

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 894**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2011** **E 11781731 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014** **EP 2606128**

54 Título: **Línea celular de amniocitos humanos permanentes para la producción de virus de la gripe**

30 Prioridad:

13.05.2011 DE 102011050353
16.08.2010 DE 102010037008

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2014

73 Titular/es:

CEVEC PHARMACEUTICALS GMBH (100.0%)
Gottfried-Hagen Strasse 62
51105 Köln, DE

72 Inventor/es:

SCHIEDNER, GUDRUN y
REICHL, UDO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 524 894 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

Línea celular de amniocitos humanos permanentes para la producción de virus de la gripe

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de una vacuna de virus de la gripe usando amniocitos humanos permanentes, así como al uso de amniocitos humanos permanentes para la producción de una vacuna a base de virus de la gripe.

La vacunación es la medida más importante en la asistencia sanitaria, para prevenir enfermedades ocasionadas por la epidemia anual de gripe. El uso satisfactorio de las vacunas depende, por tanto, de que la producción lo más rápida posible de cantidades suficientemente grandes de inoculantes, tales como virus muertos de fuentes estables y fáciles de usar. El rápido desarrollo de vacunas y su adecuada disponibilidad son decisivos en la lucha contra muchas enfermedades humanas y animales. Como resultado de los retrasos en la producción de vacunas y las pérdidas cuantitativas, se pueden presentar problemas en el manejo de los brotes epidémicos de la enfermedad. Esto da como resultado que los esfuerzos más recientes se concentran en el cultivo de virus en cultivo celular para su uso como vacunas.

Hasta ahora, las vacunas antigripales disponibles se producen en huevos de gallina incubados. Se debe comprobar que estos huevos de gallina están exentos de determinadas contaminaciones virales y bacterianas. Estos huevos de gallina libres denominados "exentos de patógenos específicos" (SPF, por sus siglas en inglés) están disponibles de forma comercial. Aunque se ha encontrado que los huevos de gallina son muy útiles en la propagación de virus animales y humanos, tienen algunas desventajas en la producción de vacunas. Por ejemplo, en el caso de una pandemia, se producirá una alta demanda de huevos de gallina para la producción de vacunas puesto que es necesario un huevo para la producción de una vacuna convencional. Dada la limitada disponibilidad de huevos de gallina se debe contar con un lapso de aproximadamente un año para el suministro de huevos de gallina en una cantidad suficiente. Además existen subtipos de gripe que son altamente patógenos para las gallinas, de manera que en el caso de una pandemia podrían provocar escasez en el suministro de huevos de gallina. Además el proceso de producción es muy costoso y requiere mucho tiempo. Otra desventaja de la producción de vacunas en huevos de gallina es que estas vacunas normalmente no están exentas de proteínas de gallina y, así, algunos pacientes pueden experimentar reacciones alérgicas. Por último, la posible selección de una subpoblación que difiere del virus de origen natural requiere de sistemas de células hospedadoras alternativos.

Contrariamente a los huevos de gallina, las células para la producción de vacunas antigripales basadas en cultivos celulares siempre están disponibles. Se almacenan congeladas y en se pueden descongelar rápidamente y reproducir en la cantidad necesaria bajo demanda. Así, la producción de vacunas puede iniciarse en cualquier momento deseado. En el caso de una demanda inesperadamente alta o cuando se propagan inesperadamente nuevas cepas de virus, es posible poner a disposición a corto plazo una vacuna apropiada.

El proceso de producción que usa cultivo celular permite la producción de virus como vacunas en un sistema cerrado normalizado en condiciones definidas y controladas. Debido al proceso de producción controlado, la vacuna antigripal terminada no requiere la adición de antibióticos. Puesto que la producción de las vacunas antigripales en cultivo celular es totalmente independiente de huevos, la vacuna producida de esta manera no tiene proteína de gallina y no puede provocar reacciones alérgicas debidas a sensibilidad en los pacientes.

En la actualidad, la producción de vacunas antigripales usa principalmente tres líneas celulares, a saber, las células PER.C6 humanas, las células Madin Darby Canine Kidney (MDCK) y las células de riñón de mono verde africano (Vero). Además, actualmente está en desarrollo una línea celular de retina de pato (AGE1.CR) y líneas de células madre embrionarias de ave. La producción de vacunas a partir de células de mamíferos representa una alternativa a la producción de vacunas basadas en huevos de gallina. Sin embargo, estas células requieren de suero y/o la adhesión a un soporte sólido para su proliferación. Esto dificulta y, por consiguiente, encarece la producción de las vacunas en estas células, puesto que, por motivos de seguridad, es necesario separar completamente el suero y la proliferación sobre soportes sólidos es limitada, conduciendo de este modo a menores rendimientos.

Una ventaja de la producción de vacunas en células de mamíferos consiste en que el aislamiento y la replicación del virus en el cultivo celular no genera una selección dependiente de pasajero de un fenotipo que difiere del tipo salvaje clínico. Por tanto, la glucoproteína viral hemaglutinina, por medio de la cual se efectúa la adhesión a la célula que se deberá infectar y la integración del virus en la célula, se expresa como una forma nativa; por ello, tiene una especificidad y avidez mejoradas; así, es posible una inmunidad mediada por células.

Por tanto, la invención tiene por objeto proporcionar líneas celulares humanas permanentes mejoradas para la producción de vacunas basadas en el virus de la gripe.

Este objeto se consigue mediante la materia objeto definida en las reivindicaciones.

Las Figuras ilustran la invención.

Las Figuras 1A a G muestran esquemáticamente el desarrollo de diferentes parámetros durante el cultivo de la línea celular de amniocitos permanentes CAP 1D5 en medio 293SFMII (●), la línea celular de amniocitos permanentes

CAP 1D5 en medio PEM (▲) y la línea celular de riñón canino permanente MDCK.SUS2 (Madin Darby Canine Kidney) en medio SMIF8 (◆) en matraces vibratorios de 100 ml. La Figura 1A representa gráficamente el desarrollo del número comparado de células vivas de las tres líneas celulares; la Figura 1B muestra el desarrollo del número de células muertas de las líneas celulares; y la Figura 1C muestra el desarrollo de la tasa de supervivencia de las líneas celulares. Las Figuras 1D a G muestran esquemáticamente el desarrollo del valor pH (D), la concentración de glucosa (símbolos claros) y lactosa (símbolos oscuros) (E), de glutamina (Gln) (símbolos claros) y de amonio (símbolos oscuros) (F) y la concentración del ácido glutámico (Glu) (símbolos claros) y piruvato (símbolos oscuros) (G).

La Figura 2 muestra un gráfico de barras que representa los títulos virales medidos como valor TCID₅₀ mediante 4 pases de las cepas del virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) y A/Uruguay/716/2007 (H3N2) en células CAP-1D5 en medio 293SFMII y PEM. Abreviaturas: A/PR 293: cepa de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) en células CAP-1D5 en medio 293SFMII; A/PR PEM: cepa de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) en células CAP-1D5 en medio PEM; A/Urug 293: cepa de la gripe A/Uruguay/716/2007 (H3N2) en células CAP-1D5 en medio 293SFMII; A/Urug PEM: cepa de la gripe A/Uruguay/716/2007 (H3N2) en células CAP-1D5 en medio PEM; el valor TCID₅₀ es el título viral en número de virus/ml que se requiere para infectar el 50 % de las células hospedadoras.

Las Figuras 3A a F muestran esquemáticamente el desarrollo de la cantidad de partículas de virus especificada como unidades log HA (hemaglutinina) /100 µl y el número de células vivas en el cultivo de amniocitos permanentes CAP-1D5 en medio 293SFMII (A, B) y PEM (C, D), y células de riñón canino permanentes MDCK.SUS2 en medio SMIF8 (E, F) tras la infección de las células con la cepa de virus de la gripe A/PR/8/34 con el uso de diferentes cantidades de virus indicadas como valores MOI (multiplicidad de infección, por sus siglas en inglés): MOI: 0,0025 (△); MOI: 0,025 (□); MOI: 0,25 (○). MOI (multiplicidad de infección) representa de nuevo la relación de número de partículas infecciosas respecto a células diana.

Las Figuras 4A a D muestran esquemáticamente el desarrollo de diferentes parámetros en el cultivo de la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en medio PEM en el biorreactor de 1 litro, mientras que la infección tiene lugar después de 114 horas con una cantidad de virus indicada como MOI de 0,025 con el virus de la gripe A/PR/8/34 (adaptado). La Figura 4A representa el desarrollo esquemático del número de células vivas (▲), número de células muertas (△) y la tasa de supervivencia (▲) de las células. En la Figura 4B se muestra esquemáticamente la cantidad de partículas de virus como unidades log HA (hemaglutinina)/100 µl (▲), concentración de glutamato (△) y piruvato (●) en el medio. La Figura 4C muestra esquemáticamente el desarrollo del valor pH (△) y a la Figura 4D muestra el desarrollo de la capacidad de infección (en TCTD₅₀/ml). El valor TCID₅₀ indica el título viral en número de virus/ml que se requiere para infectar 50 % de las células hospedadoras.

