

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 496**

51 Int. Cl.:

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: **30.04.2008 E 08749279 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2155863**

54 Título: **Perfil de temperatura en dos etapas para la propagación de virus**

30 Prioridad:

04.05.2007 US 927693 P

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

12.11.2014

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
ONE BAXTER PARKWAY
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**REITER, MANFRED;
GRILLBERGER, LEOPOLD y
MUNDT, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 521 496 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

Perfil de temperatura en dos etapas para la propagación de virus.

La presente invención se refiere al campo de la propagación de virus.

5 La propagación de virus en cultivos celulares animales se lleva a cabo bajo condiciones de temperatura que dependen de las características del virus y del sistema huésped para la propagación. Para el crecimiento de las células (en cultivo celular o siembra de huevos embrionarios) se seleccionan determinadas temperaturas, seguidas de una temperatura adecuada para la propagación viral. En la mayoría de los casos, la temperatura de propagación viral es menor que la temperatura de propagación celular. La propagación viral sensible a la temperatura se refiere a la influencia en la velocidad de propagación del virus y la formación de antígenos en un intervalo de temperatura centrado aproximadamente alrededor de 20°C en el caso de cultivos de células de insectos (por ejemplo con producción de Baculovirus) y a temperaturas de hasta aproximadamente 37°C en el caso de la producción viral en cultivo celular de mamífero, existiendo valores óptimos específicos para cada combinación virus/célula huésped. 10 Una temperatura más elevada afecta tanto a la cinética de infección como a la estabilidad viral. Cuando se propagan virus a una temperatura de 37°C, frecuentemente se observa un título viral reducido y una menor calidad de antígeno viral durante los periodos posteriores de replicación viral. Este efecto puede tener consecuencias perjudiciales para la propagación del virus a gran escala en la producción de vacunas. En este contexto, Wehchuk y col. (Wehchuck, J. B. y col.; *Biotechnology and Bioengineering*, 79(1), julio de 2002, pp. 112-119) describen el uso de vectores basados en el virus de herpes simple de tipo 1 (VHS-1) genómico de replicación defectiva para transferir genes terapéuticos en células del sistema nervioso central y otros tejidos. El documento EP 1 526 172 A1 describe un proceso para la replicación del virus de la gripe en cultivo celular donde las células se cultivan a una temperatura entre 30°C y 36°C después de infectarlas con el virus de la gripe. Rott y col. (Rott, R. y col.; *Journal of General Virology*, 3(2); 1968; pp. 239-524) describen la síntesis del virus de la gripe aviar en fibroblastos de embrión de pollo a 37°C y 25°C. Yuk y col. (Yuk, I. H. y col.; *Cytotechnology*, 51(3); noviembre de 2006; pp. 183-192) describen el cultivo de un virus quimérico del virus de la parainfluenza de tipo 3 (VPI3) y del virus respiratorio sincitial (VRS) a 37°C y 33°C después de infectar células huésped respectivas. Además, Jardon y col.; *Biotechnology Progress*, 19(1); febrero de 2003; pp. 202-208) describen los efectos de variaciones de la temperatura de cultivo en la producción de un vector de adenovirus recombinante (AVr) en células HEK293. Por otro lado, McTaggart y col. (McTaggart, S. y col.; *Biotechnology Progress*, 16(5); septiembre de 2000; pp. 859-865) describen la influencia de unas condiciones de cultivo a 32°C en comparación con unas condiciones de cultivo a 37°C en el título y el rendimiento celular cuando se producen vectores retrovirales en una línea celular empaquetadora. Finalmente, el documento WO 03/085138 A describe la influencia de la reducción de la temperatura antes de la infección y vuelta a una temperatura más óptima en el momento de la infección viral o cerca del mismo en células huésped para la producción de virus térmicamente estables, tales como adenovirus y picornavirus.

35 Un objetivo de la presente invención es proporcionar unas condiciones de crecimiento mejoradas que no afecten a la calidad de los antígenos producidos con fines de vacunación.

La presente invención proporciona un método para la producción de un virus donde una o más células huésped se infectan con el virus y después se cultivan a una primera temperatura de 31°C a 37°C durante 1 a 48 horas y, a continuación, se cultivan a una segunda temperatura que es de 1 a 6°C inferior que la primera temperatura. Después se recoge el virus producido mediante estos pasos de cultivo, siendo dicho virus un ortomixovirus, alfavirus o flavivirus, llevándose a cabo el método a escala industrial en más de 50 litros de cultivo celular y teniendo el método un efecto positivo sobre la pureza del antígeno en comparación con el mismo método llevado a cabo a temperatura constante.

45 Ahora se ha comprobado sorprendentemente que las condiciones de cultivo para muchos virus, incluyendo el virus de la gripe (Orthomyxoviridae), virus del río Ross (Alphaviridae) y virus del Nilo occidental (Flaviviridae), se puede mejorar considerablemente mediante el uso de un perfil de dos temperaturas. Para la primera fase de la propagación viral se aplica una temperatura más alta, que acelera la formación de partículas virales infecciosas. En una segunda fase, se aplica una temperatura más baja para mantener el alto título inicial obtenido en el período de propagación a alta temperatura y para permitir una formación de antígeno estable, que puede ser utilizado para la producción adicional de vacunas inmunógenas.

- 50 Fig. 1: Diagrama de bandas del antígeno del virus de Nueva Caledonia propagado en células Vero a (A) 32°C y (B) 36°C.
 Fig. 2: Gráfico NaBr de infección por el virus del río Ross a 37°C en diferentes momentos después de la infección.
 Fig. 3: Gráfico NaBr de infección por el virus del río Ross a 35°C en diferentes momentos después de la infección.
 55 Fig. 4: Gráfico NaBr de infección por el virus del río Ross a 32°C en diferentes momentos después de la infección.
 Fig. 5: Gráfico NaBr de infección por el virus del río Ross a 35°C/32°C en diferentes momentos después de la infección.

- Fig. 6: Western blot de inóculo de infecciones por el virus del río Ross a 37°C y 35°C/32°C.
 Fig. 7: Gráfico NaBr de infección por el virus del Nilo occidental a 35°C en diferentes momentos después de la infección, con imágenes microscópicas.
 Fig. 8: Gráfico NaBr de infección por el virus del Nilo occidental a 32°C en diferentes momentos después de la infección, con imágenes microscópicas.
 Fig. 9: Gráfico NaBr de infección por el virus del Nilo occidental a 35°C/32°C en diferentes momentos después de la infección, con imágenes microscópicas.

Un aspecto de la invención se refiere a que el perfil de temperatura en dos pasos tal como se describe aquí permite la optimización independiente y el control de (1) la formación de virus activos para infección de ciclo múltiple de células huésped, (2) el mantenimiento del alto título obtenido en la última fase de replicación y (3) la formación de antígenos en la fase posterior del proceso de producción.

Preferentemente, el virus es un virus de la gripe y en determinadas realizaciones se selecciona de entre el grupo consistente en virus de la gripe A y B, virus del río Ross y virus del Nilo occidental. Aunque los ejemplos aquí proporcionados ilustran la producción mejorada de antígenos para estos virus utilizando el método de dos temperaturas de la invención, ejemplos no limitativos de otros virus considerados por la invención incluyen virus seleccionados de entre el grupo de familias de ARN-virus tales como Reoviridae, Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Arenaviridae, Retroviridae, Flaviviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Coronaviridae, Astroviridae o Bornaviridae, y familias de ADN-virus tales como Adenoviridae, Papovaviridae, Parvoviridae, Herpesviridae, Poxviridae o Hepadnaviridae. En determinadas realizaciones, los virus se seleccionan de entre el grupo consiste en Influenza A/Panamá/2007/99, A/Nueva Caledonia/20/99, B/Shangdong/7/97, B/Malasia/2506/2004, A/Hiroshima/52/2005 y A/Islas Salomón/3/2006.

El virus se puede producir en cualquier célula adecuada para la producción viral. Preferentemente, las células son de un cultivo celular o línea celular animal. Estas células pueden ser de un tejido específico o de células embrionarias. Preferentemente, el animal es un mamífero o un ave. En diversas realizaciones de la invención se pueden utilizar líneas celulares caninas, líneas celulares de roedor, líneas celulares aviares o líneas celulares de tejido de primate. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las células pueden ser células MDCK, células CHO, células perC6, células HEK 293 u otras células utilizadas comúnmente en la propagación viral. En algunas realizaciones específicas, las células son células epiteliales, en particular células epiteliales renales, como células Vero de mono verde africano.

En ciertas realizaciones de la invención, las células se cultivan en un medio que no contiene proteínas séricas animales. Estos medios no incluyen, por ejemplo, suero bovino o partes del mismo, como suero bovino fetal. Estos medios se denominan "medios libres de proteínas séricas". Durante el período de propagación viral se pueden añadir al medio las proteasas necesarias para la propagación viral, por ejemplo tripsina. En algunas realizaciones, estas proteasas se pueden derivar de fuentes no animales, tales como bacterias, o de fuentes recombinantes, o se pueden derivar de fuentes animales. Estos medios complementados se siguen considerando medios libres de proteínas séricas dentro del significado de la expresión tal como se utiliza aquí.

De acuerdo con la invención, los métodos de la invención se llevan a cabo a escala industrial en más de 50 litros de cultivo celular. En algunas realizaciones de la invención, los métodos se llevan a cabo en 50 a 100 litros de cultivo celular, 100 a 500 litros de cultivo celular, 500 a 1.000 litros de cultivo celular o más de 1.000 litros de cultivo celular (por ejemplo, en 6.000 litros, 10.000 litros o incluso en biorreactores de mayor tamaño). En algunas realizaciones de la invención, los métodos de la invención se llevan a cabo en un biorreactor de tanque con agitación.

De acuerdo con la invención, la primera temperatura de propagación del virus es inferior a la temperatura de propagación del cultivo celular para el tipo de célula huésped dado. En algunas realizaciones, la primera temperatura oscila entre 32°C y 37°C, preferentemente entre 33°C y 36°C, de forma especialmente preferente entre 34°C y 35,5°C y en particular 35°C. En otras realizaciones, la primera temperatura oscila preferentemente entre 31°C y 35°C, más preferentemente entre 31°C y 34°C, en especial entre 32°C y 34°C, con especial preferencia entre 32°C y 33,5°C, en particular entre 33°C y 34°C y de forma totalmente preferente 33,5°C, o en algunas realizaciones 33°C. En particular, para los volúmenes de cultivo celular más grandes (1.000 litros o más), pueden ser preferentes los intervalos de primera temperatura más bajos. La primera temperatura puede ser de al menos 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C o 36°C o de menos de 37°C, 36°C, 35,5°C o 35°C. El cultivo de las células a la primera temperatura se puede llevar a cabo durante más de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30 horas o durante menos de 48, 46, 44, 42, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14 o 12 horas.

