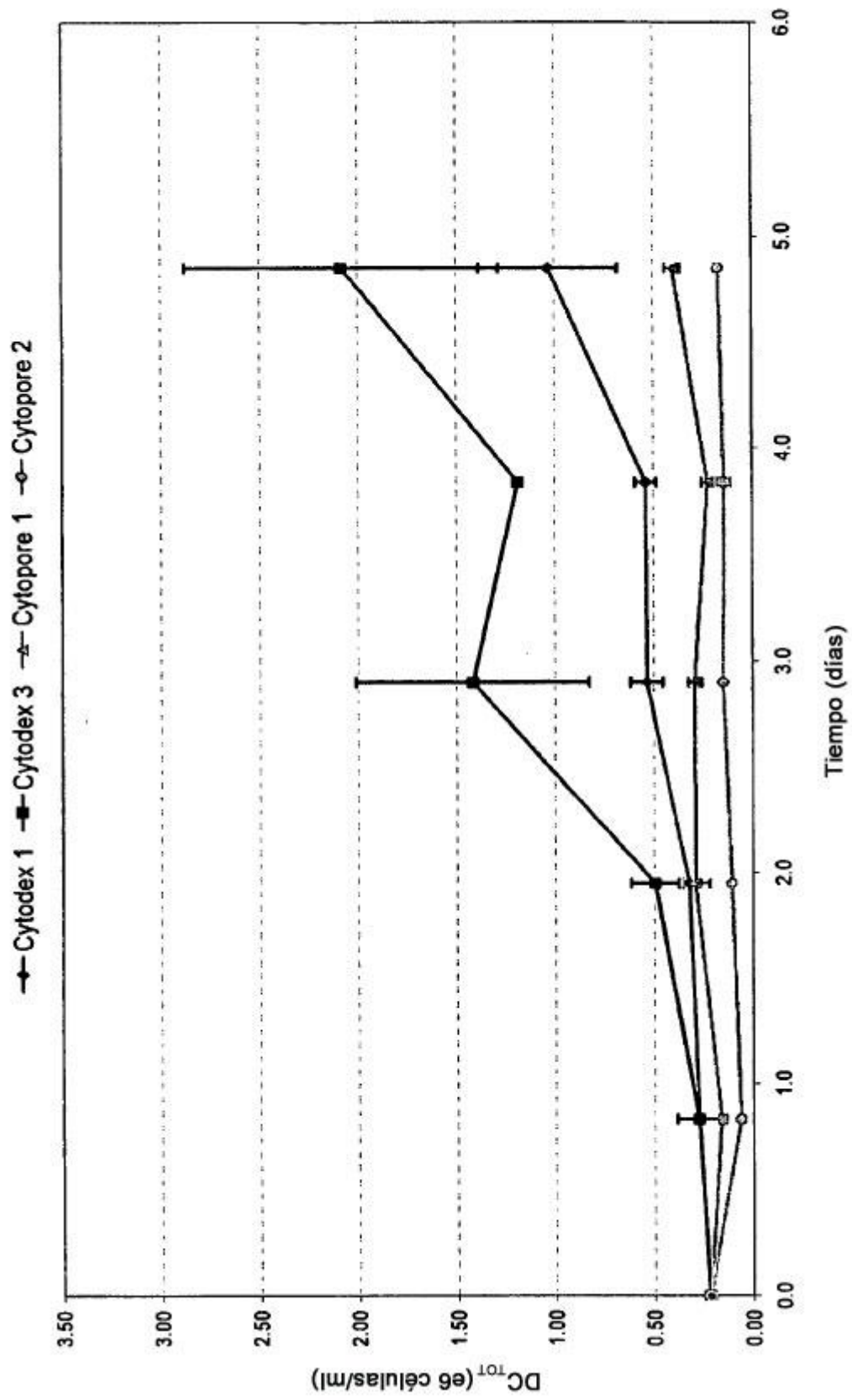


FIG. 9