Las Figuras 5A y B muestran gráficos de barras que representan el título viral medido como unidades log HA /100 µl (A) o valor TCID₅₀ (B) mediante 4 pases de las cepas del virus de la gripe A/Brisbane/59/2007, B/Florida/4/2006, gripe porcina (A/Swine (H1N2) Bakum/1832/00) y gripe equina (A/Equine, A/Newmarket/I/93 (H3N8)) en células CAP-1D5 en medio 293SFMII y PEM. Abreviaturas: A/Bris 293: cepa de la gripe A/Brisbane/59/2007 en células CAP-1D5 en medio 293SFMII; A/Bris PEM: cepa de la gripe A/Brisbane/59/2007 en células CAP-1D5 en medio PEM; B/Flor 293: cepa de la gripe B/Florida/4/2006 en células CAP-1D5 en medio 293SFMII; B/Flor PEM: cepa de la gripe B/Florida/4/2006 en células CAP-1D5 en medio PEM; Schw 293: cepa de la gripe A/Swine (H1N2) Bakum/1832/00 en células CAP-1D5 en medio 293SFMII; Schw PEM: cepa de la gripe A/Swine (H1N2) Bakum/1832/00 en células CAP-1D5 en medio PEM; caballo 293: cepa de la gripe A/Equine, A/Newmarket/I/93 (H3N8) en células CAP-1D5 en medio 293SFMII; caballo PEM: cepa de la gripe A/Equine, A/Newmarket/I/93 (H3N8) en células CAP-1D5 en medio PEM; el valor TCID₅₀ es el título viral en número de virus/ml que se requiere para infectar 50 % de las células hospedadoras.

Las Figuras 6A y B muestran esquemáticamente el desarrollo de la concentración de número de células vivas y el valor pH en el cultivo de la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en 100 ml de medio PEM en matraces vibratorios, siendo el número de células inicial de 5×10^5 células/ml y el medio contiene adicionalmente piruvato 4 mM (◆) o el número de células inicial es de 8×10^5 células/ml y el medio contiene adicionalmente piruvato 4 mM (▲) o el número de células inicial es de 8×10^5 células/ml y el medio contiene adicionalmente piruvato 10 mM más aminoácidos adicionales (●).

Las Figuras 7A a C muestran esquemáticamente el desarrollo de los títulos virales medidos en unidades log HA /100 µl de cultivo, siendo infectadas las células CAP-1D5 con la cepa de la gripe adaptada A/PR/8/34. Antes de la infección, o bien no se llevó a cabo un cambio de medio (A), o bien se efectuó una dilución 1:2 con medio PEM (B) o se efectuó un cambio de medio completo. La Figura 7A muestra el desarrollo esquemático del título viral de cultivos celulares CAP-1D5 sin cambio de medio, usándose en la infección diferentes concentraciones de tripsina de 1×10^{-4} U/célula (◆), 3×10^{-5} U/célula (▲) y 5×10^{-5} U/célula (■). La Figura 7B muestra el desarrollo esquemático del título viral de cultivos celulares CAP-1D5 con una dilución 1:2 con medio PEM, usándose en la infección diferentes concentraciones de tripsina de 1×10^{-4} U/célula (◆), 3×10^{-5} U/célula (▲) y 5×10^{-5} U/célula (■). La Figura 7C muestra el desarrollo esquemático del título viral de cultivos celulares CAP-1D5 con cambio de medio completo, usando en la infección o bien no se utilizó tripsina (*) o diferentes concentraciones de tripsina de 1×10^{-4} U/célula (▲), 1×10^{-5} U/célula (◆), 5×10^{-5} U/célula (■) y 1×10^{-6} U/célula (x).

Las Figuras 8A a F muestran esquemáticamente el desarrollo del título viral en cultivos celulares CAP-1D5 que se infectaron con los virus de la gripe A/PR/8/34, A/Brisbane/59/2007 o B/Florida/4/2006. Cambiándose antes de la infección el medio (A a C) o no (D a F).

- 5 La infección con la cepa de la gripe A/PR/8/34 y B/Florida/4/2006 se efectuó, respectivamente, con cantidades de virus indicadas como valor MOI de 0,25, 0,025 y 0,0025. La infección con la cepa de la gripe A/Brisbane/59/2007 se efectuó, respectivamente, a los valores MOI de 0,1, 0,025 y 0,0025. MOI (multiplicidad de infección) reproduce la relación del número de partículas infecciosas respecto a células diana.

- 10 Las Figuras 9A y B muestran esquemáticamente el desarrollo de la concentración de número de células vivas y el título viral de cultivos celulares CAP-1D5 (B16, B26 y Wave) y un cultivo (MDCK) de células de riñón canino MDCK.SUS2, infectadas con el virus de la gripe adaptado A/PR/8/34 y que se cultivaron a escala de 1 litro en biorreactores STR (del inglés Stirred Tank Reactor) (Sartorius) (B16, B26 y MDCK) o Wave (Wave Biotech AG) (Wave). Antes de la infección tuvo lugar un cambio de medio en los cultivos B26 y Wave.

- 15 Las Figuras 10A a C muestran esquemáticamente el desarrollo del título viral medido en unidades log HA/100 µl, del número de células vivas y del valor pH de cultivos celulares CAP-1D5 que se infectaron con el virus de la gripe adaptado A/PR/8/34 y se cultivaron en 100 ml de medio PEM en matraces vibratorios. Antes de la infección tuvo lugar o bien un cambio de medio 1:1 (símbolos claros) con medio 293SFMI (□) o medio PEM (◇) o un cambio de medio completo (símbolos oscuros) con medio 293SFMI (■) o medio PEM (◆).

- 20 El término “virus de la gripe” tal como se usa en el presente documento, se refiere a ortomixovirus que pueden infectar a humanos y animales. Estos se clasifican como virus de la gripe de los tipos A, B y C. Los virus de la gripe A y B se reúnen en un género. Los virus de la gripe C se diferencian por sus siete segmentos de genoma. Los virus de la gripe A y B tienen ocho segmentos de genoma. Además, los virus de la gripe A y B codifican cada uno, respectivamente, una hemaglutinina (HA) y una neuroaminidasa (NA); sin embargo, los virus de la gripe C codifican una proteína superficial que combina ambas propiedades, la proteína de fusión hemaglutinina-esterasa (HEF). Los virus de la gripe A se subdividen además en subtipos basándose en la secuencia de las moléculas de hemaglutinina (H1-H15) y de neuroaminidasa (N1-N9).

- 30 El término “proteína de virus de la gripe” tal como se usa en la presente memoria, se refiere a proteínas o derivados del virus de la gripe. Un derivado del virus de la gripe es típicamente una proteína o una parte de la misma del virus de la gripe que puede usarse con fines de inmunización. Las proteínas del virus de la gripe o sus derivados incluyen proteínas de la envoltura del virus o partes de la misma. En particular, las proteínas de virus de la gripe comprenden proteínas de la gripe A, proteínas de la gripe B o proteínas de la gripe C, por ejemplo, hemaglutinina (HA), neuroaminidasa (NA), proteínas del núcleo (NP), las proteínas de matriz (M1) y (M2), las proteínas de polimerasa (PB1), (PB2) y (PA) y las proteínas no estructurales (NS1) y (NS2) y partes de las mismas. Las partes de las proteínas de virus de la gripe comprenden uno o varios epítopos de las proteínas de la gripe A, proteínas de la gripe B o proteínas de la gripe C. Los epítopos pueden ser epítopos de linfocitos T CD4+ que representan péptidos que contienen un motivo de unión de la clase MHC clase-II y que están representados en la superficie de células presentadoras de antígeno, por moléculas del MHC clase-II, o epítopos de linfocitos T CD8+ que son péptidos que contienen un motivo de unión de la clase MHC clase-I y que están representados en la superficie de células presentadoras de antígeno mediante moléculas del MHC clase-I. Por ejemplo, el modelo algorítmico, las pruebas de unión a MHC, los procedimientos de identificación de antígenos *in silico* y los procedimientos de cristalografía de rayos X permiten la identificación de antígenos que pueden unirse a diferentes moléculas del MHC.

- 40 El término “vacuna” tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un antígeno producido en forma biológica o por ingeniería genética que comprende proteínas, subunidades de proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, virus muertos o atenuados que, en el presente documento, puede ser partículas de virus completas o partes de partículas de virus o una combinación de las mismas. El antígeno puede ser al menos un epítipo, por ejemplo, un epítipo de linfocitos T y/o linfocitos B. Este antígeno es detectado por receptores inmunológicos tales como el receptor de linfocitos T o el receptor de linfocitos B. La vacuna se usa para su aplicación a una activación específica del sistema inmunitario con respecto a un virus determinado. Aquí, se usa la reacción del sistema inmunitario de provocar una respuesta inmunitaria en presencia de virus o bien de sus antígenos específicos. Esto conduce a la formación de anticuerpos y linfocitos T cooperadores especializados que pueden proporcionar una protección prolongada contra una enfermedad concreta, que puede, dependiendo del virus, durar de unos años hasta toda la vida. Las vacunas son vacunas vivas o inactivadas. La vacuna contiene, por ejemplo, virus atenuados todavía capaces de reproducir virus que no pueden desencadenar la enfermedad. En una vacuna inactivada, estos virus están muertos o solo contienen fragmentos del virus (antígenos). La inactivación (muerte) de los virus se efectúa, por ejemplo, por medio de sustancias químicas, por ejemplo, formaldehído, beta-propiolactona y psoraleno.
- 55 La envoltura del virus se conserva. También existen vacunas de toxoides que únicamente contienen el componente biológicamente inactivo (toxoides) de la toxina (por ejemplo el toxoides de tétano), que también están incluidas entre las vacunas de microbios muertos. En particular, la vacuna inactivada puede ser una vacuna escindida que consiste en fragmentos de las proteínas de la envoltura del virus. La destrucción o escisión de la envoltura del virus puede efectuarse, por ejemplo, con detergentes o disolventes orgánicos fuertes. Además, también es posible desactivar o matar los virus por medio de sustancias químicas. Además, las vacunas de subunidades se cuentan entre las vacunas de microbios muertos; estas consisten en componentes específicos del virus, por ejemplo, proteínas de

hemaglutinina y neuroaminidasa.

