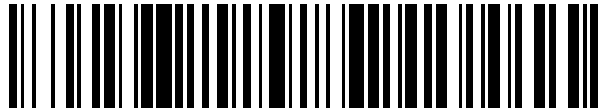


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 093**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 39/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2010 E 10729895 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2454364**

54 Título: **Producción de poliovirus con títulos elevados para producción de vacunas**

30 Prioridad:

16.07.2009 EP 09165620

16.07.2009 US 271038 P

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

11.08.2014

73 Titular/es:

CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)

**Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

LEWIS, JOHN ALFRED

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 484 093 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

Producción de poliovirus con títulos elevados para producción de vacunas

- 5 La invención se refiere al campo del cultivo celular y producción de poliovirus. Más en particular, se refiere a métodos mejorados para el cultivo de células y producción de poliovirus a partir del mismo para la producción de vacunas de la poliomielititis.

Antecedentes de la invención

- 10 Los poliovirus son miembros del género *Enterovirus* de la familia *Picornaviridae*. Los poliovirus son virus pequeños, sin envoltura y con cápsides que encierran un genoma ARN monocatenario de sentido positivo. Hay tres tipos de poliovirus: los tipos 1, 2 y 3. Las infecciones por poliovirus de individuos susceptibles pueden causar poliomielititis parálítica. La poliomielititis es muy contagiosa. Se han desarrollado dos vacunas contra la polio diferentes, la vacuna contra la polio inactivada (IPV) de Salk y la vacuna contra la polio oral viva atenuada (OPV) de Sabin. Ambas vacunas son seguras y efectivas. Cada una tiene sus ventajas y desventajas en particular, y ambas han tenido un papel importante en el control de la poliomielititis. Para una revisión sobre los poliovirus y las vacunas contra la polio, véase Kew y col., 2005.

- 20 La vacuna contra la polio oral (OPV) es barata y cómoda y se ha usado de forma masiva. Sin embargo, receptores ocasionales sufren poliomielititis parálítica asociada a la vacuna (PPAV) debido a revertientes en la vacuna. Asimismo, se ha observado en poblaciones que no han sido completamente inmunizadas que las cepas de poliovirus atenuados de Sabin han sufrido suficientes cambios mutacionales como para causar brotes de enfermedad parálítica que son clínica y epidemiológicamente indistinguibles de la poliomielititis producida por virus de tipo salvaje; estos mutantes se denominan poliovirus circulantes derivados de vacunas o PVDVc (véase Kew y col., 2005; Wright y Modlin, 2008; Yakovenko y col., 2009).

- 25 Existe cada vez más consenso acerca de que la vacuna contra la polio inactivada (IPV) puede contribuir a la erradicación más rápida del poliovirus de tipo salvaje y al control de los PVDVc que aparecen cuando se usan junto con las estrategias de OPV existentes (Wright y Modlin, 2008; John, 2009).

- 30 No obstante, la producción de IPV es más cara (véase p. ej., John, 2009) y puede incluso ser prohibitivamente cara para los países menos desarrollados, en los que aún existe una fuerte necesidad de vacunas contra la polio. Los sistemas de cultivo para la producción de material de partida de poliovirus que se pueda usar en una vacuna, en particular poliovirus no atenuados, contribuyen en gran medida a los costes relativamente elevados.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de sistemas de cultivo eficientes para la producción de poliovirus para uso en vacunas.

- 40 La propagación del poliovirus en células HEK293 se ha descrito como un sistema para el estudio de fenotipos de poliovirus de replicación específica en neuronas, y se describió que las formas atenuadas de poliovirus, tales como aquellas que contienen mutaciones puntuales en un elemento IRES como presentan las cepas de Sabin, mostraban una reducida propagación en células HEK293 (Campbell y col, 2005).

- 45 Las células de retina embrionaria humana (HER) inmortalizadas E1, en particular las células PER.C6, se han descrito como idóneas para la propagación de diversos virus, con énfasis en el virus de la gripe (Pau y col., 2001; documento WO 01/38362). Aunque en el documento WO 01/38362 se describen ejemplos experimentales de propagación de diversas cepas del virus de la gripe y del virus del herpes simple (VHS) de tipos 1 y 2, virus del sarampión y rotavirus en células PER.C6, la propagación de poliovirus no se muestra en dicho documento
50 WO 01/38362. Además, las condiciones para la replicación del poliovirus en dichas células no se han descrito y no se pueden predecir fácilmente en función de la replicación de virus no relacionados en estas células. Por tanto, se desconoce hasta ahora si sería viable producir económicamente poliovirus a escala industrial para los fines de producción de vacunas en estas células.

- 55 Para la fabricación a gran escala de vacunas contra la polio inactivadas, los poliovirus se propagan en general en células Vero que se obtienen de mono. Las células Vero son muy utilizadas para la producción de vacunas, tanto vacunas contra la polio inactivadas como vivas atenuadas, y hasta el momento son las líneas celulares continuas más ampliamente aceptadas por la autoridades sanitarias para la fabricación de vacunas virales, y se espera que aumente el uso de estas células para la producción de vacunas por los expertos en el campo (Barrett y col., 2009).

- 60 Montagnon y col. (1982 y 1984) describen cultivos microtransportadores a gran escala de células Vero para vacunas contra la polio inactivadas. En la patente de EE. UU. n.º 4.525.349 también se describe un proceso para la producción a gran escala de una vacuna contra la polio usando células Vero.

- 65 Merten y col., (1997) describieron la producción de títulos altos de poliovirus (Sabin tipo 1) (casi 2×10^9 TCID₅₀/ml) para condiciones en las que se cultivaron células Vero en microtransportadores en medio con suero antes de la fase

de producción de virus en medio sin suero, pero en vista de las desventajas de usar suero, estos autores indicaron ya que era deseable un proceso completamente sin suero y en tal proceso completamente sin suero optimizado dichos autores fueron capaces de obtener un título de $6,3 \times 10^8$ TCID₅₀/ml.

5 Kreeftenberg y col. (2006), dedicados a la producción de poliovirus para la producción de vacunas a escala industrial, también mencionan rendimientos de varias cepas de tipo salvaje y de Sabin de poliovirus en células Vero
 10 crecidas en microtransportadores, cuyos rendimientos son similares para las diferentes cepas, estando los títulos logarítmicos entre 8,1 y 8,6. Estos autores también describen que la cantidad de virus necesaria para producir la vacuna final es significativamente superior para IPV que para OPV, lo cual tiene como resultado un coste de producción por dosis significativamente mayor para IPV que para OPV.

La producción sin suero de poliovirus usando células Vero cultivadas en microtransportadores también ha sido descrita por Card y col. (2005) y, aunque el nivel de productividad era menor que en cultivos estáticos, los cultivos de
 15 microtransportadores se describieron como más fáciles de aplicar a mayor escala.

A pesar de la eficacia y la aplicabilidad industrial de estos cultivos de células Vero basados en microtransportadores, la producción de grandes cantidades de poliovirus sigue siendo costosa y, por tanto, sigue existiendo la necesidad de sistemas de producción alternativos para poliovirus que acusen menos esta desventaja.

20 Se ha descrito la producción de poliovirus usando célula Vero en suspensión, lo que tiene como resultado títulos más bajos de virus (¹⁰log CCID₅₀/ml entre 6,5 y 7,9) que los observados en células Vero en microtransportadores convencionales (van Eikenhorst y col., 2009).

25 Bjare (1984) describe la producción de poliovirus en células linfoblastoides humanas en condiciones sin suero, con un título TCID₅₀ medio de aproximadamente $7,5 \times 10^6$ log/ml el día 4 después de la infección.

Es un objeto de la invención proporcionar procesos idóneos que pueden usarse para la producción a gran escala y económica de poliovirus para su uso en vacunas. Esto puede ayudar a proporcionar acceso a vacunas contra la polio asequibles en los países en desarrollo en una base sostenible.

30

Sumario de la invención

La invención se basa en la demostración de una propagación muy eficiente de poliovirus en células PER.C6, en la que se obtienen títulos elevados de poliovirus sin precedentes según los procedimientos descritos en este
 35 documento. La obtención de estos títulos elevados, que proporcionan una ventaja económica significativa sobre la producción de poliovirus en células Vero, no podía preverse en función de la replicación de otros virus en dichas células, ni podían preverse las condiciones para un proceso factible a nivel industrial, puesto que las condiciones y las ventajas que se pueden obtener pueden variar ampliamente para los diferentes tipos de virus que tienen propiedades considerablemente diferentes.

40

Así, la invención proporciona un proceso para la producción de poliovirus que comprende los siguientes pasos: a) proporcionar un cultivo de células en suspensión sin suero, las cuales son células PER.C6 depositadas con el número 96022940 de la ECACC, b) infectar dichas células con poliovirus, a una densidad celular de entre 2×10^6 células/ml y 150×10^6 células/ml, y c) recolectar los poliovirus de 12 a 48 horas después de la infección.