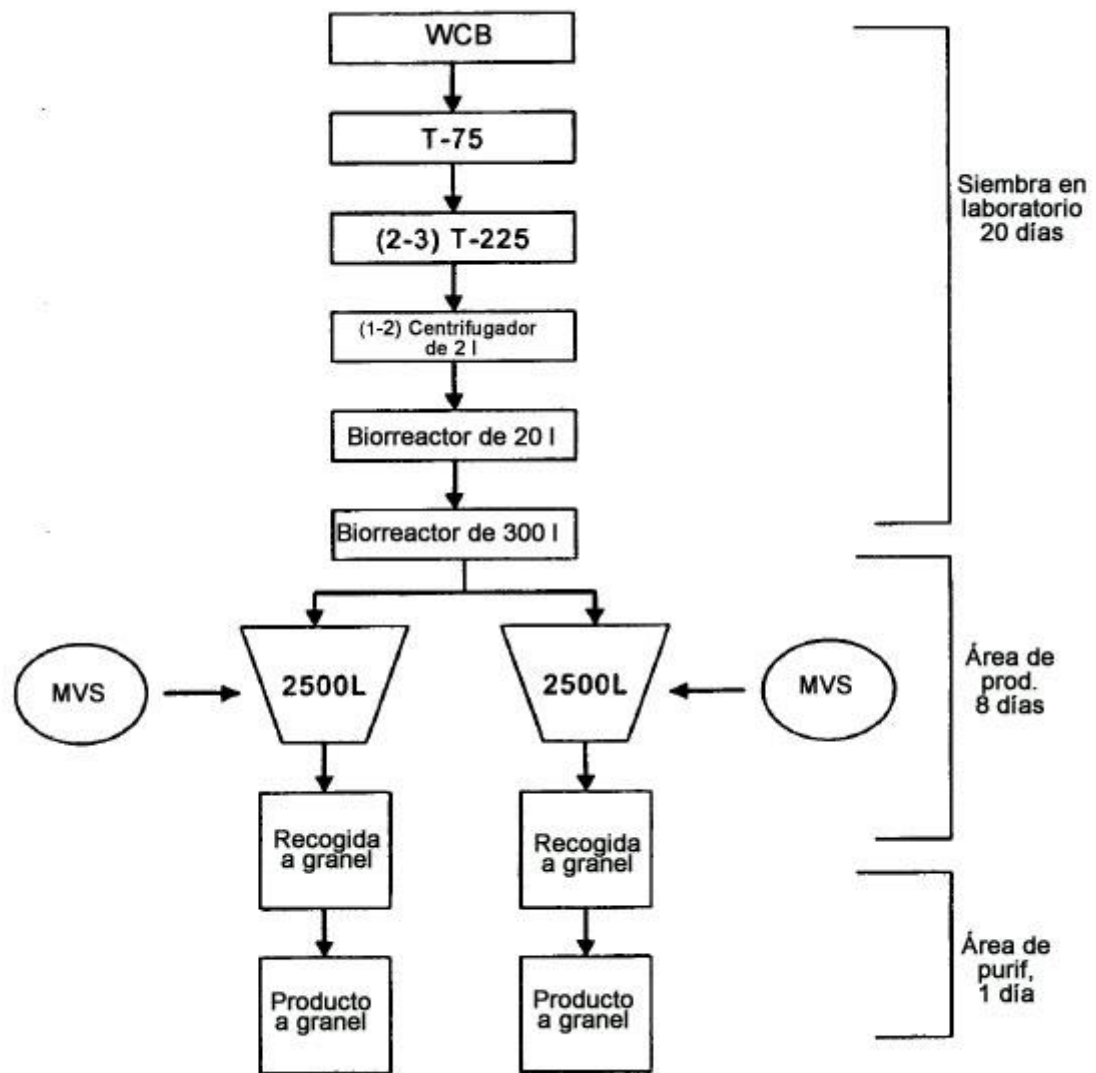


FIG. 10

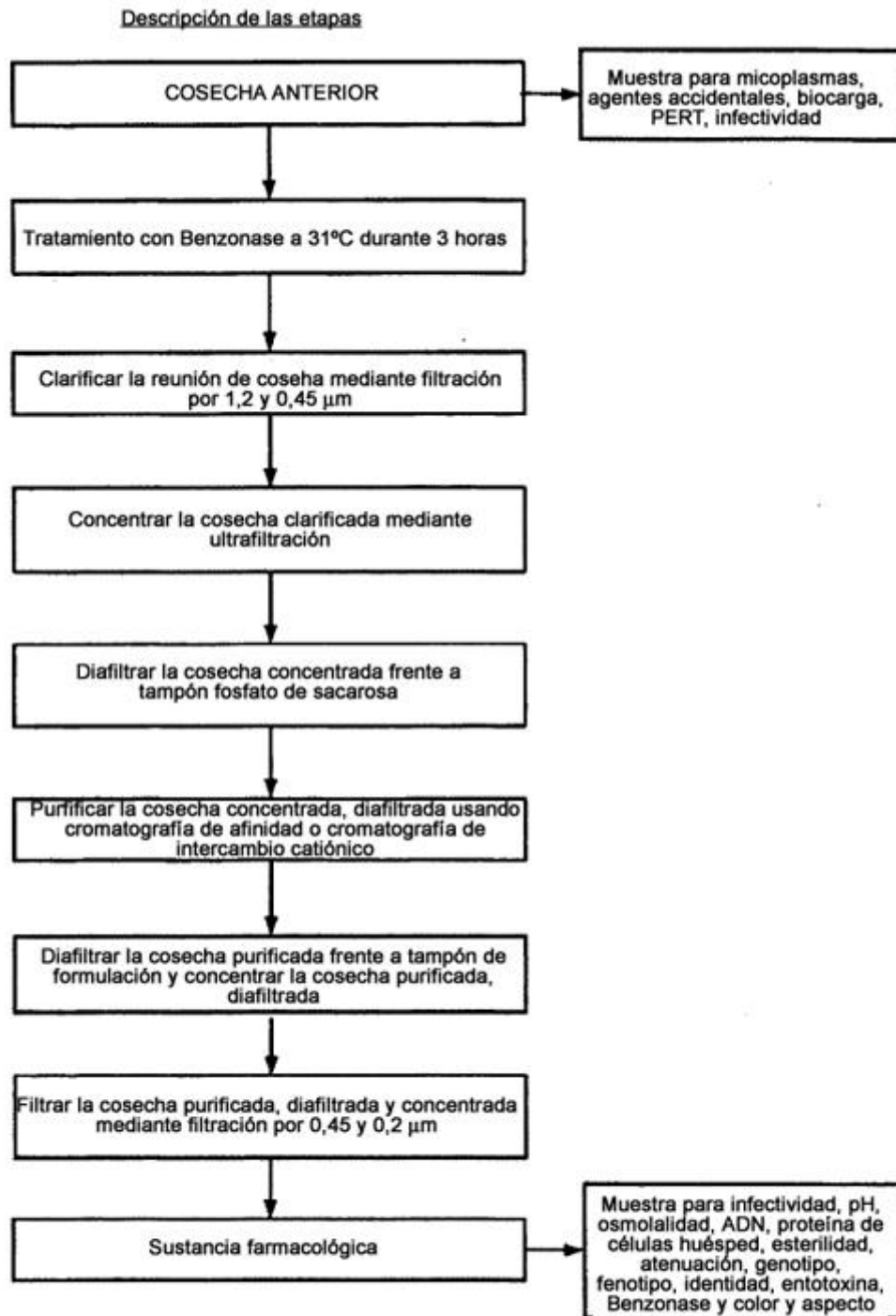