En realizaciones adicionales, la segunda temperatura se reduce de 1,5°C a 5°C, preferentemente se reduce de 2°C a 4°C, de forma especialmente preferente de 2,5°C a 3,5°C y de forma totalmente preferente 3°C, en comparación con la primera temperatura. La disminución puede ser de al menos 1°C, 2°C, 2,5°C, 3°C o 4°C, o de menos de 6°C, 5°C, 4°C, 3,5°C, 3°C, 2,5°C o 2°C.

En otras realizaciones, la segunda temperatura oscila entre 29°C y 35°C, preferentemente entre 30°C y 34°C, más preferentemente entre 31°C y 33°C, de forma especialmente preferente entre 31,5°C y 32,5°C y de forma totalmente

preferente es de 32°C. La segunda temperatura puede ser superior a 28°C, 29°C, 30°C o 31°C, o inferior a 35°C, 34°C, 33°C o 32°C.

5 Este método también puede ser utilizado para la producción de antígenos virales. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de un virus o antígenos virales, en el que se produce un virus tal como se describe aquí y el virus o los antígenos virales se aíslan. El aislamiento se puede llevar a cabo utilizando procedimientos estándar para aislar y opcionalmente purificar por descomposición las células o recogiendo el sobrenadante celular y aislando después los antígenos (por ejemplo por centrifugación o cromatografía).

10 En otras realizaciones, el virus se fragmenta o inactiva antes o después de la purificación (por ejemplo, de acuerdo con los métodos mostrados en el documento WO 05/11800). Adicionalmente se puede preparar una vacuna del virus. Una vacuna es una composición inmunógena de una sustancia antigénica, pudiendo consistir la sustancia antigénica en el virus no infeccioso, su vaina, partículas del mismo o sus antígenos. Cuando se administra una vacuna, se produce la inmunización en un huésped (por ejemplo un mamífero tal como un humano, o un ave). La vacunación puede provocar una reacción específica a la vacuna y cierta inflamación de poca importancia, pero
15 generalmente la respuesta a la vacunación es muy reducida en comparación con la respuesta a una infección causada por un virus completamente viable.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no están concebidos para limitar la invención en modo alguno.

Ejemplos

20 Muchas proteínas de membrana viral requieren una modificación postraducción para producir virus competentes para la replicación. En el virus de la gripe, el desdoblamiento proteolítico de la molécula precursora de hemaglutinina (HA) (HA0) en subunidades HA1 y HA2, que genera un dominio fusogénico en la región aminoterminal del HA2, es esencial para la entrada del virus en las células. Por ello, la iniciación del ciclo infeccioso en un cultivo celular debe estar catalizada mediante la adición de una proteasa. Para el proceso de producción de vacunas se utiliza tripsina
25 de origen porcino sometida a irradiación gamma.

El perfil de temperatura convencional para el desarrollo del virus de la gripe en cultivos celulares, como en células Vero, es tal que la temperatura es constante, por ejemplo de 33°C (para cepas B) a 37°C (para cepas A) [véase, por ejemplo, Govorkava EA y col., Journal of Virology, Vol. 70, Nr. 8, agosto de 1996, pp. 5519- 5524]. Un aspecto de esta invención consiste en el entendimiento, a través de experimentos a pequeña escala en sistemas de biorreactor de 10 l, de que unos perfiles de temperatura elevada durante la fase infecciosa inicial pueden tener un efecto
30 positivo en el tiempo de ciclo global de un proceso de producción del virus de la gripe. Además, se podría obtener un efecto positivo en la pureza de los antígenos, medida como la relación proteína Vero/SRD. Para demostrar este concepto se han llevado a cabo experimentos a una escala de 100 l, tal como se describe aquí.

Ejemplo 1: Producción de virus de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 a 32 y 36°C

35 Cultivos Vero en biorreactores operados a 32°C y 36°C se infectaron con el virus A/Nueva Caledonia/20/99. Los parámetros establecidos para el pH, pO₂, densidad celular y cantidad de tripsina añadida al cultivo eran comparables y reflejaban las condiciones a gran escala para la producción de antígeno de la gripe. En la Tabla 1 se compara el efecto de la temperatura elevada en el rendimiento del virus y el tiempo de ciclo.

40 **Tabla 1** Comparación de HA y tasa de absorción de oxígeno residual ("OUR residual") en comparación con el día 0 del ciclo infeccioso *)

Temp.	HA día 2 (2 ⁿ HAU/50 µl)	HA día 2 (2 ⁿ HAU/50 µl)	OUR res. (%)* día 2	OUR res. (%)* día 3
32°C	6	8	80	50
36°C	7	8	20	<5

Después de dos días se observó una tasa de absorción de oxígeno residual de un 20% en el caso del cultivo a 36°C, que cayó por debajo del 5% antes del día 3. La propagación del virus de la gripe a 36°C resultó en una alta infectividad y, en consecuencia, en una reducción del tiempo de cultivo total en comparación con las condiciones a
45 32°C. En cambio, el cultivo a 32°C resultó en mayores OUR residuales, de un 80% y un 50% los días 2 y 3, respectivamente. Los títulos HA finales eran comparables. Sin embargo, en experimentos de separación de antígenos mediante ultracentrifugación con gradiente de NaBr se produjo un cambio antigénico del diagrama de bandas bajo las condiciones de 36°C el tercer día de cultivo (Fig. 1B), mientras que el perfil de elución medido por un detector UV a 254 nm resultó en un pico de altura comparable, pero más simétrico, en el caso del cultivo a 32°C (Fig. 1A). Por tanto, las condiciones de 36°C pueden tener varias desventajas en términos de rendimiento de
50 producto y en especial de pureza.

En el proceso de producción actual se recoge el antígeno viral a partir de un gradiente de sacarosa. Así, para el experimento a 36°C se puede concluir que parte del antígeno se está desplazando a la fracción de baja densidad (Fig. 1B).

Ejemplo 2: Producción de virus de la gripe A/Panamá/2007/99 a 32, 33 y 34°C

5 Para investigar el efecto de una temperatura de cultivo elevada en el rendimiento y el tiempo de ciclo del virus de Panamá, tres sistemas de biorreactor de 10 l se operaron en paralelo con temperaturas ajustadas a 32°C, 33°C y 34°C, respectivamente. Todos los demás valores de ajuste de los parámetros eran comparables a los experimentos descritos en el Ejemplo 1.

10 En la Tabla 2 se muestra el tiempo de ciclo de proceso de los tres sistemas de biorreactor. Los cultivos finalizaron después de alcanzar una tasa de absorción de oxígeno residual del 20% (80% de reducción en el consumo de oxígeno metabólico), y se compararon las cinéticas del ciclo infeccioso. En el caso del experimento a 34°C se logró una reducción del tiempo de ciclo de 21 horas.

Tabla 2 Comparación del tiempo de proceso necesario para alcanzar un 20% de OUR residual (en comparación con el día 0 del ciclo infeccioso) en función de la temperatura de proceso

Temperatura	Tiempo de proceso para alcanzar un 20% de OUR residual (h)
32°C	90
33°C	79
34°C	69

15 Los sobrenadantes del cultivo se centrifugaron y se trataron con Benzonase y formalina de acuerdo con protocolos estándar. Las cosechas inactivadas (MVH) se purificaron por ultracentrifugación con gradiente de glucosa (véase la Tabla 3).

20 **Tabla 3** Comparación del rendimiento de antígeno del virus de la gripe A/Panamá/2007/99, relación SRD/proteína e impureza de proteína Vero obtenida a partir de virus purificados por gradiente de sacarosa de los experimentos de temperatura

Condiciones de producción	Rendimiento (mg SRD)	Relación SRD/proteína (mg/mg)	Relación proteína Vero/SRD (mg/mg)
32°C	13,8	0,79	0,25
33°C	12,2	0,70	0,38
34°C	12,4	0,67	0,45

25 De la Tabla 2 se puede concluir que las condiciones de temperatura elevada redujeron el tiempo de ciclo. No obstante, tal como muestra la Tabla 3, las condiciones de temperatura elevada (por ejemplo 33°C y 34°C) tuvieron un efecto negativo en el rendimiento global del antígeno viral y en la calidad del virus purificado, tal como demuestran tanto la relación SRD/proteína como la relación proteína Vero/SRD. Por consiguiente se observó una pureza reducida del antígeno del virus a temperaturas elevadas.

Ejemplo 3: Producción de virus de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 con amplificación precoz del virus a 35°C

30 Este ejemplo se refiere a experimentos de cultivo a una temperatura elevada ajustada durante las primeras 24 horas del proceso de producción del virus de la gripe. Cultivos de células Vero se infectaron con virus A/Nueva Caledonia/20/99 a la escala de 100 litros.

35 Se llevó a cabo una comparación del perfil de temperatura convencional (es decir, una temperatura de 32°C establecida a lo largo de todo el proceso de fermentación) y el proceso modificado con amplificación temprana del virus a 35°C. Este nuevo proceso se caracterizó mediante una replicación inicial del virus a 35°C durante 24 horas después de la infección (d.i.), seguida de una incubación a 32°C hasta 91 horas d.i. La Tabla 4 muestra una comparación de la pureza del antígeno de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (relación SRD/proteína) y la impureza de proteína Vero del virus purificado por gradiente de sacarosa de los procesos a escala de 100 litros.

Tabla 4 Comparación de la pureza del antígeno de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (relación SRD/proteína) y la impureza de proteína Vero en función de diferentes perfiles de temperatura. El virus se purificó a partir de experimentos de temperatura utilizando un gradiente de sacarosa.

Condiciones de producción	Rendimiento (mg SRD/l cosecha)	Relación SRD/ proteína (mg/mg)	Relación proteína Vero/SRD (mg/mg)
32°C hasta 95 h d.i.	1,4	0,24	0,59
35°C hasta 24 h d.i. 32°C hasta 91 h d.i.	1,3	0,32	0,29

- 5 Estos datos demostraron claramente que una temperatura ajustada a 35°C durante las primeras 24 horas del proceso de fermentación tuvo un efecto positivo no sólo en la relación SRD/proteína, sino también en la impureza de la proteína Vero. Con tiempos de infección comparables se pudieron obtener rendimientos comparables con un perfil de impureza considerablemente mejor.