45

En determinadas realizaciones, dicha infección se realiza a una densidad celular de aproximadamente 5×10^6 células/ml a 20×10^6 células/ml, por ejemplo entre aproximadamente 8×10^6 células/ml y 15×10^6 células/ml, por ejemplo aproximadamente a 10×10^6 células/ml.

50

En determinadas realizaciones, dicha recogida de poliovirus se realiza en un momento entre aproximadamente 18 y 30 horas después de la infección, por ejemplo aproximadamente 24 horas después de la infección.

Estas condiciones permiten obtener títulos muy altos (alrededor de 10^{10} /ml, que es significativamente más de 10 veces los títulos obtenidos normalmente usando microtransportadores basados en células Vero para cepas de poliovirus de tipo salvaje) de poliovirus en un proceso relativamente corto que, por tanto, tiene ventajas económicas significativas sobre los procesos usados actualmente para la producción de poliovirus para la preparación de vacunas. Esto se demostró para los tres tipos de poliovirus: tipo 1 (cepa Brunenders), tipo 2 (cepa MEF) y tipo 3 (cepa Saukett).

55

Por tanto, en determinadas realizaciones, dicho poliovirus es un poliovirus de tipo salvaje virulento, por ejemplo, poliovirus de tipo 1, poliovirus de tipo 2 o poliovirus de tipo 3. En determinadas realizaciones, dicho poliovirus es la cepa Mahoney o Brunenders del poliovirus de tipo 1, la cepa MEF (o MEF-1) del poliovirus de tipo 2 o la cepa Saukett del poliovirus de tipo 3. En otras realizaciones, dicho poliovirus es un poliovirus atenuado (que es menos neurovirulento), por ejemplo, una cepa Sabin (que también puede ser de tipo 1, 2 o 3).

65

La invención además proporciona un proceso para la producción de una vacuna contra la polio que comprende un

proceso para la producción de poliovirus según la invención, comprendiendo además la purificación, opcionalmente la inactivación, y la formulación de los poliovirus recolectados para obtener una vacuna contra la polio. Para una IPV, la inactivación se realiza mediante formalina u otros medios. Para una OPV, no es necesaria la etapa de inactivación.

5 También se describe en este documento proporcionar un volumen útil de poliovirus para la preparación de una vacuna contra la polio pudiéndose obtener dicho volumen de poliovirus mediante un proceso para la producción de poliovirus según la invención y que comprende medio de cultivo y un título de poliovirus de al menos $10^{9.4}$ CCID₅₀/ml, por ejemplo entre aproximadamente $10^{9.5}$ y 10^{11} CCID₅₀/ml, por ejemplo entre aproximadamente $10^{9.8}$ y $10^{10.8}$ CCID₅₀/ml. Dicho volumen puede ser de entre 1 y 1.000 litros. Dicho volumen puede contener células y/o detritus de células usadas según los procesos de la invención. Dicho volumen puede presentarse en un biorreactor o puede haberse retirado del biorreactor y puede presentarse en un recipiente adecuado.

15 También se describen poliovirus y vacunas contra la polio que se pueden obtener según los procedimientos de la invención. Dicho poliovirus y/o dicha vacuna no contienen proteínas de mono, preferiblemente no contienen proteínas no humanas. Tampoco contendrá otros residuos de células huésped no humanas. Por el contrario, el poliovirus que se haya producido según procedimientos convencionales contendrá proteína no humana residual y/o otros residuos no humanos procedentes de las células huésped usadas y/o del suero usado durante el cultivo celular. Por tanto, el poliovirus producido según la presente invención sufre menos contaminación por impurezas no humanas que son resultado del proceso de producción que los poliovirus producidos usando procesos convencionales.

25 La invención también proporciona un proceso para la obtención de una preparación de poliovirus en cultivo celular a un título de al menos aproximadamente $10^{9.4}$, preferiblemente al menos $10^{9.8}$, más preferiblemente al menos 10^{10} , por ejemplo entre $10^{10.5}$ y 10^{11} CCID₅₀/ml, que comprende los siguientes pasos: a) proporcionar un cultivo de células en suspensión sin suero, que son células PER.C6, b) infectar dichas células con poliovirus, a una densidad celular de entre 2×10^6 células/ml y 150×10^6 células/ml, y c) recolectar los poliovirus en un momento entre las 12 y las 48 horas después de la infección para obtener la preparación de poliovirus que tiene dicha concentración. Las realizaciones preferidas son las mismas que las descritas anteriormente para el proceso de producción de poliovirus según la invención.

Breve descripción de las figuras

- 35 Figura 1. Producción de poliovirus en células PER.C6 y Vero adherentes.
- Figura 2. Producción de poliovirus de tipo 1 en células PER.C6 en suspensión en diferentes medios sin suero, a diferentes MOI (multiplicidades de infección) y a diferentes densidades celulares en la infección.
- 40 Figura 3. Efecto de la temperatura y el momento de recogida sobre la producción de poliovirus de tipos 1, 2 y 3 en células PER.C6 en suspensión en medio sin suero.
- Figura 4. Efecto de la densidad celular en la infección, temperatura y momento de recogida sobre la producción de poliovirus de tipo 1 en células PER.C6 en suspensión en medio sin suero.
- 45 Figura 5. Producción eficiente de poliovirus de tipos 1, 2 y 3 en células PER.C6 en suspensión sin suero a densidades celulares altas.

Descripción detallada de la invención

50 Las células usadas en los procesos de la invención son células PER.C6, que son células inmortalizadas, también conocidas en la técnica como líneas celulares continuas, y como tal, tienen el potencial de una vida ilimitada (véase p. ej., Barrett y col., 2009). Por células PER.C6 para los fines de la presente solicitud se entenderá las células depositadas con el número 96022940 de la ECACC el 29 de febrero de 1996. Será evidente para los expertos que esta definición incluirá células PER.C6 procedentes de un pase posterior o un descendente de un pase posterior de estas células depositadas. Las células PER.C6 se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.994.128 y en Fallaux y col. (1998). Estas células son muy adecuadas para la producción de virus de la gripe para producir vacunas contra la gripe basadas en células, ya que pueden ser infectadas y propagar el virus con alta eficiencia, como se describe por ejemplo en Pau y col. (2001) y en el documento WO 01/38362. Las células PER.C6 son capaces de crecer en suspensión en ausencia de suero, como se describe por ejemplo en Yallop y col. (2005). Se demuestra en este documento que estas células son también muy adecuadas para la producción de poliovirus a altos niveles en cultivos en suspensión sin suero.

Además, las condiciones empleadas son ventajosas desde el punto de vista económico y reglamentario.

65 El uso de microtransportadores no es necesario para la presente invención, a diferencia de los procesos ampliamente utilizados con células Vero. Los microtransportadores contribuyen a los elevados costes de los

poliovirus producidos usando los procesos convencionales basados en células Vero.

Según la presente invención, sin suero significa que el medio usado para el crecimiento de las células y la infección carece de suero completo como componente. Puede no estar completamente exento de productos derivados de suero, como por ejemplo albúmina sérica bovina (BSA), aunque en realizaciones preferidas, dichos componentes tampoco están presentes, o se han producido mediante recombinación en ausencia de cualquier componente derivado de animales. En realizaciones preferidas, el procedimiento completo se realiza en ausencia de cualquier componente que derive directamente de animales, como suero o componentes del suero, etc. En una realización preferida el procedimiento de producción de una vacuna se realiza en condiciones de ausencia de componentes animales. Esto significa que el medio usado para el crecimiento celular y la infección está desprovisto de cualquier componente derivado de animales. Además, cualquier aditivo para suplementar el medio durante el proceso de producción de vacunas carecen también de componentes derivados de animales. La ausencia de componentes animales en el proceso de fabricación de dichas vacunas contra la polio ofrece un proceso más controlado y seguro. Por esta razón, las células PER.C6, que son células humanas completamente caracterizadas y que se desarrollaron de conformidad con la BPL/BPF son muy adecuadas para su uso en la fabricación de vacunas. Se pueden usar medios de cultivo diferentes y la elección del medio de cultivo óptimo para las células y de las circunstancias usadas es parte de las tareas de rutina del experto en este campo. Los medios de cultivo adecuados para los fines de la presente invención son, por tanto, bien conocidos por los expertos y se pueden obtener en general de fuentes comerciales en grandes cantidades o puede prepararse para el cliente según protocolos convencionales. El cultivo se puede realizar por ejemplo en placas, botellas roller o en biorreactores, usando sistemas de cultivo discontinuo, discontinuo alimentado, continuo o similares. Para lograr una producción (continua) a gran escala de virus a través del cultivo celular, es preferible en la técnica tener células capaces de crecer en suspensión y es preferible tener células capaces de ser cultivadas en ausencia de suero derivado de animal o humano o componentes séricos derivados de animal o humano. Se conocen las condiciones adecuadas para cultivar células (véase p. ej., Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores [1973], y Rl. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, cuarta edición [Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9]). Entre los medios de cultivo sin suero que se pueden usar según los procesos de la invención se incluyen, pero sin limitaciones, medios convencionales que se pueden pedir a partir de los catálogos de proveedores de medios, como CDM4PERMAb™ (Thermo Scientific HyClone, n.º cat. SH30871 y SH30872). Además, son adecuados los pedidos de medios personalizados como Permexcis (Lonza). Ejemplos de otros medios sin suero que pueden ser adecuados para su uso en los procesos de la invención son AEM (Invitrogen, n.º cat. 12582-011), medio EXCELL™ VPRO (JHR Biosciences, n.º cat. 14561) y CDM4Retino™ (HyClone, n.º cat. SH30520 y SH30519).