FIG. 11A

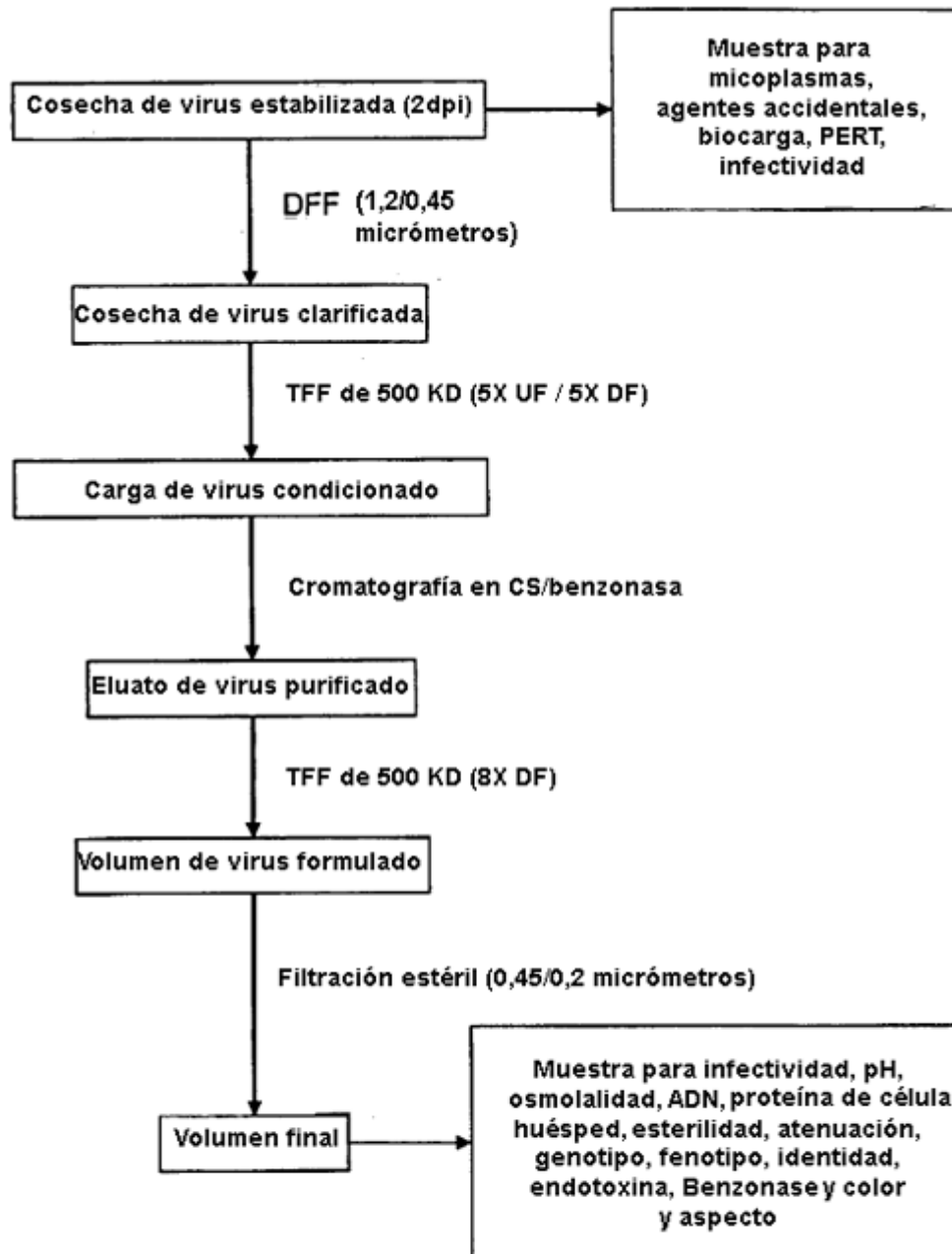