Ejemplo 4: Producción del virus de la gripe A/Panamá/2007/99 con amplificación precoz del virus a 35°C

- 10 Con el fin de confirmar el comportamiento observado en el Ejemplo 3, para el proceso de dos temperaturas se utilizaron los mismos perfiles de temperatura para propagar el virus de la gripe A/Panamá/2007/99 en cultivos Vero de 100 litros. Todos los demás parámetros y condiciones establecidos de acuerdo con el Ejemplo 3.

En la Tabla 5 se comparan la pureza de antígeno de gripe A/Panamá/2007/99 (relación SRD/proteína) y la impureza de proteína Vero del virus purificado por gradiente de sacarosa en los procedimientos a escala de 100 litros.

- 15 **Tabla 5** Comparación de la pureza de antígeno de gripe A/Panamá/2007/99 (relación SRD/proteína) y la impureza de proteína Vero. El virus se purificó a partir de experimentos de temperatura utilizando un gradiente de sacarosa.

Condiciones de producción	Rendimiento (mg SRD/l cosecha)	Relación SRD/ proteína (mg/mg)	Relación proteína Vero/SRD (mg/mg)
32°C hasta 88 h d.i.	2,3	0,31	0,84
35°C hasta 24 h d.i. 32°C hasta 67 h d.i.	1,9	0,45	0,11

- 20 La producción de virus de la gripe A/Panamá/2007/99 a 35°C durante las primeras 24 horas de replicación del virus y la disminución subsiguiente de la temperatura a 32°C tiene varias ventajas con respecto al procesamiento actual a una temperatura constante de 32°C. En general es posible aumentar la calidad del antígeno del virus de la gripe, tal como demuestran las relaciones SRD/proteína y proteína Vero/SRD. Con un tiempo de infección considerablemente menor, los rendimientos fueron ligeramente más bajos, pero el perfil de impurezas es considerablemente mejor, en especial en lo que respecta a la cantidad relativa de proteína de células Vero.

- 25 La pureza del antígeno del virus de la gripe es un factor para la producción de vacunas de la gripe. En general está aceptado que las condiciones proteolíticas para el desdoblamiento del precursor hemaglutinina y las condiciones de temperatura apropiadas son algunos de los factores importantes para la replicación del virus de la gripe en células Vero. En los ejemplos de experimentos aquí presentados se demostró que un perfil de temperatura con una temperatura elevada durante la fase temprana de la replicación del virus resultaba en un antígeno mejorado en el paso de gradiente de sacarosa. Además, la producción del virus de la gripe a 35°C durante las primeras 24 horas
30 corresponde a un mejor rendimiento del proceso con respecto al tiempo de ciclo. Como sistemas modelo para demostrar la utilidad de la propagación del virus a dos temperaturas se utilizaron gripe A/Panamá/2007/99 y A/Nueva Caledonia/20/99. Así, los resultados de los experimentos de cultivo realizados a escala de 10 y 100 litros indican las ventajas de cambiar de 32°C a 35°C durante aproximadamente las primeras 24 horas del proceso de propagación del virus.

- 35 **Ejemplo 5: Producción del virus de la gripe A/Hiroshima/52/2005 con amplificación temprana del virus a 35°C durante 18 horas d.i. frente a 36 horas d.i. seguido de 32°C hasta el final de la propagación del virus**

- 40 Este ejemplo muestra el efecto de la variación de la duración del ciclo de alta temperatura en el rendimiento de antígeno, la relación SRD/proteína y la relación proteína Vero/SRD para cultivos Vero de 50 litros infectados con el virus de la gripe A/Hiroshima/52/2005. En dos muestras independientes se mantuvo una temperatura de 35°C durante 18 horas d.i. y 36 horas d.i., respectivamente, antes de reducir la temperatura a 32°C. Los sobrenadantes con contenido en virus se recogieron, se inactivaron y se purificaron por ultracentrifugación.

En la Tabla 6 se comparan la pureza de antígeno de gripe A/Hiroshima/52/2005 (relación SRD/proteína) y la impureza de proteína Vero del virus purificado por gradiente de sacarosa de los procesos a escala de 50 litros.

Tabla 6 Comparación del rendimiento de antígeno de gripe A/Hiroshima/52/2005, pureza (relación SRD/proteína) e impureza de proteína Vero. El virus se purificó a partir de experimentos de temperatura utilizando un gradiente de sacarosa.

Condiciones de producción	Rendimiento (mg SRD/l cosecha)	Relación SRD/ proteína (mg/mg)	Relación proteína Vero/SRD (mg/mg)
35°C durante 18 h d.i. / 32°C hasta el final (58 h d.i.)	3,7	1,16	0,02
35°C durante 36 h d.i. / 32°C hasta el final (58 h d.i.)	4,8	1,12	0,02

5 La producción del virus de la gripe A/Hiroshima/52/2005 a 35°C durante 18 horas y 36 horas d.i. respectivamente resultó en rendimientos y perfiles de pureza comparables (Tabla 6). A partir de estos resultados se puede concluir que la duración del aumento de temperatura durante la propagación temprana del virus y la duración de la temperatura reducida hasta la cosecha se puede variar ampliamente en un perfil de temperatura doble.

10 **Ejemplo 6: Producción del virus de la gripe B/Malasia/2506/2004 con diferentes temperaturas (34°C, 35°C y 36°C) para amplificación temprana del virus durante 18 horas d.i. seguida de una reducción de 3°C (a 31°C, 32°C y 33°C) hasta el final de la propagación del virus**

15 Este ejemplo se refiere al uso de diferentes perfiles de temperatura doble durante la propagación del virus en cultivos Vero de 32 litros a 80 litros infectados con el virus de la gripe B/Malasia/2506/2004. Las temperaturas elevadas de 34°C, 35°C y 36°C se mantuvieron durante 18 horas d.i. antes de reducirlas 3°C, respectivamente a 31°C, 32°C y 33°C. Los sobrenadantes con contenido viral se recogieron, se inactivaron y se purificaron por ultracentrifugación.

En la Tabla 7 se comparan el rendimiento de antígeno de gripe B/Malasia/2506/2004, la pureza (relación SRD/proteína) y la impureza de proteína Vero del virus purificado por gradiente de sacarosa de los procesos a escala de 32 litros a 80 litros para los diferentes perfiles de temperatura.

20 **Tabla 7** Comparación del rendimiento de antígeno de gripe B/Malasia/2506/2004, pureza (relación SRD/proteína) e impureza de proteína Vero. El virus se purificó de los experimentos de temperatura utilizando un gradiente de sacarosa.

Condiciones de producción	Rendimiento (mg SRD/l cosecha)	Relación SRD/ proteína (mg/mg)	Relación proteína Vero/SRD (mg/mg)
36°C durante 18 h d.i. / 33°C hasta el final (69 h d.i.) (biorreactor de 32 l)	7,3	0,31	0,06
35°C durante 18 h d.i. / 32°C hasta el final (70 h d.i.) (biorreactor de 80 l)	8,0	0,39	0,05
34°C durante 18 h d.i. / 31°C hasta el final (70 h d.i.) (biorreactor de 32 l)	7,3	0,36	0,04

25 La producción del virus de la gripe B/Malasia/2506/2004 a una temperatura de 34°C a 36°C durante 18 horas d.i. seguida de una reducción de 3°C hasta el final de la propagación del virus resultó en rendimientos y perfiles de pureza comparables (Tabla 7). A partir de estos resultados se puede concluir que el intervalo de temperatura elevada durante la propagación temprana del virus y el intervalo de temperatura reducida hasta el momento de la cosecha se pueden variar ampliamente en un perfil de temperatura doble.

30 **Ejemplo 7: Producción del virus de la gripe A/Islas Salomón/3/2006 con diferentes temperaturas (33,5°C, 35°C y 36,5°C) para amplificación temprana del virus durante 18 horas d.i. seguida de una reducción de 3°C (a 30,5°C, 32°C y 33,5°C) hasta el final de la propagación del virus**

35 Este ejemplo se refiere al uso de diferentes perfiles de temperatura durante la propagación del virus en cultivos Vero de 32 litros a 50 litros infectados con el virus de la gripe A/Islas Salomón/3/2006. Las temperaturas elevadas de 33,5°C, 35°C y 36,5°C se mantuvieron durante 18 horas d.i. antes de reducirlas 3°C, respectivamente a 30,5°C, 32°C y 33,5°C. Los sobrenadantes con contenido viral se recogieron, se inactivaron y se purificaron por ultracentrifugación.

En la Tabla 8 se comparan el rendimiento de antígeno de gripe A/Islas Salomón/3/2006, la pureza (relación SRD/proteína) y la impureza de proteína Vero del virus purificado por gradiente de sacarosa de los procesos a escala de 32 litros a 50 litros.

Tabla 8 Comparación del rendimiento de antígeno de gripe A/Islas Salomón/3/ 2006, pureza (relación SRD/proteína) e impureza de proteína Vero. El virus se purificó de experimentos de temperatura utilizando un gradiente de sacarosa.

Condiciones de producción	Rendimiento (mg SRD/l cosecha)	Relación SRD/ proteína (mg/mg)	Relación proteína Vero/SRD (mg/mg)
36,5°C durante 18 h d.i. / 33,5°C hasta el final (54 h d.i.) (biorreactor de 32 l)	4,0	0,53	0,05
35°C durante 18 h d.i. / 32°C hasta el final (55 h d.i.) (biorreactor de 50 l)	3,2	0,72	0,03
33,5°C durante 18 h d.i. / 30,5°C hasta el final (69 h d.i.) (biorreactor de 50 l)	3,0	0,74	0,02

5 La producción del virus de la gripe A/Islas Salomón/3/2006 a 33,5°C, 35°C y 36,5°C durante 18 horas d.i. seguida de una reducción de 3°C, respectivamente, hasta el final de la propagación del virus resultó en rendimientos y perfiles de pureza comparables (Tabla 8). Los altos rendimientos a temperaturas elevadas también resultaron en una reducción de la pureza, sin embargo estas impurezas permanecen en niveles relativamente bajos con la reducción de 3°C al final de la propagación del virus. Con perfiles de temperatura dobles que incluyen temperaturas reducidas (por ejemplo 33,5°C/30,5°C) se pueden lograr rendimientos comparables, pero para alcanzar estos rendimientos comparables se requieren tiempos de ciclo de propagación del virus más largos (que siguen siendo inferiores a 70 horas). Los perfiles de pureza, en especial en lo que respecta a la proteína Vero específica de la célula huésped, se mejoran normalmente con el intervalo de temperatura inferior que incluye un cambio de temperatura de 3°C (véase también la Tabla 7 con B/Malasia a 34°C/31°C). A partir de estos resultados se puede concluir que, para las cepas de la gripe A y la gripe B, el intervalo de temperatura elevada durante la propagación temprana del virus y el intervalo de temperatura reducida hasta el momento de la cosecha pueden variar ampliamente en un perfil de temperatura doble.