La expresión “vacuna a base de virus de la gripe” como se usa en la presente memoria, se refiere a todas las proteínas, péptidos o partes de los mismos, así como a ácidos nucleicos que codifican estas proteínas, péptidos o partes de las mismas del virus de la gripe, así como a las propias partículas de virus de la gripe, proteínas de virus de la gripe recombinantes, incluyendo proteínas de envoltura de la gripe, partículas subvirales, partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés), complejos VLP y/o partes de los mismos, que pueden usarse con fines de inmunización contra la gripe.

El término “adyuvante”, como se usa en la presente memoria, se refiere a sustancias que pueden modular la inmunogenidad de un antígeno. Los adyuvantes son, por ejemplo, sales minerales, mezclas de escualeno, péptidos de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de pared celular microbacteriana, determinadas emulsiones, monofosforil-lípido-A, derivados de ácido micólico, agentes tensioactivos de copolímeros de bloque no iónicos, Quil A, subunidad de la toxina B de cólera, polifosfacenos y derivados de los mismos, complejos inmunoestimuladores, adyuvantes de citocina, adyuvante MF59, adyuvantes lipídicos, adyuvantes mucosales, determinadas exotoxinas bacterianas, determinados oligonucleótidos y PLG.

El término “amniocito” como se usa en la presente memoria, se refiere a células que están presentes en el líquido amniótico y que pueden obtenerse mediante amniocentesis. Proviene o bien del amnios o del tejido fetal que está en contacto con el líquido amniótico. Se describieron tres clases principales de amniocitos, que se diferencian en virtud de criterios morfológicos: células de tipo fibroblasto (células F), células epiteloideas (células E) y células de líquido amniótico (células AF) (Hohn y col., *Pediat. Res.* 8:746-754, 1974). Las células AF son el tipo de célula predominante.

El término “líneas celulares permanentes” como se usa en la presente memoria, se refiere a células que están modificadas genéticamente de manera que con las condiciones de cultivo adecuadas se pueden seguir reproduciendo permanentemente en el cultivo celular. Estas células también se denominan células inmortalizadas.

El término “células primarias” como se usa en la presente memoria, se refiere a células que se obtienen mediante extracción directa de un organismo o un tejido y se ponen en cultivo. Las células primarias tienen solo una esperanza de vida muy limitada.

El término “transfección” como se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso que es adecuado para introducir el ácido o ácidos nucleicos en las células. Ejemplos incluyen el procedimiento convencional de fosfato de calcio, electroporación, sistemas liposomales de cualquier tipo y combinaciones de estos procedimientos.

El término “CAP” como se usa en la presente memoria, se refiere a líneas celulares de amniocitos humanos permanentes que fueron generadas por inmortalización de amniocitos humanos primarios, con funciones génicas adenovirales E1A y E1B.

El término “CAP-T” como se utiliza en la presente memoria, se refiere a células CAP que adicionalmente fueron transfectadas de manera estable con una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia del antígeno T de tamaño SV40.

El objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

(i) infectar un amniocito humano permanente con el virus de la gripe,

(ii) cultivar el amniocito humano permanente,

(iii) expresar el virus de la gripe, y

(iv) aislar el virus de la gripe del medio, en el que el amniocito humano permanente expresa los productos adenovirales E1A y E1B.

En el procedimiento de la invención se cultivan células humanas permanentes en condiciones (por ejemplo temperatura, medio, valor pH) que son adecuadas para la proliferación de las células. Las condiciones con respecto a la temperatura, el medio, el valor de pH y otros parámetros de proliferación son conocidas por el experto en la técnica, o se pueden determinar con el proceso habitual. Cuando el cultivo ha alcanzado una densidad de proliferación deseada, se agregan los virus de la gripe para infectar las células. Los virus pueden requerir varios días para multiplicarse dentro de las células. Durante este proceso de proliferación muere una gran parte de las células y los virus son liberados dentro del medio. La solución que contiene virus se separa de los residuos celulares, por ejemplo, por centrifugación. A continuación, el virus puede separarse de la solución del medio mediante, por ejemplo, una columna de cromatografía y el volumen puede reducirse. A continuación, los virus se pueden desactivar, por ejemplo, mediante un proceso químico. Esto puede ir seguido de una escisión del virus. Después de etapas adicionales de purificación y concentración se obtiene el concentrado de antígeno de una cepa del virus.

En una realización preferida, para la infección de las células humanas permanentes se usan las cepas de virus de la

gripe A/PR/8/34, A/Uruguay/716/2007, A/Brisbane/59/2007, B/Florida/4/2006, gripe porcina (A/Swine (H1N2) Bakum/1832/00) o gripe equina (A/Equine, A/Newmarket/1/93 (H3N8)).

- 5 En otra realización preferida, los virus de la gripe usados para la infección de las células humanas permanentes se adaptarán previamente a las células; preferiblemente, se trata de los virus de la gripe enumerados antes. Preferiblemente, dicha adaptación se efectúa mediante 4 pases. Preferiblemente, la adaptación de los virus de la gripe se efectúa en medio 293SFMI o medio PEM.

Otro procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe que comprende las etapas siguientes:

- (i) poner en contacto una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de virus de la gripe con una célula humana permanente,
- 10 (ii) cultivar el amniocito humano permanente,
- (iii) permitir la replicación de la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la gripe y/o la expresión de la proteína de la gripe, y
- (iv) aislar la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la gripe y/o la proteína de virus de la gripe del medio.

- 15 En una realización preferida, las células humanas permanentes usadas en el procedimiento de la invención son amniocitos humanos permanentes.

- En una realización preferida, las células humanas permanentes se cultivan en matraces vibratorios o biorreactores, preferiblemente biorreactores STR o Wave. Las células humanas permanentes se pueden cultivar en diferentes medios, preferiblemente en medio 293SFMI o PEM. Adicionalmente, es posible añadir al medio piruvato, glutamina, glucosa y otros aminoácidos. Preferiblemente, el medio contiene piruvato 4 mM o 10 mM y otros aminoácidos.
- 20

En otra realización preferida, el número inicial de células de las células humanas permanentes, cuando se cultivan en matraces vibratorios, es de 5×10^5 células/ml, más preferiblemente de 8×10^5 células/ml.

En otra realización preferida, el valor de pH del cultivo celular antes del momento de la infección está en el intervalo de 7,1 a 7,8, más preferiblemente en el intervalo de 7,3 a 7,5, más preferiblemente, en el intervalo de 7,3 a 7,5.

- 25 En otra realización preferida, antes de la infección de las células humanas permanentes con virus de la gripe se lleva a cabo un cambio de medio completo o una dilución 1:2 del medio.

- En una realización preferida, para infectar las células humanas permanentes con virus de la gripe se usan concentraciones de tripsina de 1×10^{-4} U/célula, 1×10^{-5} U/célula, 3×10^{-5} U/célula, 5×10^{-5} U/célula o 1×10^{-6} U/célula. Si antes de la infección de las células humanas permanentes no se efectúa un cambio de medio, preferiblemente se usa una concentración de tripsina de 1×10^{-4} U/célula para la infección de las células con virus de la gripe. Si antes de la infección de las células humanas permanentes se lleva a cabo una dilución 1:2 con medio, preferiblemente se usa una concentración de tripsina de 5×10^{-5} U/célula para la infección de las células con el virus de la gripe. Si antes de la infección de las células humanas permanentes se lleva a cabo un cambio completo de medio, entonces preferiblemente se usa una concentración de tripsina de 5×10^{-6} U/célula para la infección de las células con el virus de la gripe.
- 30
- 35

- En una realización preferida, para la infección de las células humanas permanentes se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI (multiplicidad de infección) en el intervalo de 0,001 a 0,3. En una realización preferida de la presente invención, para la infección de las células humanas permanentes se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI (multiplicidad de infección) de 0,25, 0,1, 0,06, 0,025 o 0,0025. Preferiblemente, cuando se infectan las células humanas permanentes con el virus de la gripe A/PR/8/34 sin llevar a cabo un cambio de medio antes de la infección se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,25 en la infección de las células humanas permanentes con el virus de la gripe; cuando se infectan las células humanas permanentes con el virus de la gripe A/Brisbane/59/2007 sin llevar a cabo un cambio de medio antes de la infección se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,1 en la infección de las células humanas permanentes con el virus de la gripe. Preferiblemente, cuando se infectan las células humanas permanentes con el virus de la gripe A/PR/8/34 con un cambio de medio, se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,1 a 0,25 en la infección de las células humanas permanentes con el virus de la gripe; cuando se infectan las células humanas permanentes con el virus de la gripe A/Brisbane/59/2007 con un cambio de medio antes de la infección se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,06 a 0,25 en la infección de las células humanas permanentes con el virus de la gripe; y cuando se infectan las células humanas permanentes con el virus de la gripe B/Florida/4/2006 con un cambio de medio antes de la infección se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,01 a 0,025 o 0,0025 en la infección de las células humanas permanentes con el virus de la gripe.
- 40
- 45
- 50

En una realización preferida, el número de células en el momento de la infección en un cultivo en matraz vibratorio está en un intervalo de 1×10^6 a 6×10^6 células/ml. Preferiblemente el número de células en el momento de la

infección es de $2,3 \times 10^6$ células/ml, $4,5 \times 10^6$ células/ml o 5×10^6 células/ml. En una realización preferida, el número de células en el momento de la infección es de $4,5 \times 10^6$ células/ml y no se efectúa un cambio de medio antes de la infección. En otra realización preferida, el número de células en el momento de la infección es de $2,3 \times 10^6$ células/ml y antes de la infección se lleva a cabo una dilución 1:2 con medio PEM nuevo. En otra realización preferida, el número de células en el momento de la infección es de 5×10^6 células/ml y antes de la infección se lleva a cabo un cambio completo de medio.