FIG. 11B

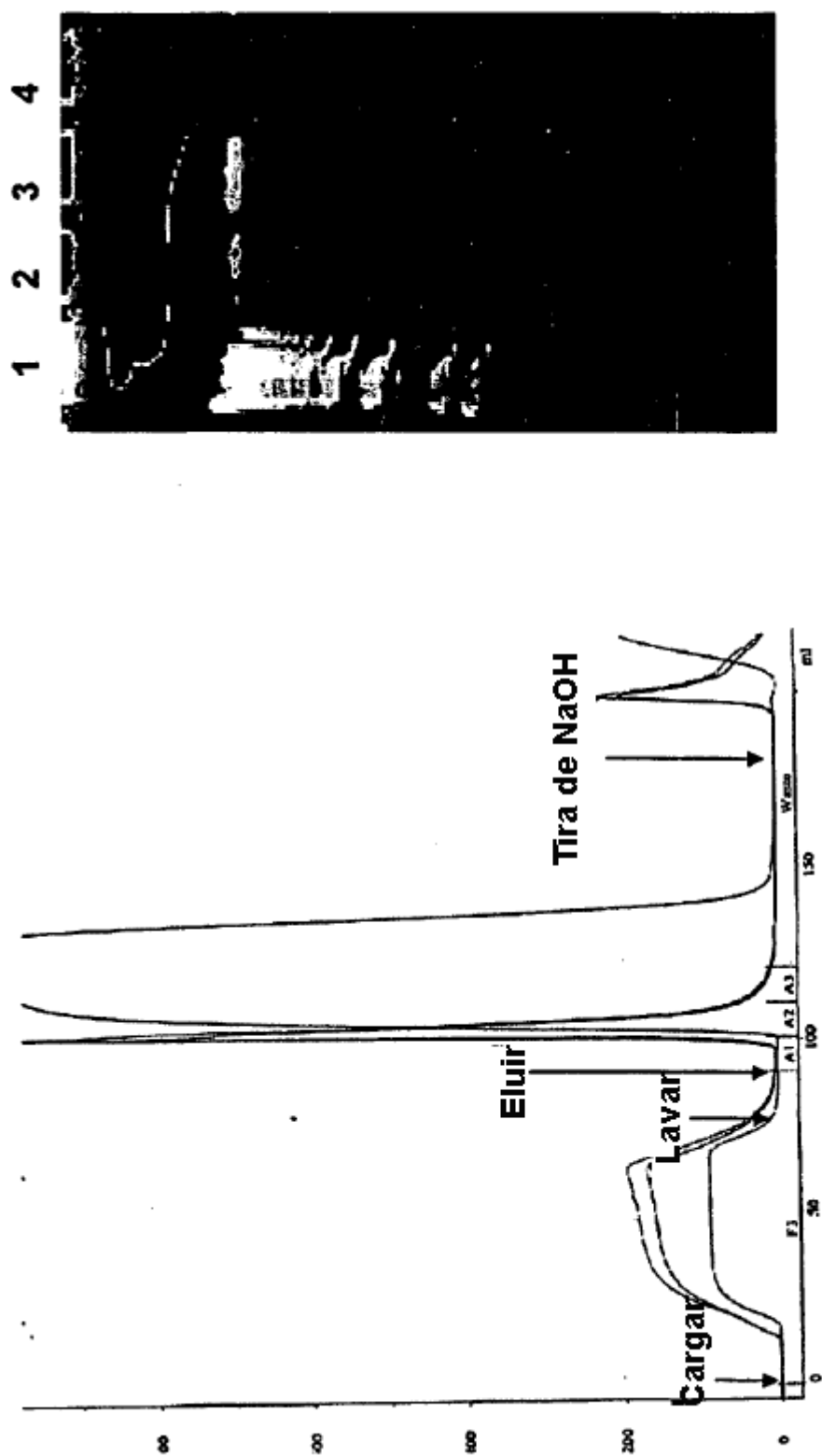


FIG. 12A