En determinadas realizaciones opcionales y no limitantes, es posible suplementar los medios sin suero en los procesos de la invención con lípidos y/o hidrolizados y/u otros suplementos, para mejorar la productividad.

El término «aproximadamente» o «alrededor de» para los valores numéricos tal como se usan en la presente descripción significan el valor $\pm 10\%$.

La infección de células con poliovirus y/o propagación de virus en los procesos según la presente invención se realiza, por ejemplo, de forma adecuada a una temperatura de entre aproximadamente 33 y 38°C. En realizaciones preferidas, dicha infección y/o propagación de virus se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 34 y 36°C, en determinadas realizaciones entre aproximadamente 34,5 y 35,5°C, por ejemplo aproximadamente a 35°C.

La infección de las células con poliovirus en los procesos según la presente invención puede realizarse adecuadamente, por ejemplo, a una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,001 y 10. En determinadas realizaciones, dicha infección se realiza a una MOI de entre aproximadamente 1 y 3, por ejemplo a una MOI de aproximadamente 2. La infección a esta MOI relativamente alta ($> 0,1$, preferiblemente aproximadamente 1 o más) puede aumentar adicionalmente el proceso de la alta eficiencia y alto rendimiento.

Según la presente invención, las células se infectan con poliovirus, preferiblemente a una densidad celular alta. La infección con poliovirus tiene lugar cuando las células tienen una densidad de entre 2×10^6 células/ml y 150×10^6 células/ml. En determinadas realizaciones preferidas, dicha infección se realiza a una densidad celular de entre aproximadamente 5×10^6 células/ml y 20×10^6 células/ml, por ejemplo entre aproximadamente 8×10^6 células/ml y 15×10^6 células/ml, por ejemplo aproximadamente a 10×10^6 células/ml. Hasta donde los autores saben, los procesos de la invención proporcionan las concentraciones celulares más altas a las cuales se fabrican las vacunas que no son de adenovirus. Las ventajas de estos procesos según la invención son la posibilidad de obtener títulos muy altos de poliovirus, es decir, al menos un orden de magnitud mayor que con los procesos convencionales en células Vero de la técnica previa.

En los procesos según la invención, los poliovirus se recogen en un momento entre las 12 y las 48 horas después de la infección. En determinadas realizaciones, dicha recogida de poliovirus se realiza en un momento entre las 18 y las 30 horas después de la infección, por ejemplo entre aproximadamente 20 y 28 horas, entre aproximadamente 22 y 26 horas después de la infección, por ejemplo aproximadamente 24 horas después de la infección. Por tanto, los procesos según la invención se pueden usar para obtener los títulos altos de poliovirus extremadamente rápido, lo que puede ayudar también a hacer los procesos de la invención extremadamente atractivos desde un punto de vista

económico, en comparación con los procesos más largos convencionales en la técnica.

Los cultivos en suspensión a mayor escala se obtienen en procesos discontinuos o discontinuos alimentados porque son los más simples de manejar y aplicar a gran escala, y dichos procesos son en principio adecuados para los procesos de la presente invención. Sin embargo, se han hecho más frecuentes los procesos continuos basados en principios de perfusión. En determinadas realizaciones de la presente invención, las células productoras se cultivan en un sistema de perfusión.

Los procesos de producción discontinuo, discontinuo alimentado y perfusión se han usado con células PER.C6, por ejemplo, para la producción de anticuerpos recombinantes. En los cultivos discontinuos, se consigue de forma rutinaria concentraciones de células viables superiores a 12×10^6 células/ml. Se ha demostrado en numerosas ocasiones que podían obtenerse concentraciones de células viables de hasta 40×10^6 células/ml usando cultivos discontinuos alimentados. En procesos de perfusión, se consiguen de forma rutinaria concentraciones celulares máximas superiores a 150×10^6 células/ml (Kral y col., 2009).

El cultivo de células por perfusión tiene su significado convencional en la técnica, es decir, significa que durante el cultivo, las células son retenidas mediante un dispositivo de separación en el que existe un flujo de salida del líquido que tiene una densidad celular más baja que antes de la separación y en el cual existe un flujo de entrada de medio de cultivo celular. El cultivo perfundido se utiliza en respuesta al problema que supone crecer las células a altas densidades (p. ej., $10\text{-}50 \times 10^6$ células viables/ml). Con el fin de aumentar las densidades, el medio se sustituye continua o intermitentemente por medio nuevo para suplir las deficiencias nutricionales y eliminar los productos tóxicos. La perfusión también permite un mejor control del entorno del cultivo (pH, dO_2 , nivel de nutrientes, etc.). La perfusión de medio nuevo a lo largo del cultivo se puede lograr reteniendo las células con diversos dispositivos de separación (p. ej., filtro de centrifugación de poro fino, de fibra hueca o filtros de membrana de placa plana, tubos de decantación). En determinados aspectos, el dispositivo de separación es un módulo de filtración que contiene fibras huecas, es decir, membranas tubulares. El diámetro interno del tubo está normalmente entre 0,3 y 6,0 mm, por ejemplo, entre 0,5 y 2,0 mm. En determinados aspectos, el tamaño de la malla (tamaño de poro) de la membrana se selecciona de modo que el tamaño de los poros de la malla esté próximo al diámetro de las células, garantizando una alta retención de las células mientras que el detritus de células puede atravesar el filtro. En otros aspectos, el tamaño de malla es significativamente menor que el diámetro de las células. Preferiblemente, el tamaño de malla está entre 0,1-30 μm , por ejemplo entre 0,1 y 3 μm , por ejemplo aproximadamente 0,2 μm . Los módulos de filtración que contienen fibras huecas están disponibles en el mercado por ejemplo en General Electric (anteriormente Amersham).

La perfusión se usa para mantener los niveles deseados de determinados metabolitos y eliminar y, por tanto, reducir las impurezas del medio de cultivo. Normalmente la perfusión no se realiza en todo momento durante el cultivo, sino que generalmente se realiza solo de vez en cuando durante el cultivo a elección. Por ejemplo, la perfusión normalmente no se inicia hasta después que se empiecen a agotarse determinados componentes del medio, como la glucosa, y sea necesario sustituirlos.

Se conocen en la técnica varios sistemas de perfusión y son, en principio, adecuados para su uso en procesos de la presente invención. Con el término «sistema de perfusión» se entiende la combinación de un biorreactor conectado a un dispositivo de separación. El dispositivo de separación puede incorporarse al biorreactor (p. ej., filtro de centrifugación de poro fino) o mantenerse fuera del biorreactor (p. ej., fibra hueca). En ambos casos, como se explica anteriormente, el dispositivo de separación evita el lavado de la masa celular del reactor y permite renovar el medio. En determinados aspectos, los biorreactores funcionan con (están conectados a) un sistema de perfusión de flujo tangencial alternante (ATF, por sus siglas en inglés) (p. ej., ATF System, Refine Technology, Co., East Hanover, NJ). El flujo tangencial puede lograrse según los procedimientos conocidos por los expertos en la materia y como se describe, por ejemplo, en el documento US 6.544.424. Se ha descrito el funcionamiento del sistema de perfusión ATF y es aplicable a gran escala (Furey, 2002). Los sistemas ATF permiten cultivar células durante periodos más largos de tiempo y alcanzar densidades celulares altas sin que se bloquee el filtro. De hecho, pueden obtenerse densidades celulares extremadamente altas de más de 100×10^6 células viables/ml con el uso de un sistema de perfusión ATF, por ejemplo, con células PER.C6 (véase p. ej., Yallop y col., 2005 y el documento WO 2005/095578). Sin embargo, en estas publicaciones previas las células PER.C6 en sistemas de perfusión se usaron para la producción de anticuerpos recombinantes, es decir, un propósito completamente diferente, y no para la infección con poliovirus.

En determinados aspectos, la perfusión por ejemplo con un sistema ATF es ventajosa durante la fase de precultivo (es decir, antes de la infección con poliovirus), puesto que permite obtener densidades celulares muy altas y las células están en buenas condiciones para la posterior infección con el poliovirus. Para conseguir dichas densidades celulares altas, el medio de cultivo, en determinados aspectos, se perfunde al menos parcialmente durante una parte del tiempo durante el crecimiento celular. En determinados aspectos, la perfusión se inicia una vez que se alcanza una densidad celular de entre aproximadamente 2×10^6 células viables/ml y 8×10^6 células viables/ml.