En una realización particularmente preferida, las células humanas permanentes se cultivan en el biorreactor STR (Sartorius) de 1 litro en medio PEM con glutamina 4 mM y piruvato 4 mM, siendo el número de células inicial de 5×10^5 células/ml y realizándose la infección con virus de la gripe con un número de células de $2,1 \times 10^6$ células/ml en una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,025; antes de la infección no tiene lugar un cambio de medio. Preferiblemente la infección se efectúa en la presencia de tripsina en una concentración final de 3×10^{-5} U/ml.

En una realización particularmente preferida, las células humanas permanentes se cultivan en el biorreactor STR (Sartorius) de 1 litro en medio PEM, siendo el número de células inicial de 8×10^5 células/ml e infectándose con virus de la gripe usando una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,025 y antes de la infección tiene lugar un cambio de medio. Preferiblemente, la infección se efectúa en la presencia de tripsina en una concentración final 3×10^{-5} U/ml.

En otra realización particularmente preferida, las células humanas permanentes se cultivan en el biorreactor Wave (Wave Biotech AG) de 1 litro en medio PEM con glutamina 4 mM, piruvato 4 mM y glucosa 20 mM, siendo el número de células inicial de 5×10^5 células/ml y siendo el número de células antes de la infección de $2,1 \times 10^6$ células/ml e infectándose con virus de la gripe usando una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,025. Antes de la infección no tiene lugar un cambio de medio. Preferiblemente la infección se efectúa en la presencia de tripsina en una concentración final 3×10^{-5} U/ml.

En una realización preferida, las células humanas permanentes se cultivan en medio PEM con glutamina 4 mM y piruvato 4 mM en matraces vibratorios, efectuándose antes de la infección de las células con virus de la gripe efectúa un cambio de medio usando una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,025 en la presencia de una concentración de tripsina de 1×10^{-6} /mi U/célula.

En una realización preferida, las células humanas permanentes se cultivan en medio PEM con glutamina 4 mM y piruvato 4 mM en matraces vibratorios, efectuándose antes de la infección de las células con virus de la gripe un cambio de medio 1:1 usando una cantidad de virus indicada como valor MOI de 0,025 en la presencia de una concentración de tripsina de 1×10^{-5} /mi U/célula.

En la producción de proteínas de la gripe y moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de la gripe, las células humanas cultivadas se transfectarán con moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de la gripe y, a continuación, se aislarán y purificarán las proteínas de virus de la gripe o las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de la gripe utilizando procedimientos conocidos.

En otra realización preferida, las células humanas se encuentran en o entre la fase de proliferación exponencial media y la fase de proliferación estacionaria en el procedimiento de proliferación del procedimiento de la invención en el momento de la infección con una partícula de virus o en el momento de la transfección con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de virus de la gripe o una parte del mismo. Una curva de proliferación típica en la que el número de células se representa frente al tiempo presenta una curva sigmoideal. Comienza con lo que se denomina fase lag, seguida de la fase log o fase exponencial y la fase estacionaria. La fase de proliferación exponencial media corresponde en este caso al primer punto de inversión de una curva de proliferación típica, siendo que un punto de inversión es un punto en la curva de proliferación en el que la forma del desarrollo de la curva varía de cóncavo a convexo o de convexo a cóncavo. La fase estacionaria comienza cuando la curva de proliferación alcanza una meseta y, así, el número de células permanece constante.

Los ácidos nucleicos que codifican una proteína de la gripe que se producen por el procedimiento se pueden usar para la inmunización de ácidos nucleicos, o como las denominadas vacunas de ADN. En la inmunización de ácidos nucleicos se inoculan antígenos inmunógenos, es decir, antígenos que generan una respuesta inmunitaria en humanos. Estos antígenos inmunógenos se codifican mediante ADN o ARN y están presentes como casetes de expresión o vectores de expresión, o están integrados en vectores virales con el fin de inducir una respuesta inmunitaria al producto génico. Las vacunas de ADN pueden existir en diferentes sistemas de administración, por ejemplo, como ADN o ARN, en forma de plásmidos o casetes de expresión lineales o circulares, estando estos dotados con los elementos necesarios para la expresión como, por ejemplo, promotor, sitios de poliadenilación, origen de replicación, etc. En una administración de ADN, este se encuentra la mayoría de las veces en un regulador con o sin adyuvante o ligado a nanopartículas o integrado en un compuesto que contiene adyuvante o en un vector viral o bacteriano. Las vacunas de ADN generan inmunidad tanto humoral como también mediada por célula. Una ventaja de la vacuna de ADN es que el antígeno se expresa en su forma nativa y, por consiguiente, conduce a una mejor inmunización. Otra ventaja de la vacuna de ADN es que al contrario de la vacuna viva debilitada no es infecciosa y tampoco se puede volver nuevamente virulenta.

La administración de la vacuna de ADN en forma de ADN o ARN, plásmidos o fragmentos de ADN lineales que están acoplados a partículas, se puede efectuar por inyección o con la ayuda de un inyector génico. Por ello, la vacuna de ADN para la inyección puede estar presente en una solución salina o solución salina tamponada.

5 Los ácidos nucleicos preparados con el procedimiento que codifican proteínas de la gripe, proteínas de la gripe y virus de la gripe se pueden usar como vacuna contra el virus de la gripe tipo A y/o B y/o C.

10 La vacuna a base de virus de la gripe preparada con el procedimiento de la invención comprende, por tanto, todas las proteínas, péptidos o partes de los mismos, así como ácidos nucleicos que codifican estas proteínas, péptidos o partes de de los mismos del virus de la gripe, de las propias partículas de virus de la gripe, proteínas de virus de la gripe recombinantes, incluyendo proteínas de la envoltura del virus de la gripe, partículas subvirales, partículas similares a los virus (VLP), complejos VLP y/o partes de los mismos que pueden usarse con fines de inmunización contra la gripe.

15 Preferiblemente, las proteínas de la gripe preparadas con el procedimiento son proteínas o derivados del virus de la gripe, preferiblemente de las cepas de virus de la gripe A/PR/8/34, A/Uruguay/716/2007, A/Brisbane/59/2007, B/Florida/4/2006, gripe porcina (A/Swine (H1N2) Bakum/1832/00) o gripe equina (A/Equine, A/Newmarket/1/93 (H3N8)).

El aislamiento y purificación de los ácidos nucleicos que codifican una proteína de virus de la gripe o una parte del mismo preparados con el procedimiento se efectúa con los procedimientos convencionales y que son conocidos por el experto.

20 El aislamiento y purificación de las proteínas de virus de la gripe preparadas de acuerdo con el procedimiento de la invención se efectúa por medio procedimientos habituales que son conocidos por el experto. La purificación de las proteínas depende primero de su origen. Se diferencia entre proteínas intra y extra celulares. Si las proteínas se encuentran dentro de los cuerpos celulares, primero se requiere una apertura de las células, por ejemplo, mediante fuerzas de cizallamiento u osmosis. A continuación, se efectúa la separación del material insoluble, como, por ejemplo, membranas celulares y paredes celulares, por ejemplo, mediante centrifugación. La centrifugación se usa de manera estándar para separar células, orgánulos de células y proteínas. Un procedimiento más eficaz referente a la capacidad de separación es la electroforesis pulsada. Adicionalmente, después de la separación de los otros componentes celulares existe todavía la necesidad de la separación de proteínas, péptidos y aminoácidos de diferente tamaño. La separación de las proteínas se puede efectuar mediante electroforesis de gel o electroforesis capilar en una o dos dimensiones. En el ámbito de los aminoácidos y péptidos se usan, por ejemplo, procesos cromatográficos tales como cromatografía de afinidad, de intercambio de iones (IEC) o de fase inversa (RPC). La presencia de lípidos y la necesidad de la separación o desactivación de proteasas son desfavorables para la depuración. No es necesario extraer de las células las proteínas que están presentes en la matriz extracelular, pero tras la separación de todos los componentes insolubles se encuentran presentes muy diluidas y usualmente en cantidades mucho menores que las proteínas intracelulares.

35 Para el aislamiento y purificación de las partículas de virus de la gripe preparadas con el procedimiento de conformidad con la invención se usan procesos que son conocidos por el experto. Ejemplos de estos procesos son la centrifugación diferencial o zonal en gradiente de densidad.

40 Las células humanas permanentes usadas en el procedimiento de la invención se generan por immortalización de células humanas primarias. Las células humanas primarias se obtienen por extracción directa del organismo o de un tejido del organismo y que se pone en cultivo. Se prefieren las células humanas primarias que se pueden convertir bien en líneas celulares humanas permanentes mediante expresión con factores transformadores de célula, en particular amniocitos, células de retina embrionarias y células embrionarias de origen neuronal.