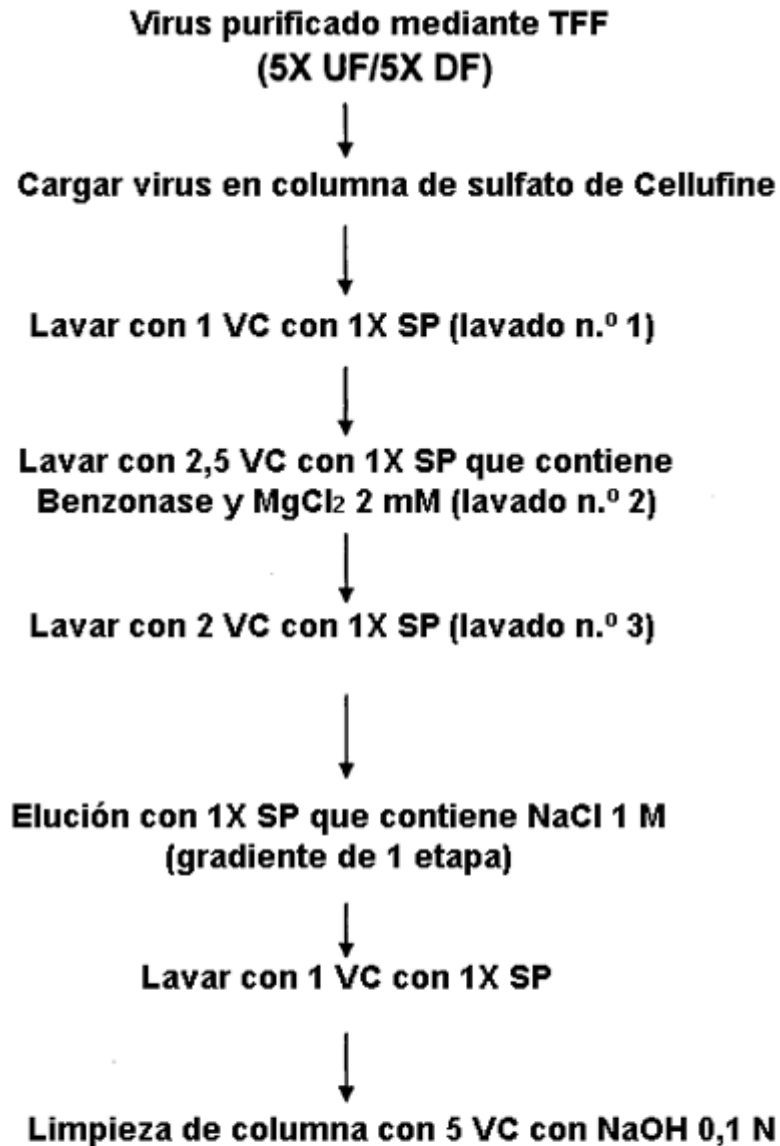


FIG. 12B