Ejemplo 8: Producción del virus del río Ross

20 El virus del río Ross ("VRR") se produjo en reactores de 2 litros a diferentes temperaturas. Las temperaturas investigadas fueron de 37°C, 35°C, 32°C y 35°C durante 30 horas y 32°C después de 30 horas hasta el final de la infección después de 90 horas d.i. Se determinaron los parámetros cinéticos y se recogieron muestras en los siguientes intervalos de tiempo (en horas): I-18, I-42, I-42, I-54, I-66, I-76 e I-90. Las muestras para análisis NaBr se trataron con 20 µl/ml de formalina 1,85% y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Durante la propagación del virus se midieron las tasas de absorción de oxígeno residual (*Oxygen Uptake Rates* - OUR) para vigilar la actividad metabólica de las células infectadas. Las tasas de separación de células se cuantificaron mediante imágenes microscópicas de los cultivos en microportadores. También se determinó la TCID50 (50% *Tissue Culture Infective Dose* - dosis infecciosa de cultivo celular 50%).

30 Las condiciones fueron pH 7,1 PBS y 20% pO₂, 1,0 g/l de glucosa antes de la infección. En I-18 se añadió 1,0 g/l de glucosa y se interrumpió la perfusión. Después de I-42 se añadió glucosa si ésta había disminuido por debajo de 1,0 g/l. La Tabla 9 muestra los resultados.

Condiciones de centrifugación: I-18: 5.000 g
 I-42 - I-66: 10.000 g
 I-78 - I-90: 15.000 g

35 **Tabla 9**

RRV 37°C	Glucosa [g/l]	HA [HAU/56µl]	TCID50 [log/ml]	OD 254 [nm]	OD 610 [nm]	Separación celular [%]	OUR residual [%]	Altura de pico [amplitud 1/10]
I-18	2,20	5	6,68E07			11,2		
I-42	1,65	8	1,46E09			100		
I-53	1,38	7	1,20E09	6,273	0,0158	100	50 (± 10%)	6,5
I-66	1,21	8	1,95E09	5,993	0,0113	100	15 (± 5%)	4,5
I-76	1,27	7	4,12E07	5,597	0,0260	100	2	5
I-90	1,25	7	6,68E06	5,811	0,0136	100	0	7

RRV 35°C	Glucosa [g/l]	HA [HAU/56µl]	TCID50 [log/ml]	OD 254 [nm]	OD 610 [nm]	Separación celular [%]	OUR residual [%]	Altura de pico [amplitud 1/10]
I-18	2,38	4	1,46E08			18		
I-42	1,90	7	1,95E09			100		
I-53	1,95	6	4,37E08	5,894	0,0125	100	55 (± 10%)	5,5
I-66	1,63	7	1,46E08	7,187	0,0131	100	30 (± 5%)	4
I-76	1,72	7	1,10E08	5,942	0,0198	100	6	5
I-90	1,71	7	1,62E07	6,570	0,0160	100	0	2
RRV 32°C	Glucosa [g/l]	HA [HAU/56µl]	TCID50 [log/ml]	OD 254 [nm]	OD 610 [nm]	Separación celular [%]	OUR residual [%]	Altura de pico [amplitud 1/10]
I-18	2,55	2	1,20E07			2		
I-42	2,35	8	3,12E09			14		
I-53	1,81	7	5,18E09	5,777	0,0118	49	75 (± 10%)	7
I-66	1,43	8	2,68E09	5,601	0,0107	100	50 (± 5%)	3,5
I-76	1,28	7	1,10E09	6,230	0,0173	100	20	7,5
I-90	1,13	6	6,68E08	5,042	0,0139	100	6	7
RRV 35/32°C	Glucosa [g/l]	HA [HAU/56µl]	TCID50 [log/ml]	OD 254 [nm]	OD 610 [nm]	Separación celular [%]	OUR residual [%]	Altura de pico [amplitud 1/10]
I-18	2,42	5	8,86E07			7		
I-42	2,32	8	3,08E09			25		
I-53	1,89	8	4,37E09	5,540	0,0138	97	60 (± 10%)	8
I-66	1,68	8	4,12E09	5,991	0,0109	100	50 (± 5%)	5,5
I-76	1,51	8	2,67E09	6,513	0,0212	100	25	8
I-90	1,41	6	8,86E07	5,453	0,0622	100	5	7

Las Figuras 2 a 5 muestran el diagrama NaBr de las cuatro incubaciones en 4 intervalos (A: 54 h, B: 66 h, C: 78 h, D: 90 h).

- 5 Se llevaron a cabo de Western blot con los siguientes anticuerpos: (1) RR (ATCCV373), líquido ascítico hiperinmune, ratón; N.I.H. (1:1.000), y (2) IgG antirratón, Sigma, nº cat.: A- 4656, nº lote: 63H8830 (1:5.000). Los resultados se muestran en la Figura 6 de acuerdo con la Tabla 10.

Tabla 10

Vía	Sonda	Volumen [µl]
1	Marcador	10
2	Control positivo VRR	20
3	VRR 37°C I-54	20
4	VRR 37°C I-66	20
5	VRR 37°C I-78	20
6	VRR 35°C/32°C I-54	20
7	VRR 35°C/32°C I-66	20
8	VRR 35°C/32°C I-78	20
9	VRR 35°C/32°C I-90	20
10	Control negativo (pella)	20

- 10 En las dos inoculaciones a alta temperatura (37°C y 35°C), las cinéticas de infección aumentaron considerablemente con una separación celular de un 100% después de 42 horas y aproximadamente un 50% de O₂ residual después de 53 horas. Los procedimientos a menor temperatura (32°C y 35°C/32°C) eran comparativamente más lentos. Esto es también evidente en el análisis del título en I-18. Sin embargo, después de I-42 todos los procedimientos alcanzaron aproximadamente 1E09 TCID50/ml. Los procedimientos con una temperatura más baja mostraron un título más estable (> 1E09 TCID50/ml hasta I-76) cerca del final de la infección. Hasta I-76 en los dos procedimientos se pudo medir una OUR del 20%. En todos los experimentos después de I-53 se alcanzó la altura de pico máximo en el gradiente NaBr, mientras que en todas las muestras de I-66 e I-90 se midió un pico más bajo en la inoculación a 35°C. Debido al aumento de temperatura, los niveles de glucosa cayeron más rápido durante los experimentos a 37°C y 35°C. Después no se puede determinar ninguna actividad metabólica debido a la mayor cinética de infección. En todos los experimentos los niveles de glucosa eran similares al final.

Únicamente durante el experimento de temperatura de dos fases (35°C hasta I-30, después 32°C) se estableció una rápida propagación del virus al comienzo y un título estable hasta el final de la infección. Bajo estas condiciones se midieron los picos más altos en el experimento de gradiente NaBr, que son estables hasta I-78. Además, en el Western blot se detectaron bandas más estables para el experimento de 35°C/32°C.

5 **Ejemplo 9: Experimentos con el virus del Nilo occidental**

10 El virus del Nilo occidental se produjo en reactores de 2 litros a diferentes temperaturas. Las temperaturas investigadas fueron de 35°C, 32°C y 35°C durante 30 horas y 32°C después de 30 horas hasta el final de la infección. Se determinaron los parámetros cinéticos durante 90 horas. Se recogieron muestras en los siguientes intervalos de tiempo (en horas): I-18, I-30, I-42, I-42, I-52, I-66, I-74 e I-90. Las muestras para el análisis NaBr se trataron con 20 µl/ml de formalina 1,85% y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Las condiciones fueron pH 7,1, 20% pO₂ y 1,0 g/l de glucosa antes de la infección. En I-18 se añadió 1,0 g/l de glucosa y se interrumpió la perfusión. Los resultados se indican en la Tabla 11 y las Figuras 7-9 muestran diagramas NaBr e imágenes microscópicas. Las tasas de separación de células se cuantificaron mediante imágenes microscópicas de los cultivos en microportadores.

15

Tabla 11

WN 35,0°C	Glucosa [g/l]	TCID50 [log/ml]	Formalina residual [µg/ml]	Separación de células [%]
I-18	2,18	8,86E+07		14,9
I-30	2,75	1,46E+09	116	12,9
I-42	0,94	1,20E+10	137	32,9
I-52	0,21	6,68E+09	119	80,6
I-66	0,24	8,86E+09	127	98,4
I-74	0,00	3,12E+09	125	100,0
I-90	0,11	6,68E+06	130	100,0
WN 32°C	Glucosa [g/l]	TCID50 [log/ml]	Formalina residual [µg/ml]	Separación de células [%]
I-18	2,37	5,16E+06		17,9
I-30	3,37	1,62E+08	127	9,9
I-42	2,34	5,18E+09	136	21,9
I-52	1,43	4,12E+09	117	26,9
I-66	0,22	8,86E+09		81,6
I-74	0,00	1,20E+10	116	92,9
I-90	0,37	6,38E+09	135	100,0
WN 35,0°C/ 32°C	Glucosa [g/l]	TCID50 [log/ml]	Formalina residual [µg/ml]	Separación de células [%]
I-18	2,12	5,18E+06		20,5
I-30	2,80	1,95E+09	118	13,9
I-42	1,56	1,10E+10	141	18,9
I-52	0,55	8,86E+09	118	35,0
I-66	0,00	8,86E+09	127	94,9
I-74	0,00	6,68E+09		100,0
I-90	0,19	1,46E+08		100,0

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un virus, comprendiendo el método:
 - proporcionar una célula huésped infectada por el virus,
 - 5 cultivar la célula huésped infectada a una primera temperatura entre 31°C y 37°C durante 1 a 48 horas,
 - cultivar a continuación la célula huésped infectada a una segunda temperatura que es de 1°C a 6°C inferior a la primera temperatura, y
 - recoger copias del virus producido mediante los pasos de cultivo,
 - consistiendo dicho virus en un ortomixovirus, alfavirus o flavivirus,
 - 10 llevándose a cabo el método a escala industrial en más de 50 litros de cultivo celular y teniendo el método un efecto positivo en la pureza del antígeno en comparación con el mismo método llevado a cabo a temperatura constante.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho virus es un virus de la gripe.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho virus se selecciona de entre el virus de la gripe A y B.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho virus es el virus del río Ross.
5. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho virus es el virus del Nilo occidental.
6. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha célula huésped es de un cultivo celular o línea celular animal.
- 20 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha célula huésped es una célula epitelial.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque dicha célula huésped es una célula epitelial renal.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque dicha célula huésped es una célula Vero.
10. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha primera temperatura oscila entre 32°C y 37°C.
- 25 11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicha primera temperatura oscila entre 33°C y 36°C.
12. Método según la reivindicación 11, caracterizado porque dicha primera temperatura oscila entre 34°C y 35,5°C.
13. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha segunda temperatura es de 1,5°C a 5°C inferior a dicha primera temperatura.
- 30 14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque dicha segunda temperatura es de 2°C a 4°C inferior a dicha primera temperatura.
15. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha segunda temperatura oscila entre 29°C y 35°C.
- 35 16. Método según la reivindicación 15, caracterizado porque dicha segunda temperatura oscila entre 30°C y 34°C.
17. Método según la reivindicación 16, caracterizado porque dicha segunda temperatura oscila entre 31°C y 33°C.
18. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha célula huésped se cultiva directamente después de la inoculación.
- 40 19. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el virus producido se aísla.
20. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho virus se fragmenta.