45 Los factores transformadores de célula pueden ser antígeno T de SV40 (N.º de acceso Genbank J02400), producto génico E6 y E7 de HPV (por ejemplo HPV16, N.º de acceso Genbank K02718) y productos génicos E1A y E1B de adenovirus humano (por ejemplo, adenovirus humano serotipo-5, N.º de acceso Genbank X02996). Las células primarias pueden transfectarse mediante la expresión de la immortalización de E1 del adenovirus humano con las dos secuencias de ácido nucleico para los productos génicos E1A y E1B. En la expresión de un HPV presente en forma natural es posible expresar E6 y E7 de un transcripto ARN. Lo mismo es aplicable para la expresión de E1A y E1B de un adenovirus existente de forma natural. Los factores transformadores de células como, por ejemplo, la función génica E1 adenoviral tienen por efecto la immortalización o transformación y con ello la capacidad de cultivo de larga duración de las células.

55 La expresión de los factores transformadores de célula se puede efectuar con el control de un promotor homólogo y elementos de terminación de transcripción, por ejemplo, el promotor E1A natural y el sitio de poliadenilación E1A natural para la expresión de la función génica E1A adenoviral. Esto puede conseguirse usando las moléculas de ácido nucleico usadas para la transfección de los respectivos fragmentos del genoma viral, por ejemplo, del genoma adenoviral que contienen dichas funciones génicas, por ejemplo, E1A, E1B. Además, la expresión de los factores transformadores de célula también puede efectuarse con el control de promotores heterólogos que no están presentes de manera natural con la región de codificación usada o elementos de terminación de transcripción. Como

promotores heterólogos pueden servir, por ejemplo, promotor CMV (citomegalovirus) (Makrides, 9-26 en: Makrides (Eds.), *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*, Elsevier, Ámsterdam, 2003), promotor EF-1 α (Kim y col., *Gene* 91st:217-223, 1990), promotor CAG (un promotor híbrido del potenciador inmediato temprano del citomegalovirus humano y un promotor β -actina de gallina modificado con primer intrón) (Niwa y col., *Gene* 108:193-199, 1991), promotor pgk (fosfoglicerincinasa) humano o murino (Adra y col., *Gene* 60:65-74, 1987), promotor RSV (virus del sarcoma de Rous) (Makrides, 9-26 en (Adra y col., *Gen* 60:65-74, 1987: (Makrides Eds.), *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*, Elsevier, Ámsterdam, 2003) o promotor SV40 (virus de primate 40) (Makrides, 9-26 en: (Makrides Ed.), *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*, Elsevier, Ámsterdam, 2003). Como sitios de poliadenilación pueden servir, por ejemplo, las secuencias de poliadenilación del antígeno T grande SV40 (N.º de acceso Genbank J02400) o del gen G-CSF humano (factor estimulador de colonias de granulocitos) (Mizushima and Nagata, *Nucl. Acids Res.* 18:5322, 1990).

Las células se immortalizan mediante la transfección de células humanas primarias con la molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias de ácido nucleico que codifican E1A y E1B. La molécula de ácido nucleico usada para immortalizar las células humanas primarias comprende secuencias de ácido nucleico E1A y E1B que provienen preferiblemente de adenovirus humanos, y en particular del adenovirus serotipo-5 humano. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico usada para immortalizar comprende, además de las secuencias de ácido nucleico que codifican E1A y E1B, la secuencia de ácido nucleico que codifica la función génica pIX adenoviral. El polipéptido pIX es una proteína estructural viral que actúa como activador de la transcripción sobre diversos promotores virales y celulares tales como el promotor timidinacinasasa o el promotor beta-globina. El efecto activador de la transcripción del polipéptido pIX expresado adicionalmente en la célula puede dar lugar a un aumento en los niveles de expresión del polipéptido recombinante en la producción de líneas celulares de acuerdo con la invención si la secuencia que codifica el polipéptido recombinante se encuentra bajo el control de uno de los promotores antes citados. Una secuencia ejemplo se encuentra en el n.º de acceso Genbank X02996. En particular las moléculas de ácido nucleico comprenden los nucleótidos 1 a 4344, o los nucleótidos 505 a 3522 o los nucleótidos 505 a 4079 del adenovirus serotipo-5 humano.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende para immortalizar células primarias, en particular los amniocitos, la secuencia del nucleótido de adenovirus serotipo 5 de nucleótido 505 a nucleótido 4079. La molécula de ácido nucleico comprende para immortalizar las células primarias, en particular los amniocitos, la secuencia del nucleótido de adenovirus serotipo 5 de nucleótido 505 a nucleótido 3522. En otra realización particularmente preferida, la molécula de ácido nucleico comprende para immortalizar las células primarias, en particular los amniocitos, la secuencia del nucleótido de adenovirus serotipo 5 de nucleótido 1 a nucleótido 4344, que corresponde al ADN adenoviral en células HEK293 (Louis y col., *Virology* 233:423-429, 1997). Además, la célula humana immortalizada puede expresar un factor de replicación viral. Este factor de replicación puede unirse al origen de replicación (ori) de una molécula de ácido nucleico introducida por transfección y, de este modo, iniciar la replicación de la molécula de ácido nucleico episomal. La replicación episomal de moléculas de ácido nucleico, en particular de ADN plásmido, en las células tiene provoca una fuerte proliferación del número de copias de las moléculas de ácido nucleico transferidas y, por ello, un aumento de la expresión de un polipéptido recombinante codificado en esta molécula, así como su mantenimiento durante muchas divisiones celulares. Dicho factor de replicación viral es, por ejemplo, el antígeno T del virus 40 (SV40) de primate, que después de unirse a una secuencia designada como origen de replicación SV40 (SV40 ori, origen de replicación) inicia en la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, el ADN plásmido, su replicación. La proteína EBNA-1 de virus Ebstein-Barr (antígeno 1 nuclear del virus Ebstein-Barr) identifica un origen de replicación denominado ori-P y cataliza la replicación extracromosómica de la molécula de ácido nucleico portadora de ori-P. El antígeno T del virus 40 (SV40) de primate como factor de replicación no sólo activa la replicación sino que también tiene un efecto activador sobre la transcripción de algunos genes virales y celulares (Brady, John and Khoury., George, 1985, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 5, N.º 6, páginas 1391 a 1399).

La célula humana immortalizada utilizada en el procedimiento de la invención usada en particular para amniocitos humanos immortalizados. En una realización preferida, la célula humana immortalizada usada en el procedimiento de la invención expresa el antígeno T grande de SV40 o el antígeno 1 nuclear (EBNA-1) de virus de Epstein-Barr (EBV). En una realización particularmente preferida los amniocitos humanos usados en el procedimiento de la invención expresan el antígeno T grande de SV40 o el antígeno 1 nuclear (EBNA-1) de virus de Epstein-Barr (EBV). En otra realización particularmente preferida, las células humanas immortalizadas, en particular amniocitos, usados en el procedimiento de la invención, expresan el antígeno T grande de SV40 bajo el control del promotor CAG, SV40, RSV o CMV.

Los amniocitos humanos permanentes usados en el procedimiento de acuerdo con la invención se describen en particular en los documentos de patente EP 1230354 y EP 1948789. En una realización particularmente preferida, los amniocitos humanos permanentes usados en el procedimiento de la invención son CAP o CAP-T.

En el caso de las células CAP, los amniocitos primarios se transfectaron con un plásmido que contiene el promotor pgk murino, secuencias Ad5 nucleótido 505-3522 que contiene toda la región E1, la señal 3' de escisión y poliadenilación de SV40 y la región pIX de Ad5 (nucleótido 3485-4079). Este plásmido se ha descrito con detalle en el documento EP 1948789.

Para la producción de las células CAP-T, se transfectaron las células CAP con un plásmido que contiene el casete de expresión para antígeno T de SV40 flanqueado por un intrón de SV40 y un sitio de poliadenilación. El plásmido puede contener adicionalmente el promotor CAG (promotor híbrido que consiste en el potenciador de CMV y el promotor β -actina de gallina) (Niwa y col., Gene 108:193-199, 1991), el promotor RSV (promotor de virus de sarcoma de Rous) (N.º de acceso Genbank DQ075935) o el promotor CMV (promotor prematuro del citomegalovirus humano) (SEQ ID N.º: 5). Con el fin de generar líneas celulares estables, el plásmido contiene un casete de expresión de blasticidina con el promotor de ubiquitina (pUB/Bsd, Invitrogen #V512-20).

Además, la célula humana, en particular amniocito, se puede cultivar en suspensión. Además es posible cultivar la célula humana, en particular amniocitos, en el procedimiento de la invención, en medio exento de suero.

Otro objeto de la presente invención es el uso de una célula humana permanente, en particular, amniocitos para la producción de una vacuna a base de virus de la gripe.

En una realización preferida, los amniocitos humanos permanentes usados para la producción de la vacuna a base de virus de la gripe es una célula CAP o CAP-T.

La vacuna a base de virus de la gripe producida con el procedimiento de la invención puede ser un virus de la gripe y/o una proteína de virus de la gripe o una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la gripe. La vacuna puede administrarse por vía parenteral con una jeringa. Se distinguen inyecciones intradérmicas, subcutáneas o intramusculares. La inyección intradérmica puede efectuarse con una lanceta o jeringa de vacunación. La inyección intramuscular puede efectuarse en el brazo, en el muslo o en el glúteo. Además es posible administrar la vacuna por vía oral o nasal. La vacuna puede administrarse, por ejemplo, a humanos y animales.