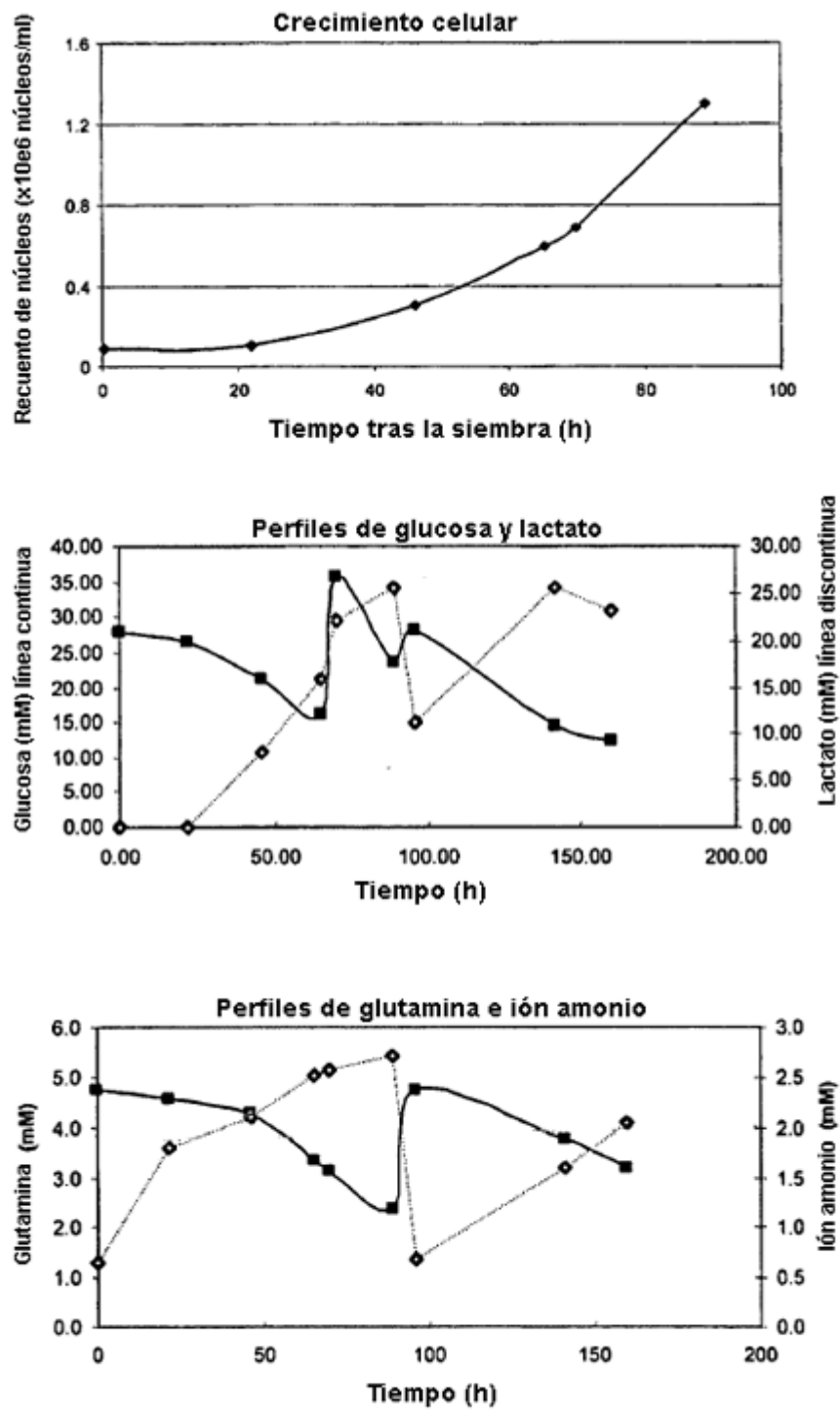
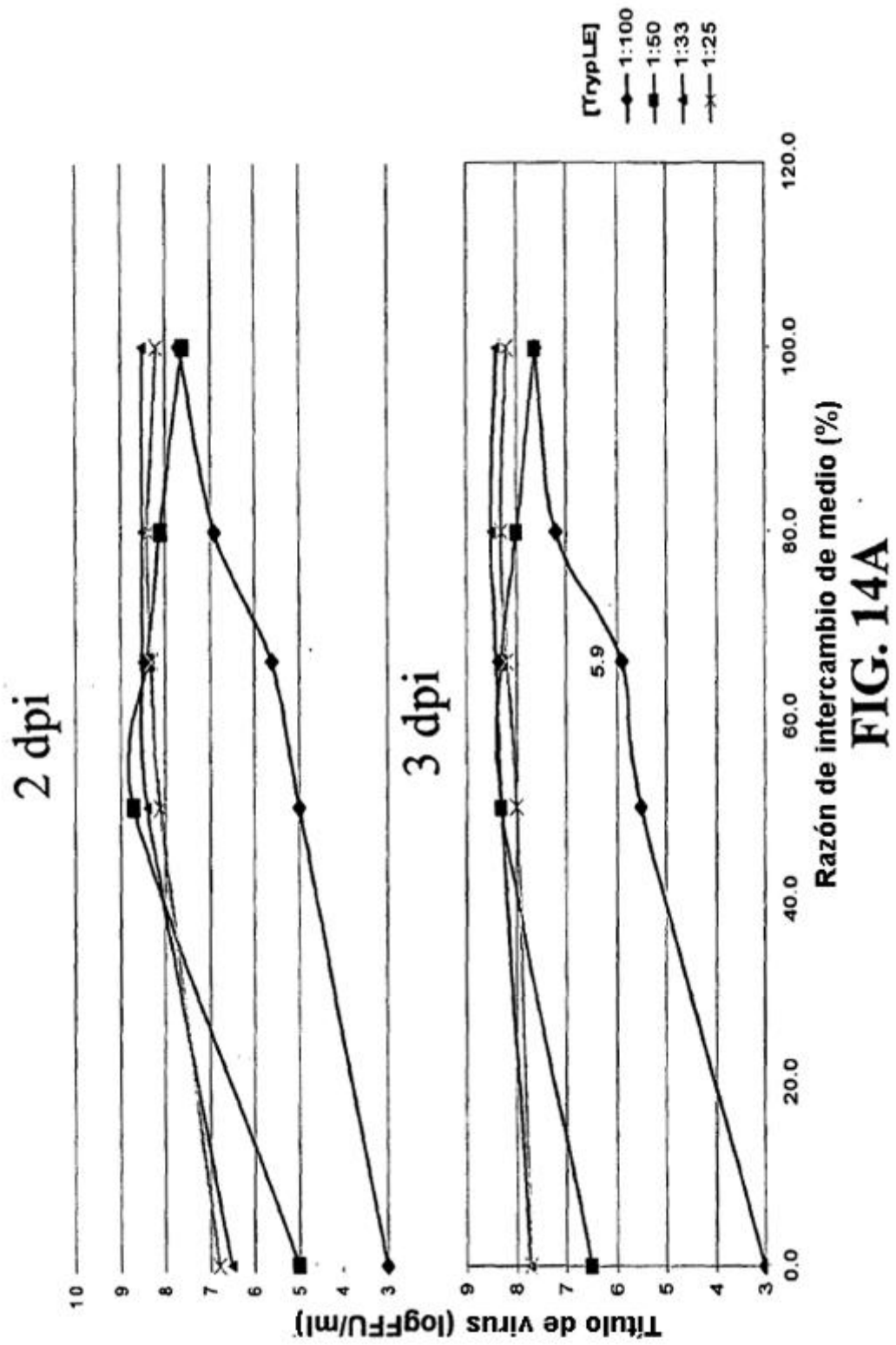