En los procesos de la invención, las células se infectan con poliovirus. Normalmente, los virus se expondrán a las células productoras adecuadas en condiciones óptimas, lo que permite la captación del virus. Los expertos en la

materia saben cómo encontrar las condiciones adicionales óptimas, es decir, para la agitación, pH, oxígeno disuelto (dO_2 u OD). Habitualmente, la agitación óptima está entre aproximadamente 50 y 300 rpm, normalmente aproximadamente 100-200, por ejemplo, aproximadamente 150; normalmente el valor de OD es del 5 al 60%, el pH óptimo está entre 6,7 y 7,7. Normalmente, el poliovirus infecta las células de la invención de forma espontánea, por lo que poner las células en contacto con las partículas de poliovirus es suficiente para la infección de las células. En general, se añade al cultivo un stock de inoculación de poliovirus para iniciar la infección y posteriormente el poliovirus se propaga en las células.

De forma ventajosa, fue posible infectar un cultivo celular según la invención con el poliovirus a altas densidades celulares, es decir, alrededor de 10×10^6 células/ml, y se obtienen títulos muy altos (superiores a 10^{10} CCID₅₀/ml) de poliovirus.

En determinadas realizaciones, la viabilidad del cultivo celular antes de la infección se mantiene por encima del 75%, lo que significa que al menos el 75% de la cantidad total de las células del cultivo es viable en el momento de la infección. En determinadas realizaciones, la viabilidad del cultivo celular en el momento de la infección es de al menos el 80%, en realizaciones adicionales de al menos el 85%. La viabilidad se puede determinar usando procedimientos habituales disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo, exclusión de azul tripán, recuento celular de Casy y similares.

En determinadas realizaciones, la densidad celular en el momento de la infección está entre aproximadamente 10×10^6 y 50×10^6 células viables/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 10×10^6 y 20×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 10×10^6 y 15×10^6 células/ml. Estas densidades celulares permiten una alta productividad de virus con una acumulación limitada de detritus de células y ADN de la célula huésped, lo que supone una ventaja para estas realizaciones en el procesamiento posterior de la recogida de poliovirus. De este modo, la presente invención proporciona un proceso optimizado para la producción de poliovirus, obteniéndose títulos altos de poliovirus, proporcionando al mismo tiempo un material de recogida que sigue siendo manejable para los fines del procesamiento posterior.

En otras realizaciones, la densidad celular en el momento de la infección está entre aproximadamente 15×10^6 y 150×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 15×10^6 y 80×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 20×10^6 y 50×10^6 células/ml. Las infecciones a estas densidades celulares pueden producir incluso concentraciones más altas de virus.

En determinadas realizaciones de la invención, se proporciona un procedimiento para la producción de un volumen de poliovirus a un título de al menos 10^{10} CCID₅₀/ml.

El título se expresa como CCID₅₀, que es la dosis infectiva del 50% en cultivo celular. A veces también se denomina TCID₅₀ (dosis infectiva del 50% en cultivo tisular), pero puesto que se determina para cultivos celulares, en este documento se usa el término CCID₅₀.

El virus se pone en contacto con las células para permitir que este infecte a dichas células y se propague. Por ejemplo, se añade el lote de inoculación viral al cultivo celular y se permite su absorción en las células, por ejemplo durante aproximadamente 30 minutos con agitación suave (p. ej., aproximadamente 30 rpm), tras lo cual puede añadirse más medio de cultivo y ajustarse el pH si se desea, la velocidad de agitación puede ajustarse y mantenerse el cultivo. Después de la fase de infección tiene lugar la amplificación del número de partículas virales. Por supuesto, este paso también se realiza preferiblemente en células PER.C6 que se cultivan en suspensión en ausencia de suero, y más preferiblemente en condiciones de completa ausencia de componentes derivados directamente de animales. Este paso puede realizarse de forma adecuada en biorreactores, por ejemplo a escalas de entre 1 y 20.000 litros, por ejemplo entre 10 y 2.000 litros, por ejemplo entre 50 y 1.000 litros, pudiéndose ajustar fácilmente la escala a la demanda de vacuna. En determinados aspectos, el biorreactor es un biorreactor de un solo uso (BSU).

Después de la propagación del poliovirus en las células, el virus o componentes del mismo se recogen del cultivo celular. Esto se puede realizar por procedimientos habituales, que son conocidos por los expertos. Los virus producidos y liberados en el medio de cultivo celular se pueden separar de la biomasa celular mediante procedimientos convencionales, como centrifugación o ultracentrifugación, y recogerse en el sobrenadante. En tal caso, la centrifugación o filtración es la fase de recogida. Se pueden usar procesos convencionales para la recogida del virus, por ejemplo, los descritos en el documento US 4.525.349. En resumen, la suspensión de medio líquido que contiene el virus normalmente se retira, se filtra y se concentra por ejemplo mediante ultrafiltración. Por ejemplo, al final del cultivo, la recogida se realiza recogiendo el medio de cultivo que contiene la suspensión viral. La recogida se puede filtrar, por ejemplo, usando un filtro de 0,22 μ m y opcionalmente se conserva a 4°C.

La recogida filtrada opcionalmente se puede ultrafiltrar para concentrar la suspensión viral y, posteriormente, el poliovirus se puede purificar, por ejemplo usando filtración en gel y/o cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo siguiendo los procedimientos descritos en el documento US 4.525.349 o en Van Wezel y col. (1978). La suspensión de virus concentrada resultante se puede diluir opcionalmente y, para la preparación de IPV, los poliovirus que contiene se pueden inactivar, para lo cual se pueden usar procedimientos convencionales.

Los métodos para la recogida y purificación de poliovirus o componentes virales, y para la producción de vacunas a partir de los mismos, se usan ya en la técnica desde hace décadas y, por tanto, son bien conocidos y se han descrito ampliamente, por ejemplo en Van Wezel y col., 1978; Montagnon y col., 1984 y los documentos
5 WO 2007/007344 y US 4.525.349.

Las vacunas contra la polio se basan en virus vivos o virus inactivados. Estas vacunas contienen el antígeno D de poliovirus, que es un antígeno protector importante. La producción de virus se puede determinar mediante técnicas convencionales de titulación de virus, mientras que la determinación de la concentración de antígeno D también se
10 realiza mediante técnicas habituales bien conocidas por los expertos, por ejemplo, el ensayo tipo ELISA de antígeno D. La inmunogenicidad se puede determinar por ejemplo mediante el análisis *in vivo* en animales. La potencia se puede determinar usando el ELISA de antígeno D y mediante un ensayo de cultivo celular neutralizante de poliovirus en sueros de ratas previamente inmunizadas.

En general, cada una de las cepas de poliovirus se cultiva en procesos independientes y, por ejemplo, se prepara una vacuna trivalente que contenga tres tipos de poliovirus, los virus (inactivados, para IPV) se mezclan y se formulan para la preparación de dosis individuales. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una vacuna final por dosis (p. ej., 0,5 ml) puede contener, por ejemplo, 40 unidades de antígeno D (UD) de poliovirus de tipo 1, 8 UD de poliovirus de tipo 2 y 32 UD de poliovirus de tipo 3, determinado mediante comparación con preparaciones de
15 referencia.

La inactivación de poliovirus se puede realizar según los procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo con formalina o con β -propiolactona (BPL) (véase, p. ej., Jiang y col., 1986). En determinadas realizaciones, la inactivación se realiza con formalina, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento: la suspensión viral purificada se filtra a través de una membrana de 0,22 μ m, calentando a 37°C con agitación magnética constante durante
25 24 horas, tras lo cual se añade una solución de formol para obtener una concentración de 1 por 4.000. Manteniendo la suspensión viral a 37°C, la agitación magnética se continúa durante los primeros cuatro días. El sexto día, la suspensión viral se filtra a través de una membrana de 0,22 micras y se continúa la inactivación en suspensión a 37°C hasta el duodécimo día. La suspensión viral inactivada se homogeniza y se puede conservar, por ejemplo, a 4°C. Después de este paso, los lotes concentrados y/o finales para la administración se pueden preparar por ejemplo mezclando las preparaciones deseadas.

En determinadas realizaciones, el poliovirus o componente viral purificado se formula en una composición farmacéutica. Esto se puede realizar según diversos procedimientos y usando diferentes tampones, todo ello según
35 procedimientos habituales bien conocidos por los expertos en la materia. En general, esto implica llevar las partículas de poliovirus en una composición farmacéuticamente aceptable, que contiene el poliovirus y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición se puede preparar en condiciones conocidas por los expertos y puede adecuarse para la administración a humanos. La composición puede contener medio de cultivo tamponado que, opcionalmente, puede ser medio M-199, que se usa como tampón de la formulación para determinadas vacunas de poliovirus inactivados convencionales. Además, se puede usar solución salina tamponada con fosfato y las formulaciones de dosificación finales pueden contener por ejemplo el 0,5% de 2-fenoxietanol y un máximo de 0,02% de formaldehído por dosis como conservantes antimicrobianos.