La vacuna a base de virus de la gripe preparada con el procedimiento de la invención puede proporcionar una resistencia frente a uno o varios virus de la gripe, bien mediante inmunización activa o también pasiva. Para la inmunización activa, la vacuna se usa para la aplicación de la activación específica del sistema inmunitario de humanos y animales en lo referente a un virus determinado. Aquí, se usa la reacción del sistema inmunitario para provocar una respuesta inmunitaria en presencia de virus o de sus antígenos específicos. Esto conduce a la formación de anticuerpos y linfocitos T cooperadores especializados, que proporcionan así una protección de larga duración contra la enfermedad respectiva que, dependiendo del virus, puede durar desde algunos años hasta toda la vida.

La vacuna a base de virus de la gripe preparada por el procedimiento de la invención puede ser, por ejemplo, una vacuna viva o una vacuna inactivada. La vacuna viva contiene, por ejemplo, virus atenuados capaces aun de reproducirse, pero que no pueden desencadenar la enfermedad. En una vacuna inactivada, estos virus están muertos o solamente contienen fragmentos del virus (antígenos). La inactivación (muerte) de los virus se efectúa, por ejemplo, mediante combinaciones de sustancias químicas/materiales, por ejemplo, formaldehído, beta-propiolactona o psoraleno. La envoltura del virus queda conservada. También existen vacunas de toxoides, que únicamente contienen el componente biológicamente inactivo (toxóide) de la toxina de un virus (por ejemplo el toxóide de tétano), que también están incluidas entre las vacunas muertas. En particular, una vacuna inactivada puede ser una vacuna escindida que consiste en fragmentos de las proteínas de la envoltura del virus. La destrucción (escisión) de la envoltura del virus puede efectuarse, por ejemplo, con detergentes o disolventes orgánicos fuertes. Además, los virus también pueden inactivarse (matarse) con sustancias químicas. Además las vacunas inactivadas incluyen vacunas de subunidades que consisten en componentes específicos del virus, por ejemplo, proteínas de hemaglutinina y neuroaminidasa.

En una inmunización pasiva, la vacuna a base de virus de la gripe preparada por en el procedimiento de la invención se administra a un hospedador (por ejemplo, un mamífero), se extrae el antisuero generado y se administra al receptor que está infectado con al menos un virus de la gripe.

Adicionalmente, para la administración la vacuna se mezcla con uno o más aditivos, tales como estabilizadores, neutralizadores, vehículos y conservadores. Estas sustancias incluyen formaldehído, timerosal, fosfato de aluminio, acetona y fenol. Además es posible mezclar la vacuna con adyuvantes para potenciar el efecto de la vacuna. Los denominados adyuvantes no deberán tener por sí mismos efectos farmacológicos y en particular servir como solubilizadores, emulsiones o mezclas de los mismos. Los adyuvantes son, por ejemplo, sales minerales, mezclas de escualeno, péptidos de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de la pared celular de microbacterias, determinadas emulsiones, monofosforil-lípido-A, derivados de ácido micólico, tensioactivos no iónicos de copolímeros de bloque, Quil A, subunidad de la toxina B de cólera, polifosfatenos y sus derivados, complejos estimuladores de la inmunidad, adyuvantes de citocina, adyuvante MF59, adyuvantes lipídicos, adyuvantes mucosales, determinadas exotoxinas bacterianas, determinados oligonucleótidos y PLG.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. A no ser que indique de otro modo, se usaron procedimientos biológicos moleculares convencionales como, por ejemplo, el que se describe por Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Ejemplo 1: experimentos de cultivo con la línea de amniocitos permanentes CAP-1D5 en medio PEM o 293SFMII

La línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 se cultivó en 100 ml de medio 293SFMII (Invitrogen) o medio PEM (Invitrogen) exento de suero a 37 °C, 8 % de CO₂ y 100 rpm. Como control se usó la línea celular de riñón canino permanente MDCK.SUS2 (Madin Darby Canine Kidney, adaptada a cultivo en suspensión) (Lohr y col., Vaccine, 2010, 28 (38):6256-64) en 100 ml de medio SMIF8 exento de suero en matraces vibratorios de 100 ml.

- 5 En el tiempo 0 (= inicio del cultivo) y en cada caso en un período de 24 h se determinaron el número de células vivas, el número de células muertas, la tasa de supervivencia de las líneas celulares así como el valor de pH, piruvato, la concentración de glucosa, lactosa, glutamina, amonio, ácido glutámico en el medio (sistema de análisis bioquímico multiparamétrico) (Lohr y col., Vaccine, 2009, 27(37), 4975-4982; Genzel y col., Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88 (2) :461-75) .
- 10 Los resultados se muestran en la Figura 1. Los números de células vivas de la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en medio 293SFMII, así como en medio PEM, así como las células MDCK.SUS2, a partir de aproximadamente 2×10^5 células por ml de cultivo al principio del cultivo mostraron un patrón similar y, después de 168 horas, alcanzaron un número de células vivas de aproximadamente 2×10^6 células por ml. A partir de 192 horas, el número de células vivas de las células MDCK.SUS2 cayó a 9×10^5 células por ml y se mantuvo constante hasta 240 h después del inicio de la curva de proliferación. El número de células vivas de la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en medio 293SFMII cayó solamente a las 216 horas al valor inicial de 2×10^5 células por ml de cultivo, sin embargo, el número de células vivas de las células CAP-1D5 en medio PEM se mantuvo estable hasta las 240 horas en aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por ml de cultivo y después de 312 horas alcanzó el valor inicial de número de células vivas de 2×10^5 células.
- 20 Al principio de la curva de proliferación y hasta las 168 horas, la tasa de supervivencia de las células CAP-1D5 en medio 293SFMII y medio PEM y las células MDCK.SUS2 varió entre 80 y 90 %. Hasta las 80 horas, la tasa de supervivencia de las células CAP-1D5 en medio PEM se mantuvo al 240 %, luego cayó a las 312 horas mostró todavía 10 %. La tasa de supervivencia de las células CAP-1D5 en medio 293SFMII ya era baja después de 168 horas y mostró aproximadamente 10 % después de 216 horas, la tasa de supervivencia de las células MDCK.SUS2 fue estacionaria de 168 h y alcanzó aproximadamente 45 % después de 240 horas.
- 25 El pH del cultivo de células MDCK.SUS2 fue relativamente estable entre 7,7 y 7,6 durante 240 horas. Sin embargo, el pH (inicialmente 7,4) del cultivo de células CAP-1D5 en el medio 293SFMII, así como en el medio PEM disminuyó de forma estacionaria hasta pH 6,4 después de 240 horas (medio 293SFMII) y 312 horas (medio PEM).

- 30 La concentración de lactosa aumentó desde las concentraciones iniciales inferiores a 5 mM en el medio 293SFMII y en el medio PEM del cultivo de células CAP-1D5 respectivo hasta 30-35 mM a las 240 horas. En el cultivo de células MDCK.SUS2, el aumento de la concentración de lactosa fue menos pronunciado, pero alcanzó un valor similar al del cultivo de células CAP-1D5 a las 240 horas. La concentración de glucosa disminuyó de 20 a 25 mM desde el inicio del cultivo de células CAP-1D5 en el medio 293SFMII y en el medio PEM, así como en el cultivo de células MDCK.SUS2 a menos de 10 mM, registrándose la disminución más fuerte en el cultivo de células CAP-1D5 en el medio 293SFMII.
- 35

- El aumento de la concentración de amonio en el cultivo de células CAP-1D5 en el medio 293SFMII así como en el medio PEM mostró un patrón muy similar (de < 0,5 a 4-5 mM). Contrariamente a esto, la concentración de amonio en el cultivo de células MDCK.SUS2 aumentó de forma significativamente más elevada (a 7 mM). La disminución de la concentración de glutamina fue de nuevo muy similar en el cultivo de células CAP-1D5 en el medio 293SFMII, así como en el medio PEM, apreciándose la mayor disminución en el medio PEM.
- 40

- La mayor concentración de ácido glutámico la presentó el cultivo de células MDCK.SUS2, y esta solamente aumentó ligeramente. La concentración de ácido glutámico en el cultivo de células CAP-1D5 en el medio PEM fue más alta al iniciarse el cultivo en comparación con la del medio 293SFMII, y aumentó de forma estacionaria. La concentración de piruvato en el cultivo de células MDCK.SUS2 disminuyó hasta cero después de 144 horas. Sin embargo, el piruvato ya se había consumido después de 48 horas en los cultivos de células CAP-1D5 en el medio 293SFMII o en el medio PEM.
- 45

- Así, las células CAP-1D5 mostraron en el medio PEM una mejor proliferación que en el medio 293SFMII. Las células CAP-1D5 mostraron en el medio PEM el mayor consumo de glucosa y la mayor formación de lactosa. La limitación de la glucosa a partir de 192 horas podría explicar la disminución del número de células de las células CAP-1D5 en el medio PEM. Para optimizar las condiciones de cultivo de los cultivos de células CAP-1D5 en el medio PEM o el medio 293SFMII podría ser relevante la estabilización del pH, la adición de piruvato y glutamina, así como de glucosa.
- 50

Ejemplo 2: Infección viral con virus no adaptados

- Para los experimentos de infección con virus no adaptados se cultivó la línea celular de amniocitos CAP-1D5 en 55 ml de medio 293SFMII (Invitrogen) y medio PEM (Invitrogen) exentos de suero a 37 °C, 8 % de CO₂ y 100 rpm en matraces vibratorios. Como control se usó la línea celular de riñón canino permanente MDCK.SUS2 (Madin Darby Canine Kidney, adaptada a suspensión).
- 55

Se infectaron cada una de las densidades celulares listadas en la Tabla 1 con el virus B/Florida/4/2006 (NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control) y A/PR/8/34 (H1N1) (RKI, Robert-Koch-Institut) sin cambio de medio y con la adición de 5×10^{-6} U/ml de tripsina. La cantidad de partículas de virus producidas se determinó mediante valoración de la hemaglutinina (HA, hemoaglutinación por procedimientos convencionales) (representado en unidades log HA/100 μ l; Tabla 1) (Kalbfuss y col., 2008; Biologicals 36(3):145-61). Además, en la Tabla 1 se muestran los respectivos valores de pH del medio en el momento.