FIG. 13



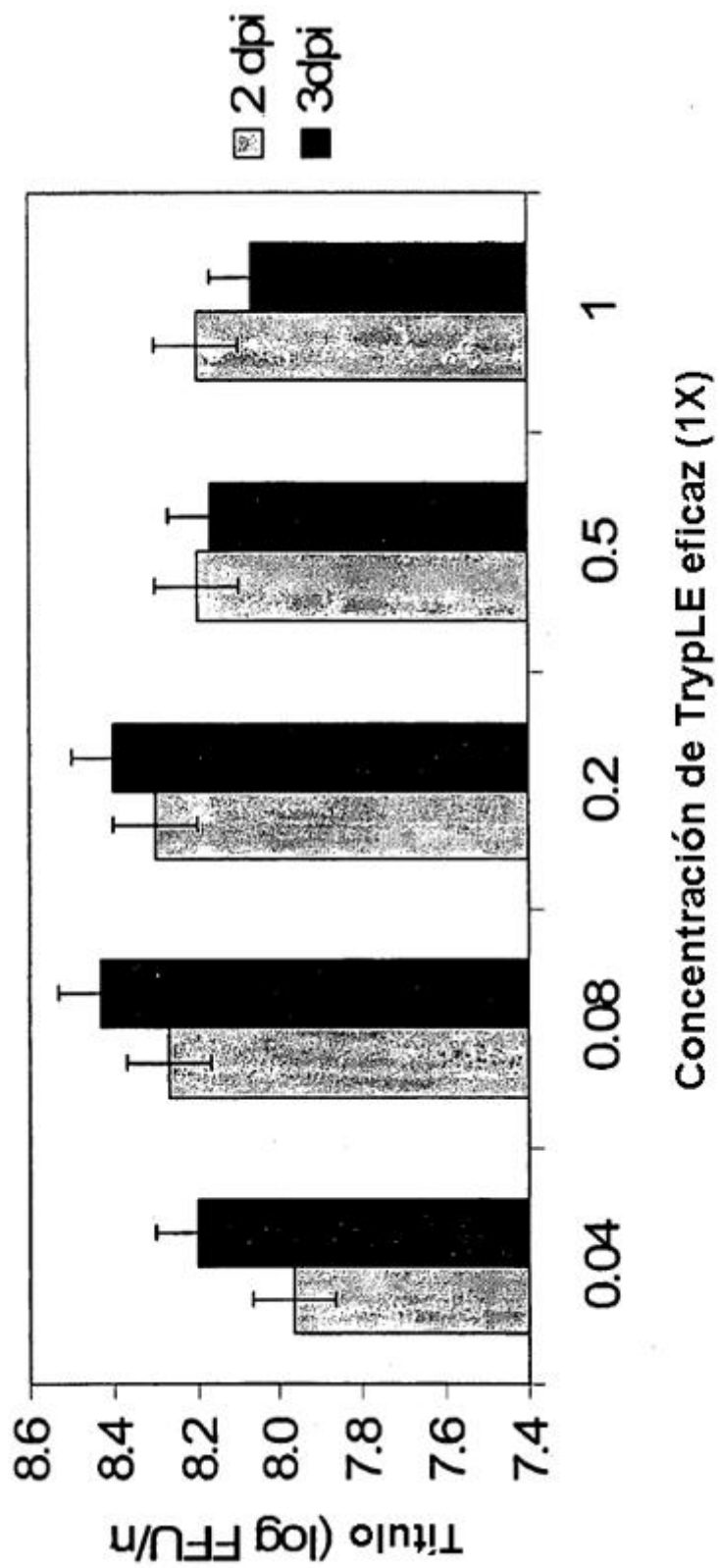


FIG. 14B