- 5
21. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho virus se inactiva.
 22. Método según la reivindicación 1, que adicionalmente comprende el paso de preparar una vacuna de dicho virus.
 23. Método según la reivindicación 1, en el que dicho cultivo a una primera temperatura se lleva a cabo durante al menos dos horas.

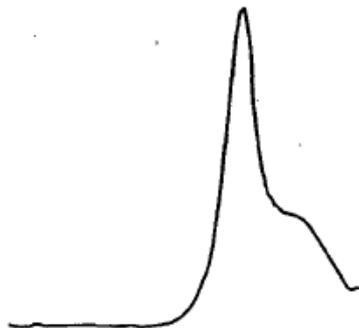
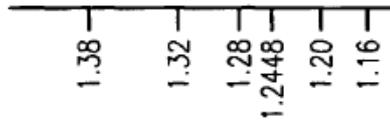


FIG. 1A

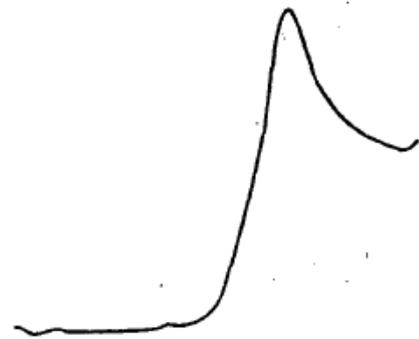
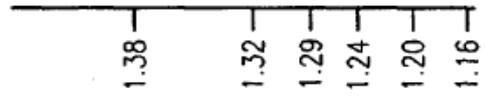