Tabla 1: Resumen de los experimentos de infección viral con virus no adaptados en infección sin cambio de medio

Célula	Medio	Virus	N.º de células vivas/ml a 0 hpi*	pH a HA, HA	
				Máx	Máx
ID5	293SFM	B/Florida	2,70E+06	6,6	0,87
ID5	PEM	B/Florida	2,40E+06	6,6	0
ID5	293SFM	A/PR/8/4	2,70E+06	6,6	1,19
ID5	PEM	A/PR/8/4	2,50E+06	6,6	0
MDCK.sus	SMIF8	B/Florida	1,50E+06	7,5	0
MDCK.sus	SMIF8	A/PR/8/4	1,60E+06	7,7	1,84

* hpi: Horas después de la infección

Para la línea celular de amniocitos permanente CAP-1D5 cultivada en el medio PEM no se pudo comprobar la producción de partículas de virus ni con la infección con el virus B/Florida/4/2006 (B/Florida) ni con el virus A/PR/8/34. El valor HA máximo para A/PR/8/34 (H1N1) en medio 293SFMII fue inferior al valor HA máximo alcanzado en MDCK.SUS2. El pH a HA máximo fue comparable para todas las infecciones en CAP-1D5 (pH 6,6), pero fue significativamente menor que en células MDCK.SUS2 infectadas (pH 7,7).

Así, una infección de la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en las condiciones probadas solo tuvo lugar con el virus B/Florida. En el caso de la línea celular de riñón canino permanente MDCK.SUS2 (Madin Darby Canine Kidney), sin embargo, solo se pudo detectar una infección para el virus A/PR/8/34 (H1N1). En experimentos siguientes se probó si mediante una adaptación previa de los virus a las células CAP-1D5 era posible obtener una mejor infección y, así, un mayor rendimiento de virus.

Ejemplo 3: Adaptación de virus a células CAP-1D5 en medio PEM y 293SFMII en el matraces vibratorios

La adaptación de virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) (RKI, Robert-Koch-Institut), A/Uruguay/716/2007 (H3N2) (NYMC X-175C, NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control) o B/Florida/4/2006 (NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control) se efectuó mediante infección de CAP-1D5 mediante 4 pases en matraces vibratorios en medio PEM y 293SFMII. Antes de cada infección se cambió el medio. El rendimiento de virus durante cada pase se determinó por valoración de la hemaglutinina (unidades log HA/100 μ l y por el ensayo Tissue Culture Infectious Dose₅₀ (dosis₅₀ infecciosa en cultivos de tejidos) (TCID₅₀, número de virus/ml) (Genzel and Reichl, Vaccine production - state of the art and future needs in upstream processing in Methods in Biotechnology: Animal Cell Biotechnology - Methods and Protocols, Editores R. Pörtner, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007, 457-473; Kalbfuss y col., 2008; Biologicals 36(3): 145-61).

Los resultados se muestran en la Figura 2. La infección de las células CAP-1D5 con el virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) y A/Uruguay/716/2007 (H3N2) dieron lugar, tanto en el medio PEM como en el medio 293SFMII, a títulos virales notablemente incrementados después de 4 pases. La infección de las células CAP-1D5 con el virus de la gripe B/Florida/4/2006 dio lugar, tanto con el cultivo en medio 293SFMII como en el medio PEM, a un aumento significativo del título viral en el segundo pase. Un aumento comparable lo mostró también la valoración del valor HA durante la infección de células CAP-1D5 con el virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) y A/Uruguay/716/2007 (H3N2) tanto en el medio PEM como en el medio 293SFMII.

Junto con un aumento del título viral en la adaptación, con cada pase también se volvió más rápida la replicación del virus y finalmente se pudo incrementar el título viral de forma significativa. En general, parece ser que en el medio 293SFMII se obtiene un ligero incremento en los títulos virales en comparación con el medio PEM.

Ejemplo 4: MOI (multiplicidad de infección) en función de la infección de células CAP-1D5 y MDCK.SUS2 con gripe A/PR/8/34 adaptada

Se probó aquí con el virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1; RKI, Robert-Koch-Institut) la dependencia de MOI del

número de partículas virales por célula huésped, con 3 diferentes valores de MOI 0,0025, 0,025 y 0,25. Se infectaron amniocitos permanentes en CAP-1D5 en medio 293SFMI y medio PEM, e igualmente células de riñón canino permanentes MDCK.SUS2 en medio SMIF8 en matraces vibratorios con diferentes MOI del virus de la gripe A/PR/8/34 adaptado. Una vez infectados, se llevó a cabo además un cambio de medio para mantener el valor de pH casi constantes alrededor de pH = 7,5. A continuación, se determinó durante 96 horas el número de células vivas y durante 114 horas la cantidad de las partículas de virus (unidades log HA/100 μ l) mediante valoración de la hemaglutinina en la prueba de hemoaglutinación de acuerdo a procedimientos convencionales.

Los resultados se muestran en la Figura 3. El desarrollo del número de células vivas, así como el desarrollo de la cantidad de partículas de virus formadas en el cultivo de células CAP-1D5 en medio 293SFMI y el cultivo de células MDCK.SUS2 en el medio SMIF8 no muestra dependencia de los valores MOI. El título viral aumentó hasta aproximadamente 2,5 unidades log HA/100 μ l en los dos cultivos. El cultivo de células CAP-1D5 en medio PEM mostró para los tres valores de MOI menores cantidades (aproximadamente 2,0 unidades log HA/100 μ l) de partículas de virus. De manera correspondiente con esto, el número de células vivas del cultivo de células CAP-1D5 en el medio PEM durante 48 horas permaneció constante en 1×10^6 células/ml y luego cayó a menos de 1×10^4 células/ml. Por el contrario, el número de células vivas en los cultivos de células CAP-1D5 en el medio 293SFMI y del cultivo de células MDCK.SUS2 disminuyó de forma constante de 1×10^6 células/ml a menos de 1×10^4 células/ml después de 96 horas. En todos los cultivos se observó un ligero retardo de la replicación de virus a una MOI de 0,0025, que se pudo comprobar mediante un aumento temporalmente retardado de las unidades log HA en comparación con los valores MOI más altos.

Ejemplo 5: Cultivo a escala de 1 l con infección (A/PR/8/34 adaptado)

Las células CAP-1D5 se cultivaron en un biorreactor de 1 litro en medio PEM con glutamina 4 mM y piruvato 4 mM a 85 rpm, pH = 7,2 y una presión parcial de oxígeno pO₂ de 40 % de oxígeno puro. El número de células inicial fue de 5×10^5 células/ml.

Después de 114 horas de proliferación y un número de células de $2,4 \times 10^6$ células/ml, las células CAP-1D5 se infectaron con el virus de la gripe A/PR/8/34 (adaptado: en PEM, 4^o pase, $1,78 \times 10^7$ virus/ml). No se llevó a cabo un cambio de medio, pero se añadieron 80 ml al medio PEM, y también glutamina y piruvato en una concentración final de respectivamente 2 mM. El valor MOI fue de 0,025 y se añadió tripsina en una concentración final de 1×10^{-5} U/ml. Durante 240 horas, y en períodos de 24 horas, se determinaron el número de células vivas, el número de células muertas, la tasa de supervivencia de las líneas celulares, así como el pH, la concentración de glucosa, lactosa, glutamina, amonio, ácido glutámico y piruvato en el medio. Además, desde el momento de la infección (114 horas) se determinaron las unidades log HA /100 μ l y los valores TCID₅₀ (Genzel and Reichl, Vaccine production determined - state of the art and future needs in upstream processing in Biotechnology: Animal Cell Biotechnology - Methods and Protocols, Eds R. Pörtner, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007, 457-473; Kalbfuss y col., 2008; Biologicals 36(3): 145-61).

Los resultados se muestran en la Figura 4. El número de células vivas de las células CAP-1D5 aumentó inicialmente hasta la infección con el virus de la gripe A/PR/8/34 de 6×10^5 células/ml a $2,4 \times 10^6$ células/ml y disminuyó ligeramente después de la infección. La tasa de supervivencia de las células CAP-1D5 durante todo el período de tiempo fue de 80 - 90 %, y después de 240 horas disminuyó a 70 %. La concentración de piruvato en el cultivo disminuyó en 72 horas hasta cero, la cantidad de piruvato añadida en el momento de la infección con el virus de la gripe se consumió igualmente en 10 horas. La concentración de glutamina aumentó durante todo el tiempo de manera estacionaria de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1,8 mM. Con unas pocas variaciones, el pH del cultivo observado fue de 7,1 a 7,4. El título TCID₅₀ máximo obtenido fue de $2,4 \times 10^7$ virus/ml, el título HA máximo fue de 2,2 unidades log HA/100 μ l.

Los resultados de este experimento de proliferación muestran que no se produjo limitación de glucosa debida a la alimentación de piruvato y, así, el número de células vivas no desploma.