Los vehículos o excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se usan ampliamente en una gran variedad de productos terapéuticos. Preferiblemente, se emplean vehículos que funcionan bien en vacunas. Las vacunas pueden además contener un adyuvante, por ejemplo, alumbre. Los adyuvantes son conocidos en la técnica para aumentar adicionalmente la respuesta inmunitaria frente a un determinante antigénico aplicado.

Para la administración a humanos, las composiciones farmacéuticas pueden contener el poliovirus y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, el término «farmacéuticamente aceptable» significa que el vehículo o excipiente, a las dosis y concentraciones empleadas, no causarán ningún efecto perjudicial o no deseado en los sujetos a los que se administre. Dichos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000] y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). El poliovirus inactivado o partes inmunogénicas del mismo purificados preferiblemente se formulan y administran como solución estéril. Las soluciones estériles se preparan mediante filtración estéril o por otros procedimientos conocidos de por sí en la técnica. A continuación, las soluciones se liofilizan o se cargan en recipientes farmacéuticos de dosificación. El pH de la solución generalmente está en el intervalo de pH 3,0 a 9,5, por ejemplo de pH 5,0 a 7,5. El poliovirus o partes inmunogénicas del mismo normalmente están en una solución que tiene un tampón farmacéuticamente aceptable y la solución de poliovirus también puede contener una sal. Opcionalmente puede haber un agente estabilizante, como albúmina. Se puede añadir un detergente. La vacuna puede formularse en una preparación inyectable. Estas formulaciones contienen cantidades efectivas de poliovirus o de partes inmunogénicas del mismo, son soluciones líquidas estériles, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas y, opcionalmente, contienen estabilizantes o excipientes.
50
55
60
65

Una vacuna contra la polio puede ser monovalente, que contiene un tipo de poliovirus (tipo 1, 2 o 3), divalente (que contiene dos tipos de poliovirus, p. ej., los tipos 1 y 2, 1 y 3 o 2 y 3) o trivalente (que contiene los tres tipos de poliovirus, es decir, 1, 2 y 3).

5 Es posible producir IPV a partir de poliovirus de tipo salvaje. Alternativamente, la IPV se puede producir a partir de poliovirus vivos no virulentos, por ejemplo, a partir de cepas Sabin, que además reducirían el riesgo de reintroducción del poliovirus de tipo salvaje procedente de la fabricación de IPV (véase p. ej., el documento WO 2007/007344 y Doi y col., 2001). La presente invención es adecuada para la producción de poliovirus de tipo
10 salvaje (tipos 1, 2 y 3, p. ej., la cepa Mahoney de tipo 1, la cepa MEF de tipo 2 o la cepa Saukett de tipo 3), así como de tipos no virulentos de poliovirus (p. ej., las cepas Sabin). De este modo, la invención se puede usar para producir poliovirus para IPV, así como para OPV. Los procesos según la invención aplicados para producir IPV pueden servir para reducir los costes hasta tal grado que las IPV puedan ser asequibles en los países menos desarrollados. Aunque en general las OPV son más baratas que las IPV cuando se preparan según los procedimientos
15 convencionales, los procesos altamente eficientes de la invención pueden aún reducir los costes del material de partida para las OPV y, en consecuencia, reducir también los costes de las mismas.

La administración de una vacuna contra la polio puede, por ejemplo, realizarse por vía intramuscular, intradérmica u oral, según los procedimientos conocidos en la técnica.

20 Las vacunas de poliovirus que se pueden obtener según la invención pueden usarse como vacunas independientes, pero también se pueden combinar con otras vacunas de forma regular, por ejemplo, en forma de vacunas combinadas contra la difteria, pertussis, tétanos y poliomieltis, y puede incluir opcionalmente componentes de vacunas adicionales, por ejemplo, contra la hepatitis B y/o *Haemophilus influenzae*, etc. Así, el poliovirus es
25 adecuado para su uso en el Programa Ampliado de Inmunización (PAI) y se puede combinar con vacunas de este programa. De forma similar a las vacunas convencionales de poliovirus, la vacuna producida según la invención se puede administrar en una única dosis o, preferiblemente, en pautas de sensibilización-recuerdo en las que se administran múltiples dosis de la vacuna en intervalos de tiempo apropiados, por ejemplo, dos inyecciones con un intervalo de 1-2 meses, seguido por una dosis de recuerdo 6-12 meses después; o por ejemplo, una dosis oral
30 inicial, seguido de una segunda dosis aproximadamente 8 semanas después y una tercera dosis 8-12 meses después de la segunda dosis; o por ejemplo, para lactantes, una primera dosis oral a los 6-12 meses de edad, seguido de una segunda dosis aproximadamente 8 semanas después de la primera dosis y una tercera dosis aproximadamente a los 6-18 meses de edad; o por ejemplo, una única dosis para personas vacunadas previamente cuando el riesgo es mayor, etc. La pauta de administración óptima se puede determinar de conformidad con la
35 práctica médica convencional y seguirá, en general, los mismos esquemas que los de las vacunas de poliovirus disponibles.

La invención se explica además en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no limitan en modo alguno la invención. Estos simplemente sirven para aclarar la invención.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción eficiente de poliovirus en células PER.C6 adherentes

45 Para analizar la propagación del poliovirus en células PER.C6 adherentes y generar stocks de virus, se obtuvieron poliovirus de tipo 1 (Brunenders), de tipo 2 (MEF-1) y de tipo 3 (Saukett) de SBL (Suecia). Los títulos de estos stocks, cada uno producido en células Vero, eran alrededor de 10^6 CCID₅₀/ml. Las células PER.C6 (Fallaux y col., 1998) se crecieron en medio de cultivo (DMEM con STF al 10% y MgCl₂ 10 mM). En tres botellas de cultivo T175 se sembraron 30×10^6 células PER.C6/botella en 25 ml de medio de cultivo para cada tipo de poliovirus y se inocularon
50 al día siguiente con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 (0,1 CCID₅₀/células) a 37°C y CO₂ al 10% en un incubador humidificado. Tres días después se recogieron las células y el medio y se prepararon los lisados sin procesar mediante dos ciclos de congelación/descongelación. Tras la centrifugación para eliminar el detritus de células, los sobrenadantes se dividieron en alícuotas y se conservaron a -80°C. En paralelo, se sembró una botella de cultivo T175 con $6,25 \times 10^6$ células Vero en 25 ml de medio de cultivo para células Vero (medio Optipro SFM
55 suplementado con L-glutamina 4 mM) para cada cepa de poliovirus y se infectó con las mismas MOI. Los cultivos de células Vero también se recogieron después de 3 días, se congelaron/descongelaron dos veces y se alícuotaron para su conservación.

La producción de poliovirus se cuantificó, a continuación, mediante un ensayo de CCID₅₀ usando células Vero. A
60 tales efectos, se sembraron $1,25 \times 10^4$ células Vero en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en 100 µl de medio y se incubaron a 37°C y de CO₂ al 5%. Al día siguiente se preparó una serie de 15 diluciones 1:5 de las muestras de poliovirus en medio de cultivo de células Vero y se añadieron 100 µl de las diluciones número 5 a 15 a las columnas 1 a 11 de la placa de 96 pocillos por octuplicado. La columna 12 sirvió como columna control sin infectar. Siete días después se analizó en los pocillos la aparición de efecto citopatogénico (ECP) y se calcularon los títulos usando el
65 método de Spearman-Kärber:

$$\text{Título del valor extremo de dilución } (\log_{10}) = X_0 - d/2 + d/n * \sum X_i$$

Donde X_0 es el valor en \log_{10} de la dilución más alta a la cual todas las inoculaciones siguen siendo positivas, d es el valor en \log_{10} del factor de dilución usado, n es el número de replicados en cada dilución y $\sum X_i$ es la suma de todos los pocillos que son positivos, incluida la dilución X_0 .

Los resultados del experimento de titulación se representan en la figura 1 y muestran que en células PER.C6 adherentes, los títulos eran más de 5 veces superiores que en células Vero para el poliovirus de tipo 1 y más de 10 veces superiores en el caso de los tipos 2 y 3. Se espera que las diferencias en la producción de partículas virales por célula sean más pequeñas puesto que se sembraron más células PER.C6. Tanto para células PER.C6 como para Vero, la confluencia de la monocapa de células se estimó que era de aproximadamente el 80%.

Para estos experimentos, los autores concluyeron que la producción de poliovirus en monocapas adherentes de células PER.C6 era al menos tan buena como en células Vero.