FIG. 1B

RRV 37°C I-54

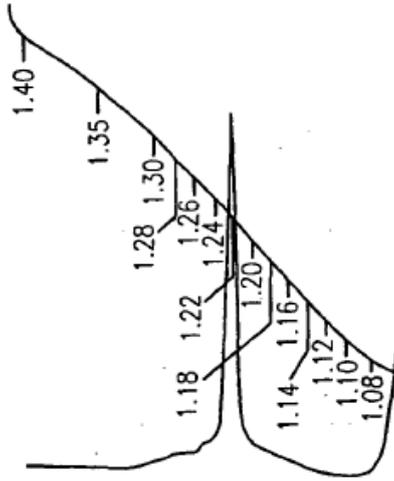


FIG. 2A

RRV 37°C I-66

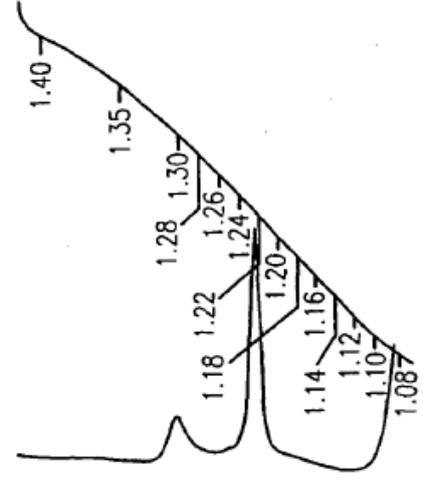


FIG. 2B

RRV 37°C I-78

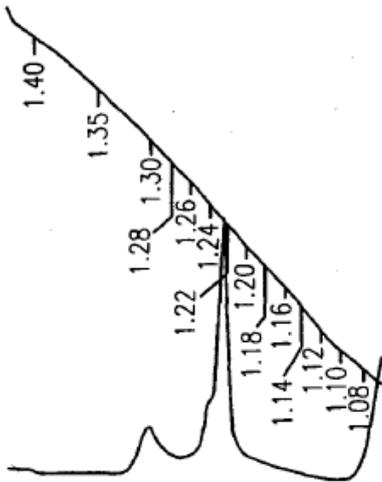


FIG. 2C

RRV 37°C I-90

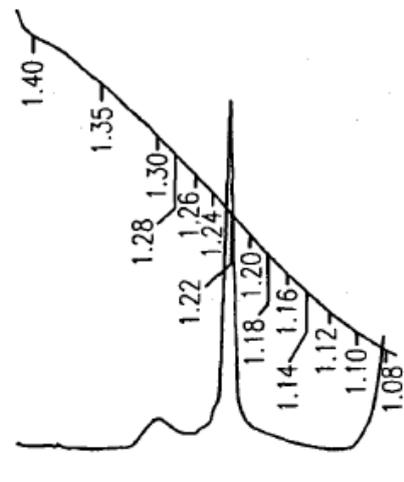


FIG. 2D

RRV 35°C I-54

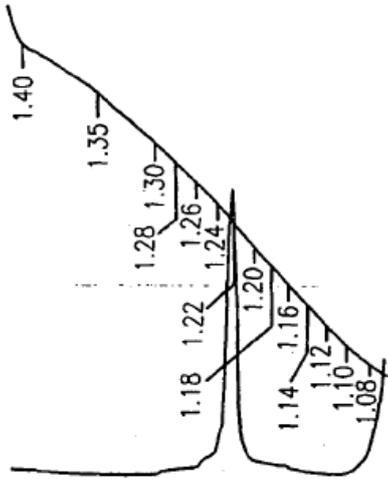


FIG. 3A

RRV 35°C I-66

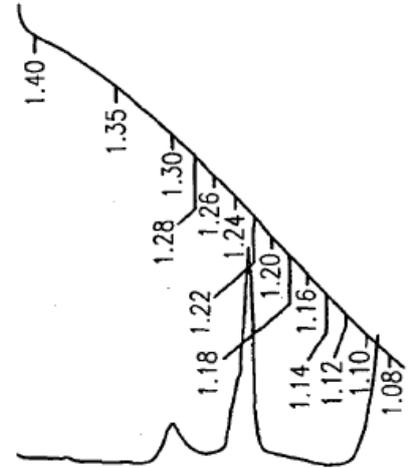


FIG. 3B

RRV 35°C I-78

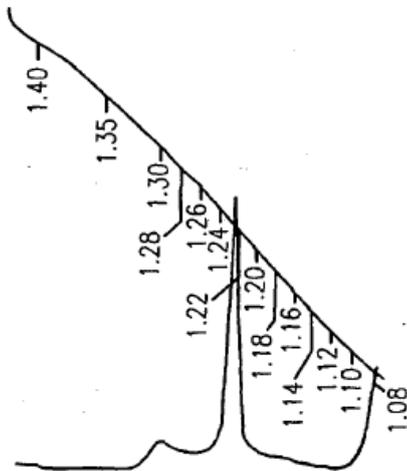


FIG. 3C

RRV 35°C I-90



FIG. 3D

RRV 32°C I-54

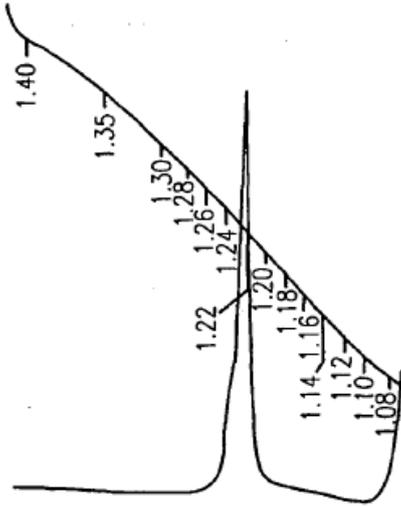


FIG. 4A

RRV 32°C I-66

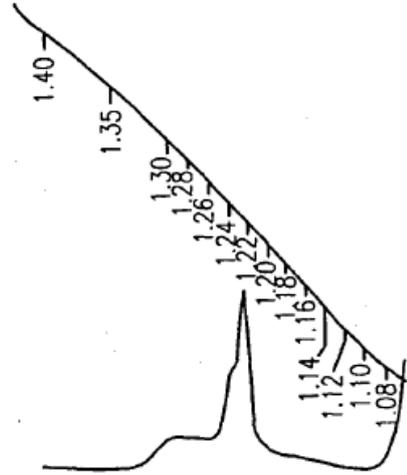