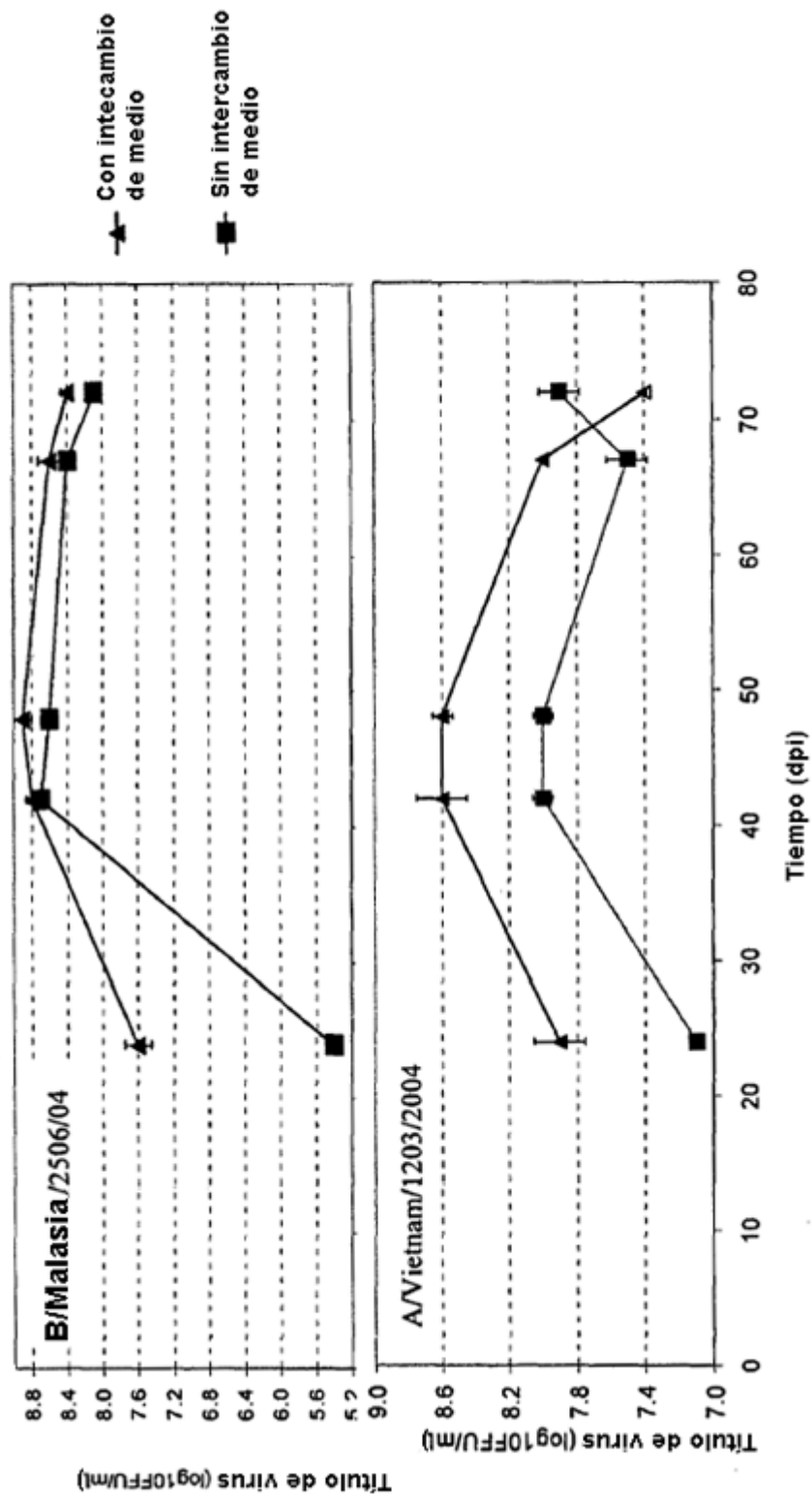


FIG. 14C

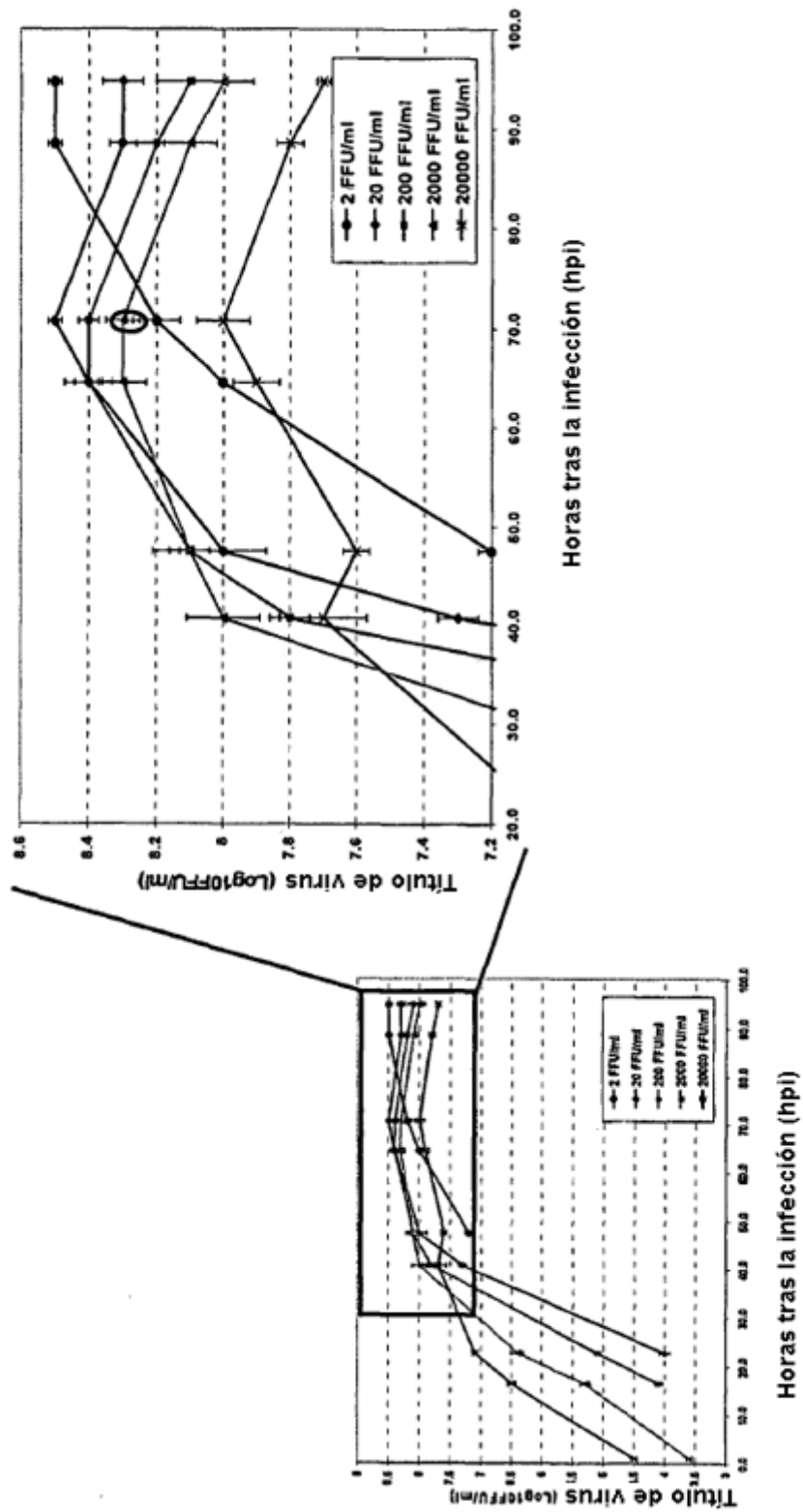


FIG. 15