Ejemplo 2: Producción eficiente de poliovirus en células PER.C6 en suspensión

Para estudiar la propagación de poliovirus en células PER.C6 en suspensión, se realizaron experimentos a pequeña escala para analizar diferentes medios de cultivo, multiplicidad de infecciones (MOI) y momento de recogida (MDR). A este efecto, se cultivaron las células PER.C6 en tres medios diferentes: AEM (Invitrogen), BMIVg (disponible en el mercado como Permexcis™, de Lonza) y CDM4PERMAb (Hyclone). El día de infección, se hizo un recuento de las células cultivadas en un tipo de medio y se volvieron a sembrar en el mismo tipo de medio a diferentes densidades celulares (1,5; 2,5; 3,5 o 5 millones de células/ml) y se infectaron con diferentes MOI (0,01; 0,05 o 0,1 CCID₅₀/célula) a 37°C en un incubador humidificado sobre una plataforma con agitación. La plataforma (IKA KS 260) tenía un diámetro orbital de 10 mm y se usó a 100 rpm para matraces en agitación de 125 o 250 ml cargadas con 15-20 ml de medio. Para el medio AEM, las células se sembraron a 1,5 o 2,5 millones de células/ml, ya que el medio AEM no admite densidades celulares más altas. De esta forma se prepararon varios cultivos que se recogieron 2, 3 o 4 días después de la infección. Todas las muestras se congelaron/descongelaron dos veces y se conservaron a -20°C o menos hasta su análisis posterior.

En la figura 2 se representan los resultados de la titulación de las muestras del día 2 y del día 4 (el día 3 no se muestra). Las células PER.C6 crecidas e infectadas en los tres medios fueron capaces de producir títulos altos de poliovirus de tipo 1, aunque el medio BMIVg daba títulos algo más bajos en comparación con los medios PERMAb y AEM. Asimismo, incubaciones más largas no daban lugar a títulos más altos. Por el contrario, la recogida del día 2 proporcionó en la mayoría de los casos títulos más altos en comparación con las recolecciones de los días 3 y 4. En este experimento no se pudo ver un efecto constante de la variación de las MOI. Es de resaltar que el uso de densidades celulares más altas en el momento de la infección daba lugar a títulos volumétricos superiores, lo que demuestra que un proceso de cultivo en suspensión usando densidades celulares altas es beneficioso para la producción de poliovirus infeccioso.

En un siguiente experimento se compararon el momento de recogida y la temperatura durante la infección para las tres cepas de poliovirus. A este efecto, las células PER.C6 se sembraron en medio AEM a $2,5 \times 10^6$ células/ml en volúmenes de 15 ml en matraces en agitación e infectadas con una MOI de 0,1 a 37 y a 35°C de cada cepa de poliovirus. Las células y el medio se recogieron 2, 3 y 4 días después de la infección y se procesaron como se describe anteriormente. El análisis de la producción de virus en las diferentes condiciones se realizó mediante la determinación de los valores de CCID₅₀ como se describe anteriormente y se demostró un incremento en la producción a 35°C en comparación con 37°C para los tres tipos de poliovirus (figura 3). Además, se confirmó, y se hizo extensible a los poliovirus de tipo 2 y 3, que en la mayoría de los casos los títulos más altos se obtenían cuando las recolecciones se realizaban el día 2.

Ejemplo 3: La producción de poliovirus en células PER.C6 en suspensión aumenta a una densidad celular más alta

Para estudiar si un aumento adicional en la densidad celular conduce a un incremento en el título de virus, se compararon las producciones con $2,5 \times 10^6$ células/ml y con 10×10^6 células/ml. A este efecto, se sembraron células PER.C6 en medio PERMAb en un volumen de 15 ml en matraces en agitación a las densidades celulares indicadas y se infectaron con 2 CCID₅₀/célula de poliovirus de tipo 1 por triplicado. Transcurridas 24 y 48 horas, se recogieron las células y el medio y los lisados clarificados se prepararon mediante congelación/descongelación y centrifugación como se describe anteriormente. Además de las temperaturas analizadas previamente de 35 y 37°C, el experimento también se realizó a 33°C.

El análisis de los títulos mediante el ensayo de CCID₅₀ (figura 4) confirmó que la producción mejoraba cuando las células se infectaban a una densidad de 10×10^6 células/ml en comparación con $2,5 \times 10^6$ células/ml. Los mejores títulos se obtuvieron a 35°C, independientemente de la densidad celular o del día de recogida. Asimismo, e indicativo de la eficiente propagación de poliovirus en células PER.C6, se demostró que las recolecciones también se pueden hacer después de 24 horas, puesto que la producción en las muestras de 24 o 48 horas era muy similar.

En un siguiente experimento, estas condiciones se analizaron también para otros tipos de poliovirus. Las células PER.C6 se sembraron en medio PERMAb a 10×10^6 células/ml y se infectaron con 2 CCID₅₀/célula a 35°C en matraces en agitación por triplicado con diferentes stocks de poliovirus. Las recolecciones se realizaron después de 24 y 48 horas y se procesó el medio para clarificar los lisados como se describe anteriormente. La titulación por medio del ensayo de CCID₅₀ demostró que el uso de densidades celulares altas también daba lugar a producciones elevadas de virus para los tipos 2 y 3 (figura 5).

Esto demuestra claramente que los cultivos de alta densidad de células PER.C6 en suspensión proporcionan una excelente plataforma para la producción de poliovirus de tipo salvaje. Puesto que la densidad celular de las células PER.C6 y el tamaño/volumen del cultivo se puede incrementar usando sistemas de biorreactor, bolsas para cultivo o cualquier otro tipo de sistema aplicable a gran escala para cultivo, la producción de poliovirus se puede mejorar significativamente en comparación con el sistema de microtransportadores actual con cultivos de células Vero.

Los poliovirus producidos se recogen y purifican según los procedimientos conocidos en la técnica y usados para poliovirus propagados en células Vero, se inactivan con formalina según métodos conocidos y, posteriormente, se analiza su inmunogenicidad usando un ensayo convencional de inmunogenicidad en ratas según procedimientos bien conocidos en la técnica (p. ej., Bevilacqua y col., 1996). Se espera que el poliovirus producido de este modo tenga una inmunogenicidad comparable a la del poliovirus producido con procesos convencionales usando células Vero.

Ejemplo 4: Producción de poliovirus en células PER.C6 en un biorreactor

Las células se descongelaron a partir de un banco de células de trabajo PER.C6 y se propagaron en medio de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37°C y CO₂ al 10%. Se realizaron subcultivos cada 3 o 4 días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 2 litros a una densidad celular de $0,2-0,4 \times 10^6$ células/ml. Las células se propagaron en el biorreactor de 2 litros a 37°C, con un valor de OD del 40% y un pH de 7,3. Cuando se alcanzó una densidad celular de aproximadamente 2×10^6 células/ml (día 4 después de la inoculación), se inició un sistema ATF para permitir el cultivo de las células durante un periodo más largo y alcanzar densidades celulares más altas. Transcurridos aproximadamente 11 a 12 días, se alcanzó en el biorreactor de 2 litros una densidad celular de más de 50×10^6 células/ml. En este momento la suspensión celular se transfirió a un biorreactor de 10 litros. La suspensión celular procedente del biorreactor de 2 litros se diluyó 1:5 con medio de cultivo sin suero. La densidad celular en el biorreactor de 10 litros estaba entre 10 y 15×10^6 células/ml. Posteriormente, el biorreactor de 10 litros se infectó con un stock de inoculación de poliovirus a una MOI de 2 CCID₅₀/célula. La producción de poliovirus se realizó a 35°C, pH 7,3 y un valor de OD del 40%. Se tomaron muestras del biorreactor de 10 litros en determinados puntos temporales para realizar un recuento celular y determinar la producción de poliovirus y su recogida se hizo de forma idónea entre las 12 y las 48 horas después de la infección.