FIG. 4B

RRV 32°C I-78

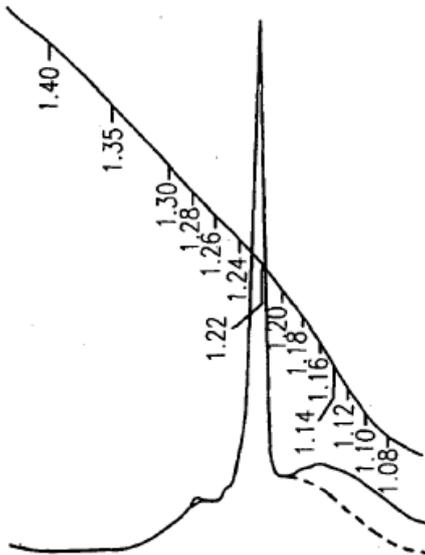


FIG. 4C

RRV 32°C I-90

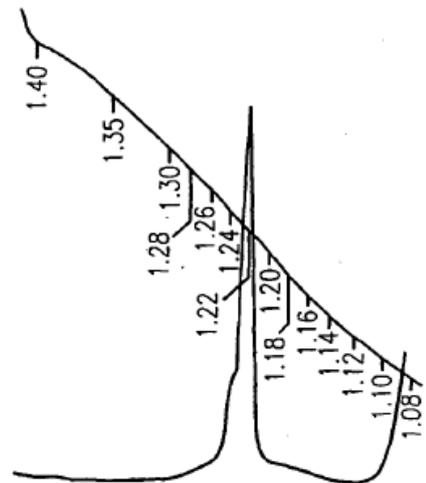


FIG. 4D

RRV 35°C/32°C I-54

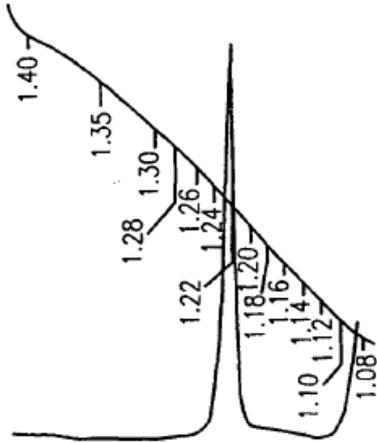


FIG. 5A

RRV 35°C/32°C I-66

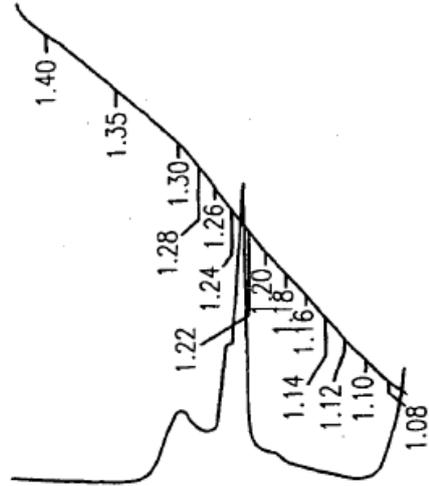


FIG. 5B

RRV 35°C/32°C I-78

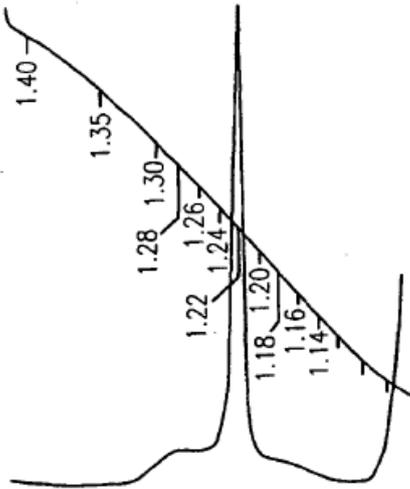


FIG. 5C

RRV 35°C/32°C I-90

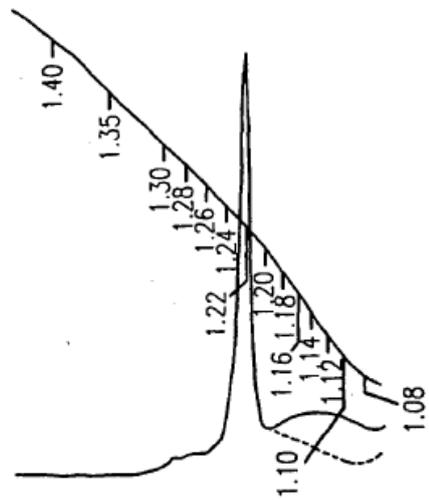


FIG. 5D

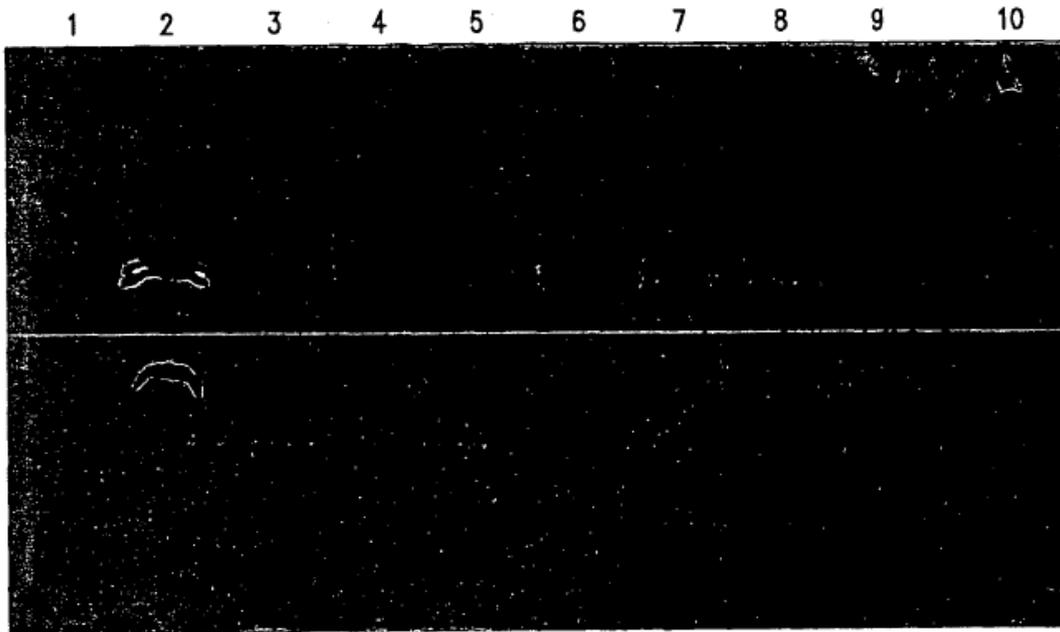


FIG. 6

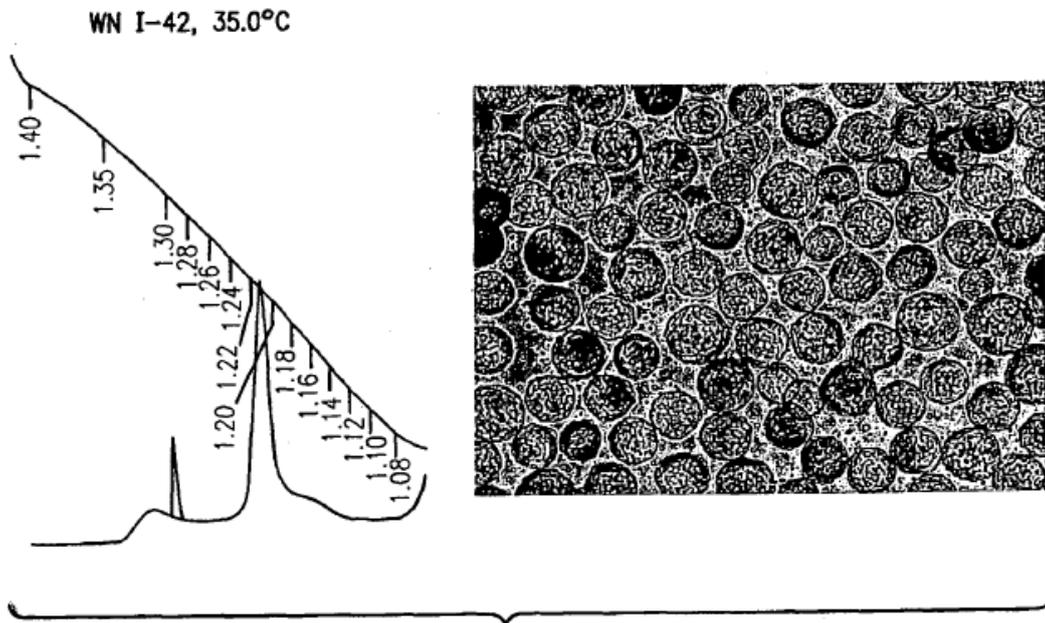


FIG. 7A

WN I-52, 35.0°C

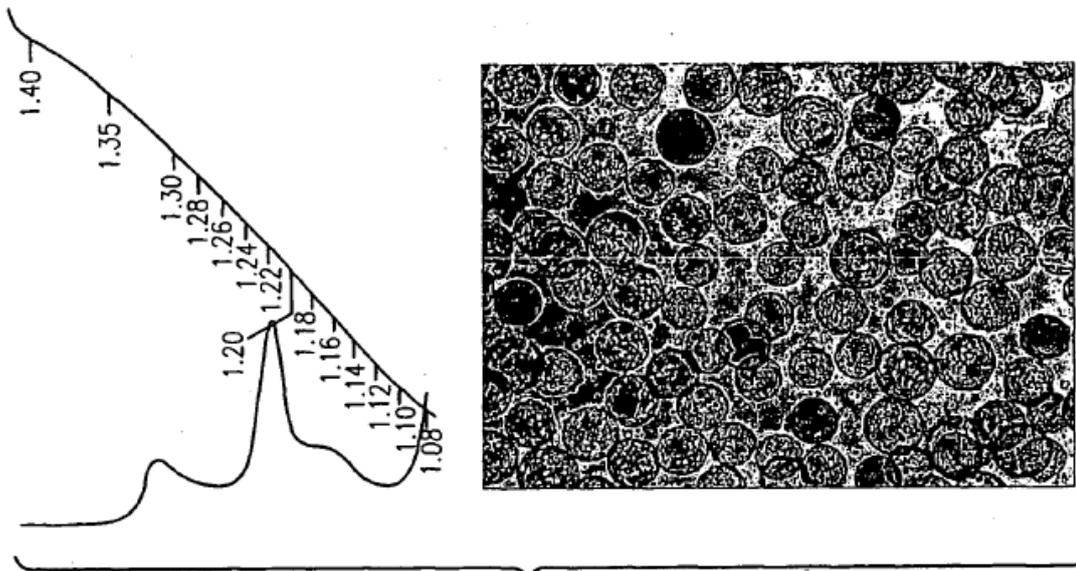


FIG. 7B

WN I-66, 35.0°C