40 **Referencias**

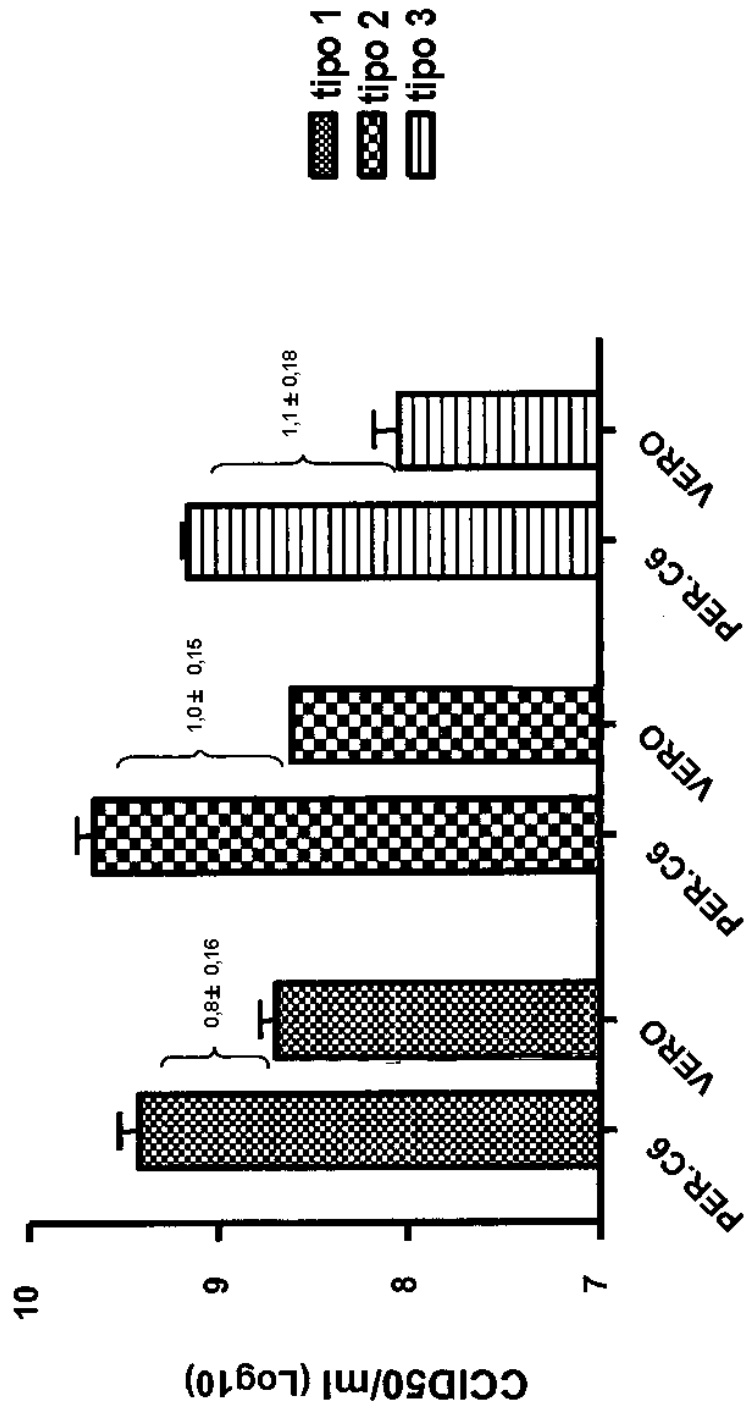
- Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. 2009. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 8: 607-618.
- 45 Bevilacqua JM, Young L, Chiu SW, Sparkes JD, Kreeftenberg. JG. 1996. Rat immunogenicity assay of inactivated poliovirus. *Dev. Biol. Stand.* 86: 121-127.
- Bjare U. 1984. Propagation of large quantities of poliovirus in human lymphoblastoid cells grown in a serum-free medium. *J. Virol. Meth.* 9: 259-268.
- 50 Campbell SA, Lin J, Dobrikova EY, Gromeier M. 2005. Genetic determinants of cell type-specific poliovirus propagation in HEK 293 cells. *J. Virol.* 79: 6281-6290.
- Card CJ, Smith T, Hunsaker B, Barnett B. 2005. Serum-free production of poliovirus: A comparative study using microcarriers, roller bottles and stationary cell culture. En: F. Gódiya y M. Fussenegger (Eds.), *Animal Cell Technology meets Genomics*, 761-765.
- 55 Doi Y, Abe S, Yamamoto H, Horie H, y col. 2001. Progress with inactivated poliovirus vaccines derived from the Sabin strains. En: Brown F (ed): *Progress in Polio Eradication: Vaccine Strategies for the End Game*. *Dev. Biol.* 105: 163-169.
- 60 Van Eikenhorst G, Bakker WAM, Thomassen YE, van der Pol LA. 2009. Platform technology for viral vaccine production: comparison between attached and suspension Vero cells. Póster y resumen P70. En: 21^{er} Reunión de la European Society for Animal Cell Technology, Programa y libro de resúmenes.
- 65 Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, y col. New helper cells and

- matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, sep. 1998; 1;9(13):1909-17.
- 5 Furey J. Scale-up of a cell culture perfusion process - A low-shear filtration system that inhibits filter-membrane fouling. *Genetic Engineering News*. Vol. 22, n.º 7, abril 2002.
- Jiang S, Pye D, Cox JC. 1986. Inactivation of poliovirus with β -propiolactone. *J. Biol. Stand.* 14: 103-109.
- 10 John J. 2009. Role of injectable and oral polio vaccines in polio eradication. *Expert Rev. Vaccines* 8: 5-8.
- Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. 2005. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 587-635.
- 15 Kral KM, Golden K, Zijlstra G, Swaving J, Nieboer M, Chon JH. 2009. Advances in high yielding platform production processes using the PER.C6® human cell line. Resúmen P142. En: 21^{er} Reunión de la European Society for Animal Cell Technology, Programa y libro de resúmenes.
- Merten O.-W., Wu R, Couvé E, Crainic R. 1997. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. *Cytotechnology* 25: 35-44.
- 20 Montagnon B, Vincent-Falquet JC, Fanget B. 1982. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed poliovirus vaccine. Promising results. *Develop. Biol. Standard.* 55: 37-42.
- Montagnon BJ, Fanget B, Vincent-Falquet JC. 1984. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. *Rev. Infect. Dis.* 6 (supl. 2): S341-S344.
- 25 Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 2001 Mar 21;19(17-19):2716-21.
- 30 Van Wezel AL, van Steenis G, Hannik CA, Cohen H. 1978. New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines. *Develop. Biol. Standard.* 41: 159-168.
- Wright PF, Modlin JF. 2008. The demise and rebirth of Polio - A modern Phoenix? *J. Infect. Dis.* 197: 335-336.
- 35 Yakovenko ML, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP y col. 2009. Evolution of the Sabin vaccine into pathogenic derivatives without appreciable changes in antigenic properties: need for improvement of current poliovirus surveillance. *J. Virol.* 83: 3402-3406.
- 40 Yallop C, Crowley J, Cote J, Hegmans-Brouwer K, Lagerwerf F, Gagne R, Martin JC, Oosterhuis N, Opstelten DJ, Bout A. Per.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins. *Modern Biopharmaceuticals - Design, Development and Optimization*. Vol. 3, 2005.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de poliovirus, que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar un cultivo de células en suspensión sin suero, las cuales son células PER.C6 depositadas con el número 96022940 de la ECACC,
- b) infectar dichas células con poliovirus, a una densidad celular de entre 2×10^6 células/ml y 150×10^6 células/ml, y
- 10 c) recoger los poliovirus en un momento entre las 12 y las 48 horas después de la infección.
2. Un proceso según la reivindicación 1, en el que dicha infección y/o propagación del virus se realiza a una temperatura de entre 34 y 36°C.
- 15 3. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha infección se realiza a una densidad celular de entre aproximadamente 5×10^6 células/ml y 20×10^6 células/ml.
4. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha infección se realiza a una densidad celular de aproximadamente 10×10^6 células/ml.
- 20 5. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha infección se realiza a una multiplicidad de infección (MOI) de entre 1 y 3, por ejemplo alrededor de 2.
6. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la recogida de dicho poliovirus se realiza en un momento entre las 18 y las 30 horas después de la infección, por ejemplo, alrededor de 24 horas después de la infección.
- 25 7. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho poliovirus es un poliovirus de tipo 1, un poliovirus de tipo 2 o un poliovirus de tipo 3.
- 30 8. Un proceso según la reivindicación 7, en el que dicho poliovirus es un poliovirus de tipo 1 de la cepa Mahoney, un poliovirus de tipo 2 de la cepa MEF o un poliovirus de tipo 3 de la cepa Saukett.
9. Un proceso según la reivindicación 7, en el que dicho poliovirus es un poliovirus atenuado, como una cepa Sabin.
- 35 10. Un proceso para la producción de una vacuna contra la polio, que comprende un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente purificar, inactivar opcionalmente y formular los poliovirus recogidos para obtener una vacuna contra la polio.

Fig. 1



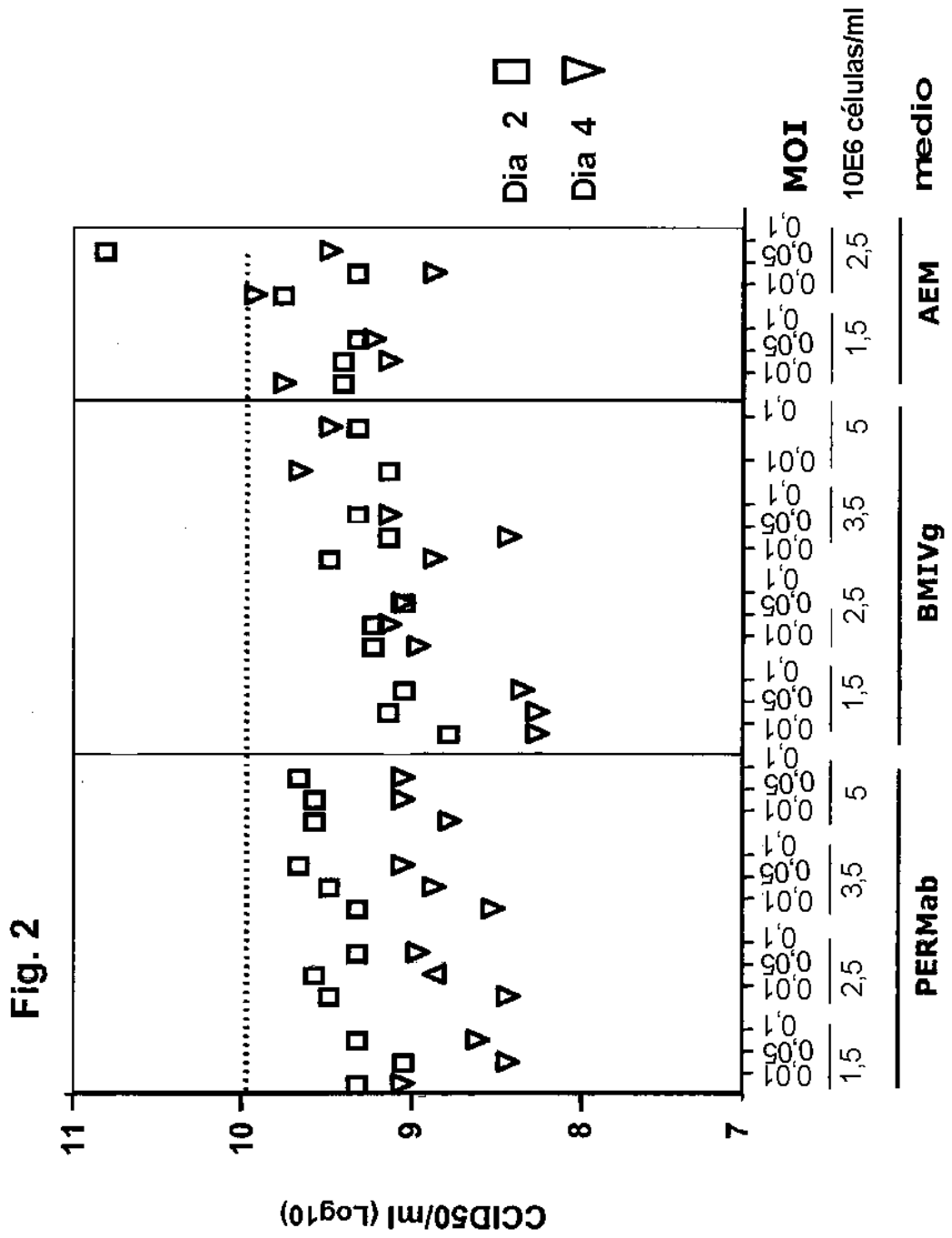


Fig. 3

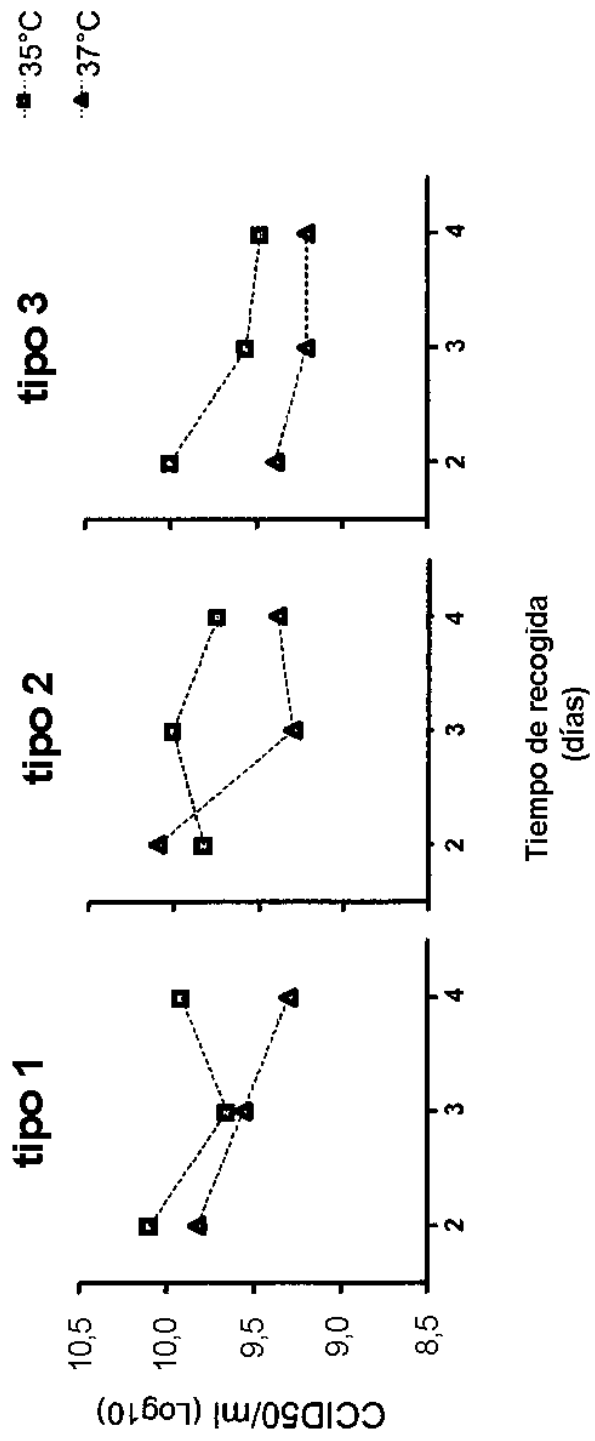


Fig. 4

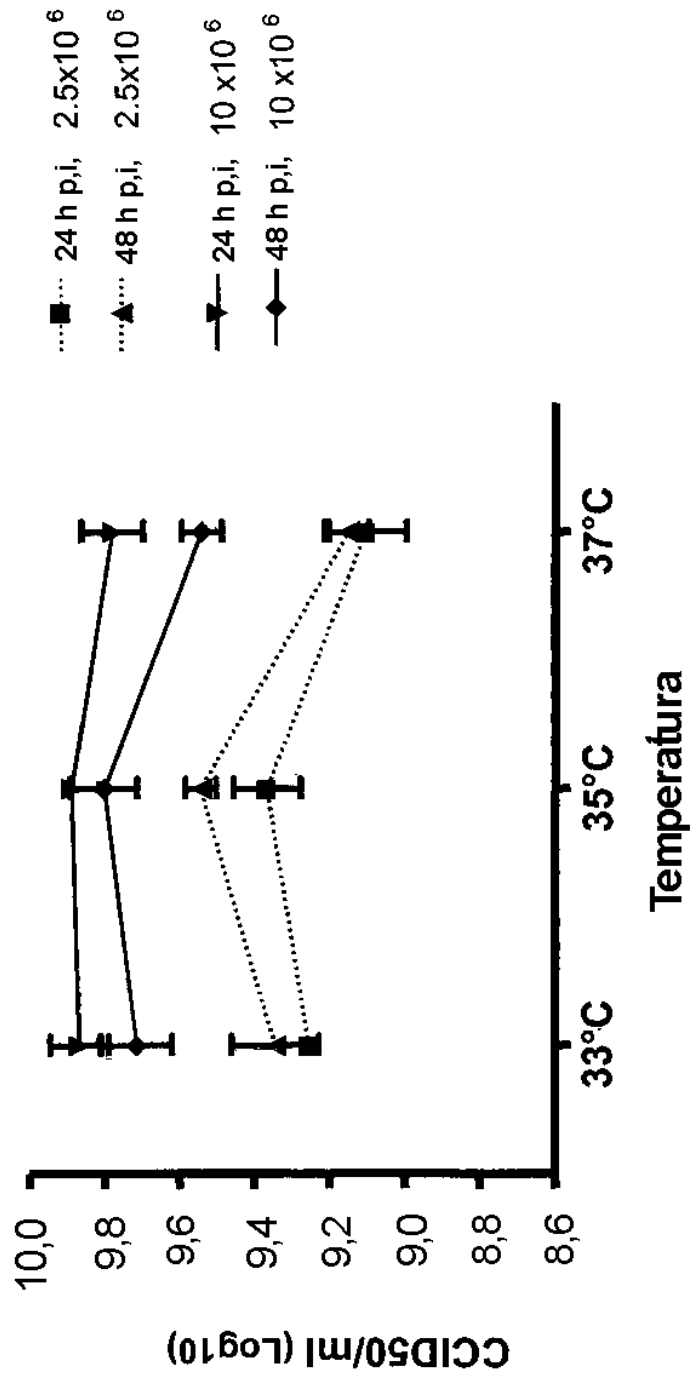


Fig. 5