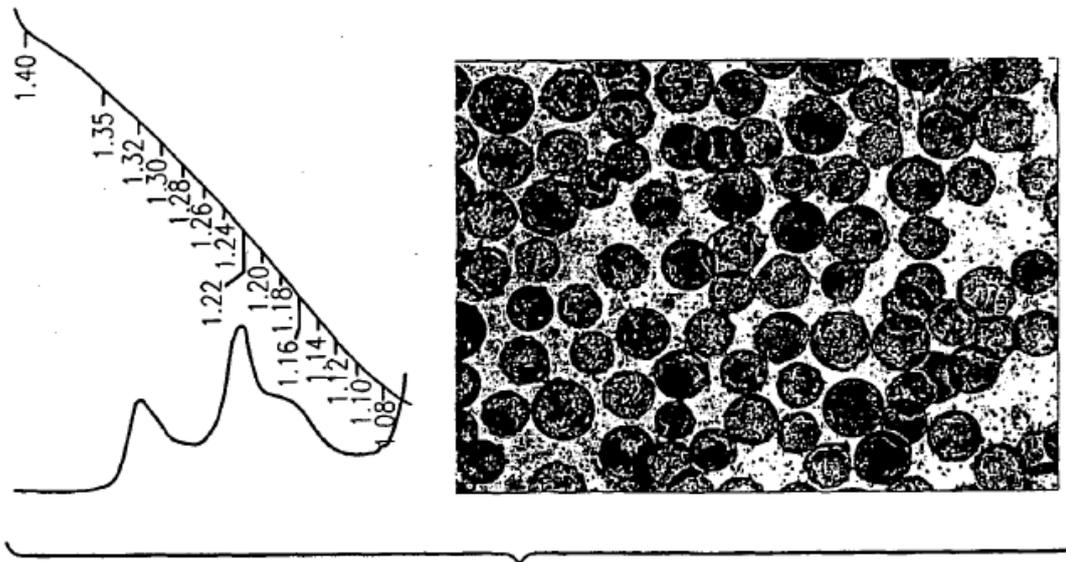


FIG. 7C

WN I-74, 35.0°C

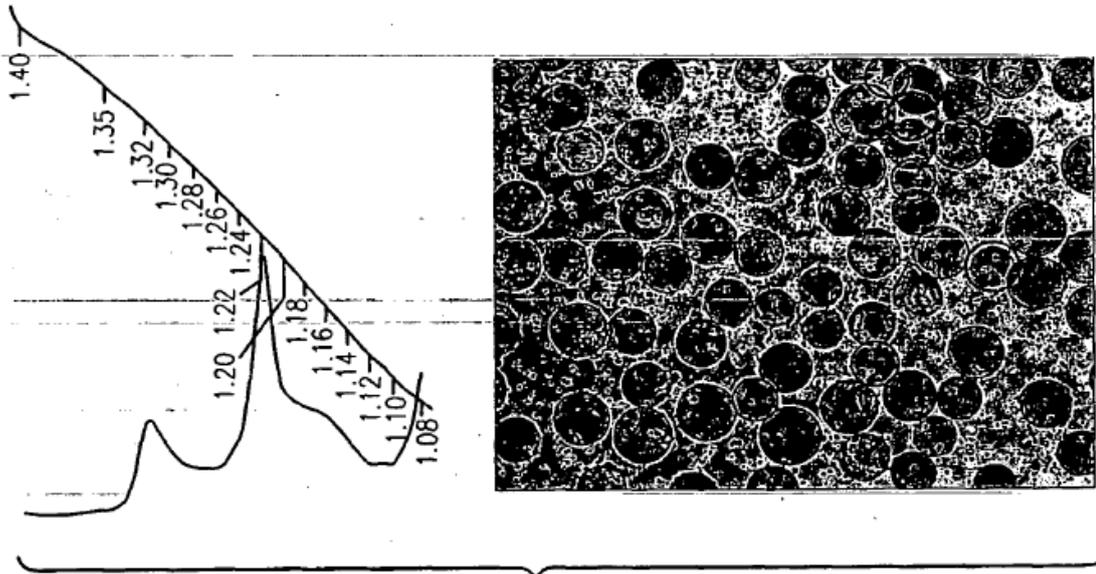


FIG. 7D

WN I-42, 32.0°C

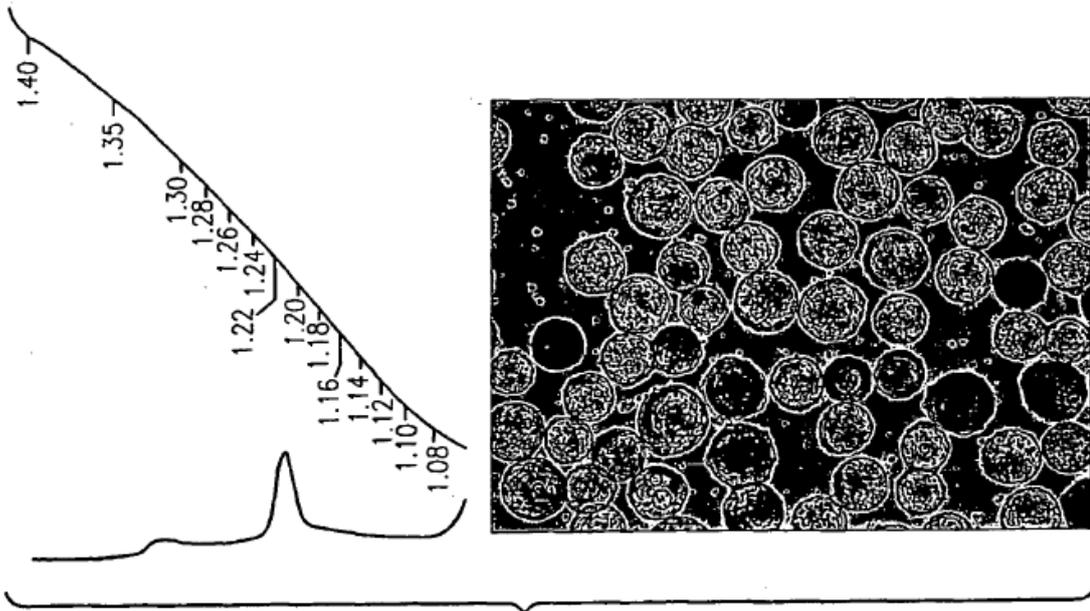


FIG. 8A

- WN I-52, 32.0°C

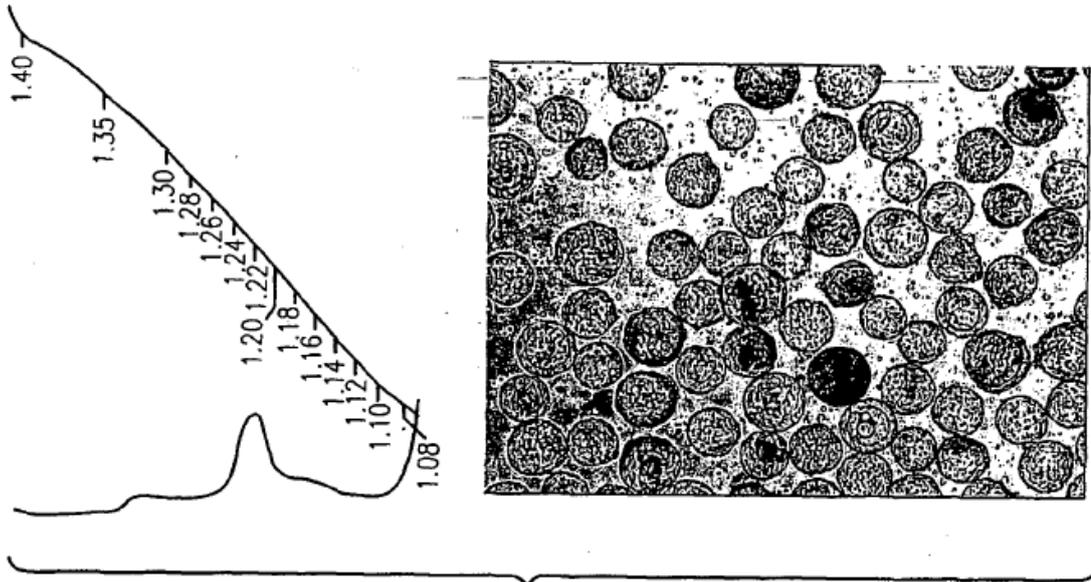


FIG. 8B

WN I-66, 32.0°C

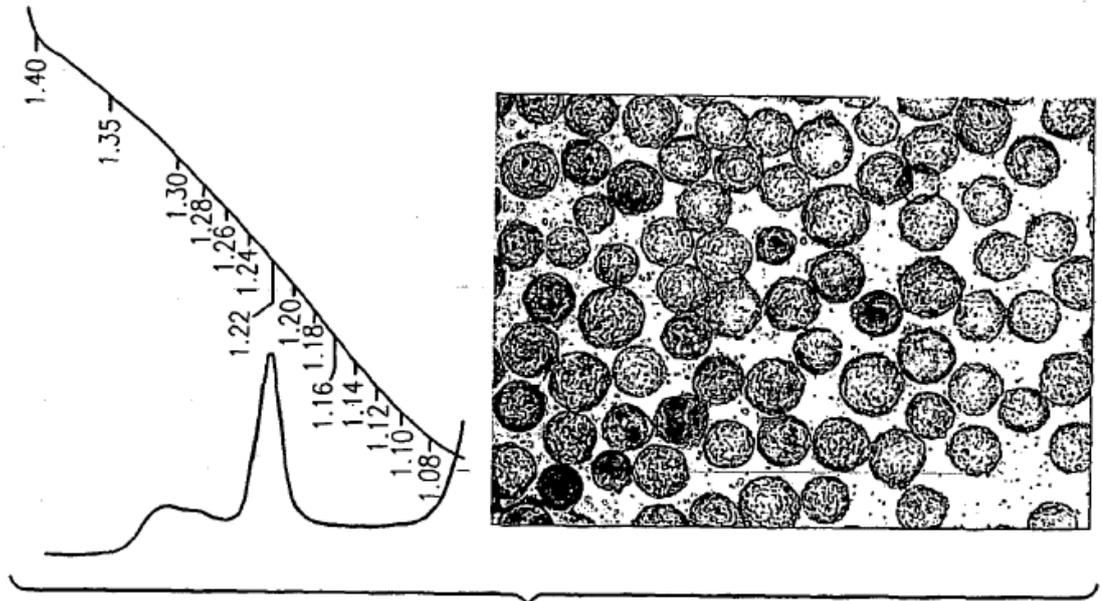


FIG. 8C

WN I-74, 32.0°C

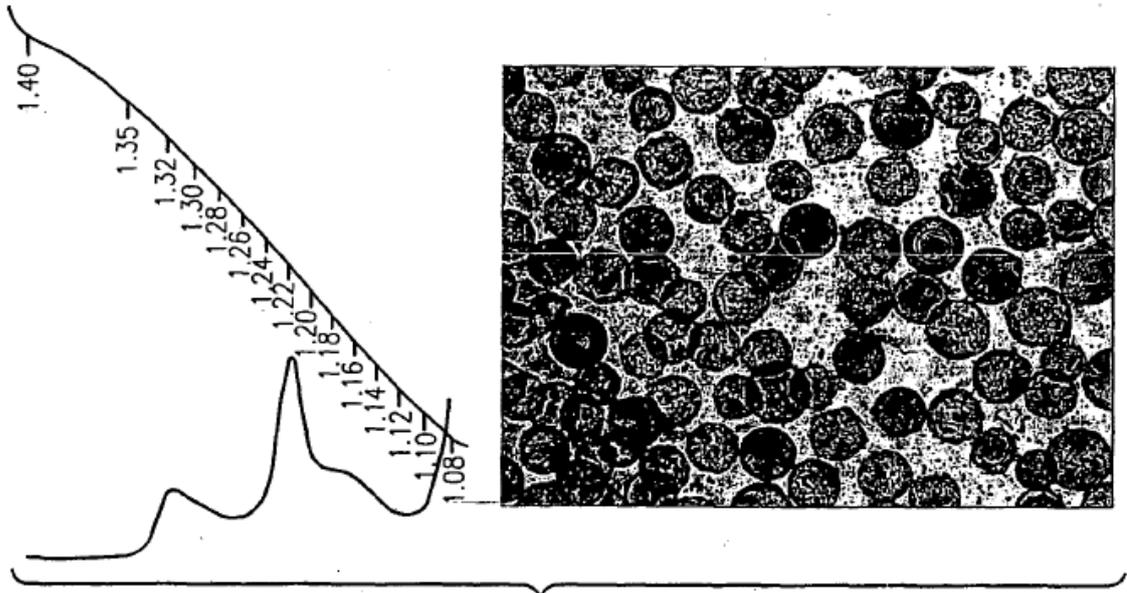


FIG. 8D

WN I-42, 35.0°C/32.0°C

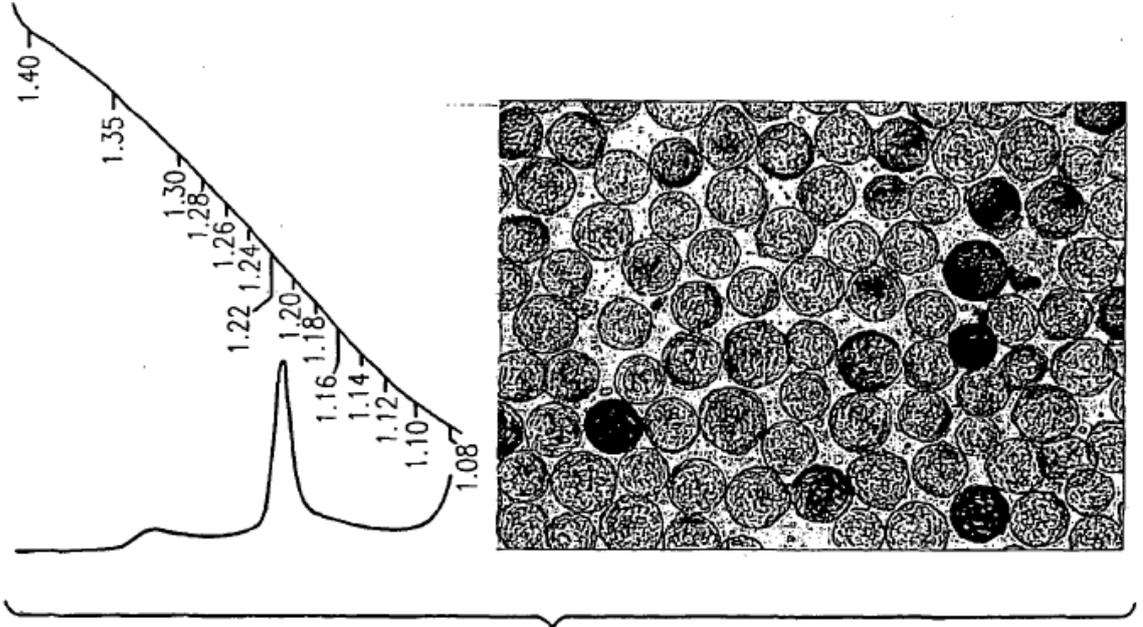


FIG. 9A

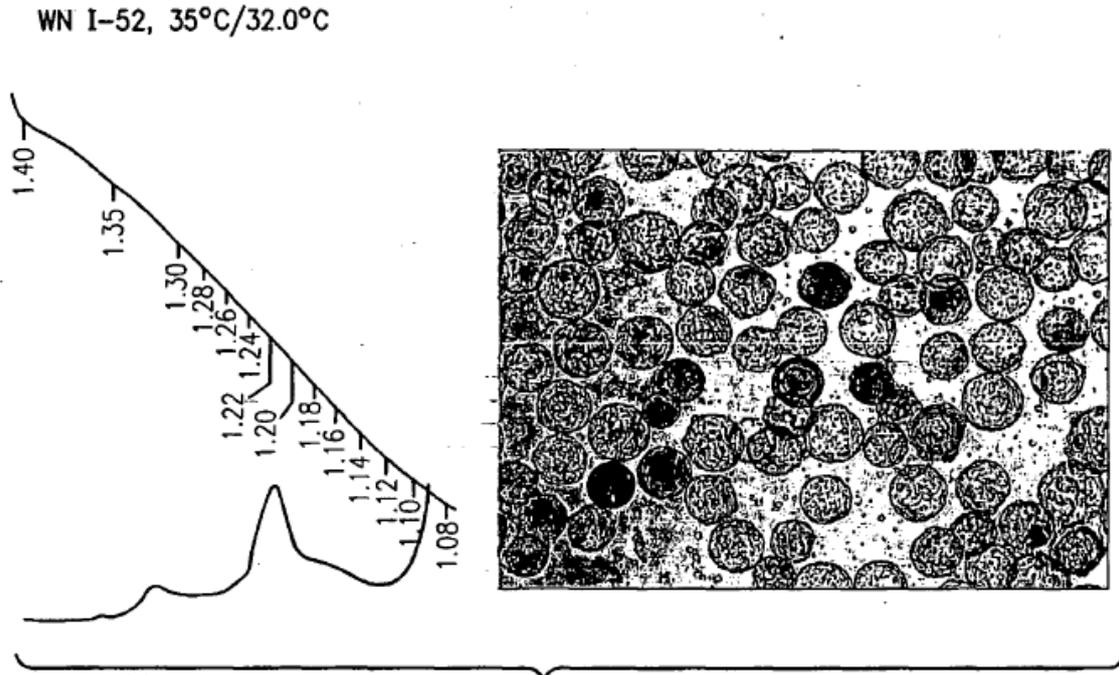


FIG. 9B

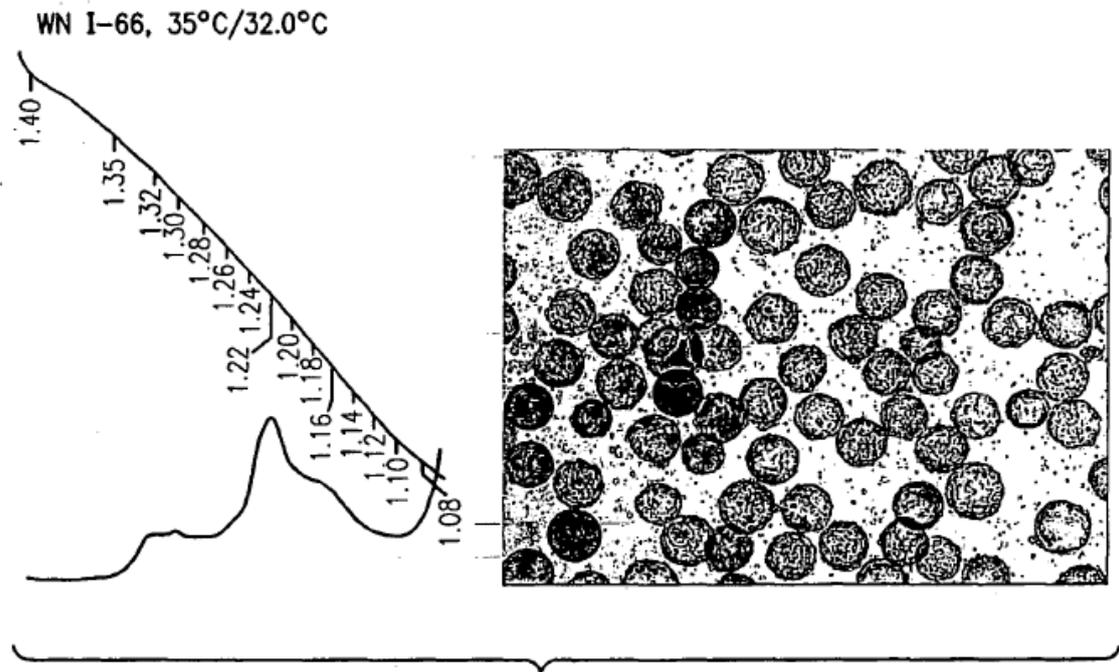


FIG. 9C

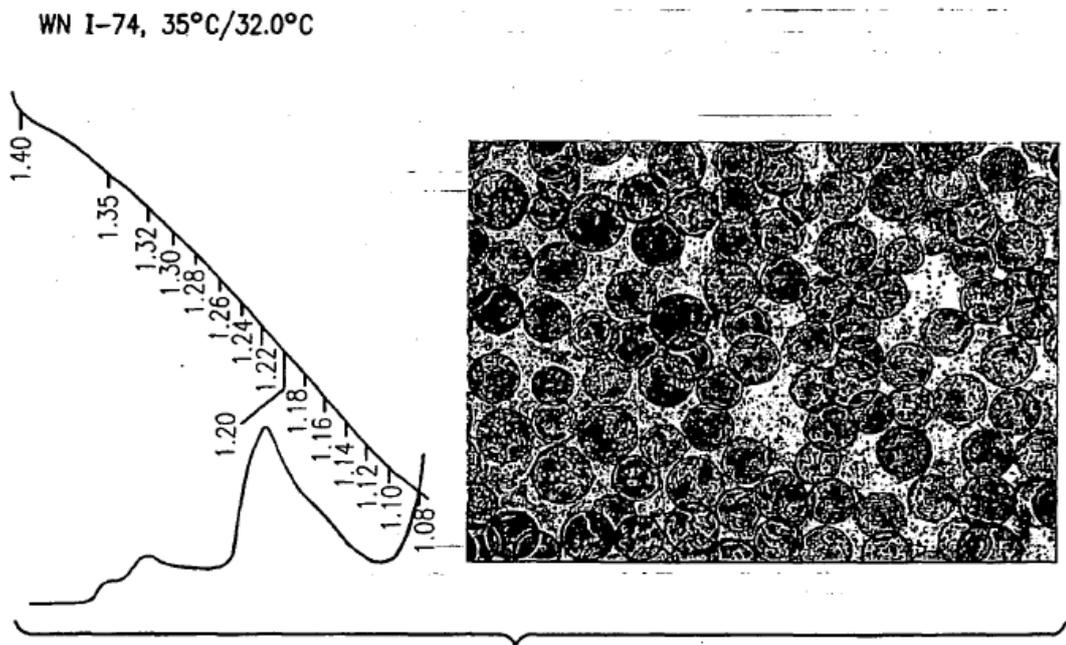


FIG. 9D