Ejemplo 6: Adaptación de virus a células CAP-1P5 en medio PEM y 293SFMI en tubos Falcon de 50 ml

La adaptación de los virus de la gripe A/Brisbane/59/2007 (HGR tipo H1N1: IVR-148, NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control), B/Florida/4/2006 (NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control), gripe porcina (A/Swine (H1N2) Bakum/1832/00; IDT biologics) y gripe equina (A/Equine 2 (H3N8); A/Newmarket/1/93; NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control) se efectuó mediante infección de CAP-1D5 mediante 4 pases en tubos Falcon de 50 ml en medio PEM y 293SFMI. Antes de cada infección se llevó a cabo un cambio de medio. El rendimiento de virus durante cada pase se cuantificó mediante valoración de la hemaglutinina (unidades log HA/100 μ l) y mediante el ensayo Tissue Culture Infectious Dose₅₀ (TCID₅₀, número de virus/ml) (Genzel and Reichl, Vaccine production - state of the art and future needs in upstream processing in Methods in Biotechnology: Animal Cell Biotechnology - Methods and Protocols, Ed R. Pörtner, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007, 457-473; Kalbfuss y col., 2008; Biologicals 36(3):145-61) .

Los resultados se muestran en la Figura 5. La infección de las células CAP-1D5 con el virus de la gripe A/Brisbane/59/2007 y B/Florida/4/2006, tanto en el medio PEM como en el medio 293SFMI dio lugar a títulos virales

significativamente incrementados, mientras que el incremento del título viral fue mayor en el medio 293SFMI. Un incremento similar lo mostró también la valoración del valor HA en la infección de las células CAP-1D5 con el virus de la gripe A/Brisbane/59/2007 y B/Florida/4/2006, tanto en el medio PEM como en el medio 293SFMI. La infección de las células CAP-1D5 con el virus de la gripe porcina da lugar a un incremento de la valoración del valor HA tanto en el medio PEM como en medio 293SFMI.

Junto con un incremento del título viral por vía de la adaptación, la replicación del virus se hizo más rápida con cada pase y finalmente se pudo aumentar de forma significativa el título viral. En general, parece ser que en el medio 293SFMI se obtiene un ligero incremento en los títulos virales en comparación con el medio PEM.

Ejemplo 7: Experimentos de cultivo con la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 a un número inicial de células elevado

La línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 se disolvió en 100 ml de medio PEM (Invitrogen) a 37 °C, 8 % de CO₂ y 185 rpm. El número inicial de células fue de 5×10^5 células/ml y 8×10^5 células/ml, respectivamente. Adicionalmente, se añadió piruvato en los lotes con un número incrementado de células iniciales en una concentración final de 4 mM y de 10 mM. También se añadieron otros aminoácidos.

En el tiempo 0 (= inicio del cultivo) y en cada caso en un período de 24 horas se determinaron el número de células vivas, el número de células muertas, la tasa de supervivencia de las líneas celulares así como el pH, la concentración de glucosa, lactosa, glutamina, amonio, ácido glutámico y piruvato en el medio (sistema de análisis bioquímico multiparamétrico) (Lohr y col., Vaccine, 2009, 27(37), 4975-4982; Genzel y col., Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(2) :461-75).

Los resultados se muestran en la Figura 6. Aumentando el número inicial de células de aproximadamente 5×10^5 células por ml de cultivo al inicio del cultivo hasta 8×10^5 células por ml de cultivo de la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en medio PEM se obtuvo un rendimiento adicional de 1×10^6 células por ml de cultivo a las 90 horas. En el momento típico de la infección (aproximadamente 96 horas y 120 horas después del inicio del cultivo) se obtuvo un número de células de $5-6 \times 10^6$ células por ml de cultivo.

En el momento típico de la infección (aproximadamente 96 horas a 120 horas después del inicio del cultivo) el pH del cultivo estaba en un intervalo más bien crítico de 6,6-6,8. Preferiblemente, el pH en la infección debería encontrarse a aproximadamente 7,2-7,4 al infectar.

Ejemplo 8: Efectos de la variación de la actividad de tripsina y de llevar a cabo un cambio de medio y una dilución 1:2 con medio sobre el título viral

Este experimento se realizó para investigar cómo afectará el título del virus el uso de diferentes concentraciones de tripsina en la infección del virus y un cambio de medio, o una dilución 1:2 del medio.

La línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 se cultivó en 100 ml de medio PEM (Invitrogen) con piruvato 4 mM y glutamina a 37 °C, 8 % de CO₂ y 185 rpm en matraces vibratorios. La línea celular se infectó en el momento del inicio del cultivo con virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1; RKI, Robert-Koch-Institut) adaptado a las células CAP-1D5. En el momento de la infección el número de células en el cultivo fue de $4,5 \times 10^6$ células/ml de cultivo si no tuvo lugar un cambio de medio antes de la infección, y de $2,3 \times 10^6$ células/ml de cultivo si tuvo lugar una dilución 1:2 con medio PEM antes de la infección, y de 5×10^6 células/ml si se realizó un cambio completo de medio antes de la infección. Además, en los cultivos sin cambio de medio y con una dilución 1:2 con medio PEM se usaron concentraciones de tripsina de 1×10^{-4} U/célula, 3×10^{-5} U/célula y 5×10^{-5} U/célula. En los cultivos con cambio completo de medio se usaron concentraciones de tripsina de 1×10^{-4} U/célula, 1×10^{-5} U/célula, 5×10^{-5} U/célula y 1×10^{-6} U/célula o no se usó tripsina.

Los resultados se muestran en la Figura 7. La dilución 1:2 con medio PEM fresco conduce a un aumento prematuro de HA (aproximadamente 12 horas en lugar de 24 horas) y a mayores valores máximos de HA - 2,70 log HA comparado con 2,30 log HA de los cultivos en los que no se efectuó un cambio de medio. Un cambio de medio completo dio lugar a mayores valores HA que fueron superiores a 3,0 log HA.

En cultivos sin cambio de medio y con una dilución 1:2 con medio PEM, los valores log HA fueron muy similares independientemente de la concentración de tripsina. En los cultivos en los que se llevó a cabo un cambio de medio completo, los valores log HA fueron muy similares en las concentraciones de tripsina 1×10^{-5} U/célula, 5×10^{-5} U/célula y 1×10^{-6} U/célula. En el cultivo sin tripsina, el valor log HA solo alcanzó un valor de aproximadamente 2 unidades log HA/100 µl, y en el cultivo en el que se usó 1×10^{-4} U/célula de tripsina para la infección, el valor log HA fue inferior a 1 unidad log HA/100 µl.

Ejemplo 9: Dependencia de MOI (multiplicidad de infección) de la infección de células CAP-1P5 en medio PEM con diferentes cepas de virus de la gripe adaptadas, con y sin realización de un cambio de medio en la infección

Con el presente experimento se investigó la dependencia entre el valor MOI, es decir, la relación numérica del virus

usado para la infección y el número de partículas del número de las células CAP-1D5 a infectar y el título viral (en unidades log HA por 100 µl de cultivo).

Para este propósito, se cultivó en matraces vibratorios la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en 50 ml de medio PEM (Invitrogen) con piruvato 4 mM y glutamina a 37 °C, 8 % de CO₂ y 18 5 rpm. Se probó la dependencia de MOI tanto sin cambio de medio y con cambio de medio del cultivo antes de la infección. Se usaron tres cepas diferentes virus de la gripe adaptadas: A/PR/8/34 (RKI, Robert-Koch-Institut), A/Brisbane/59/2007 (IVR-148, NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control) y B/Florida/4/2006 (NIBSC, The National Institute for Biological Standards and Control). La infección se efectuó en matraces vibratorios de 50 ml con una concentración de células en la inoculación de $4,9 \times 10^6$ células/ml (sin cambio de medio) y $5,0 \times 10^6$ células/ml (con cambio de medio). La infección se efectuó a valores de MOI de 0,25 y 0,10 (para el virus de la gripe A/Brisbane), 0,025 y 0,0025 si no se efectuó cambio de medio y a valores de MOI de 0,10 y 0,06 (para el virus de la gripe A/Brisbane), 0,025 y 0,0025 cuando se efectuó un cambio de medio. La actividad de tripsina fue de 1×10^{-4} U/célula sin cambio de medio y de 1×10^6 U/célula con cambio de medio. A continuación se determinó durante 144 horas la cantidad de partículas de virus (unidades log HA /100 µl) (Kalbfuss y col., 2008: Biologicals 36(3): 145-61).

Los resultados se muestran en la Figura 8. Efectuar un cambio de medio da lugar a resultados más consistentes en la replicación de virus. Una dependencia de MOI solo puede identificarse en células infectadas con el virus de la gripe A/PR/8/34 sin cambio de medio y en células infectadas con el virus de la gripe A/Brisbane con cambio de medio. Con el cambio de medio se alcanzan valores log HA considerablemente mayores. Los valores de pH sin cambio de medio estuvieron parcialmente en el intervalo crítico de 6,6 a 6,8, y con cambio de medio en el intervalo de 7,3 a 7,5.

Ejemplo 10: Cultivo adicional a escala de 1 l en biorreactores STR y Wave con infección (A/PR/8/34 adaptado)

En una técnica (B16), se cultivaron células CAP-1D5 en un biorreactor STR de 1 litro (Sartorius) en medio PEM con glutamina 4 mM y piruvato 4 mM a 120 rpm, pH = 7,2 y una presión parcial de oxígeno pO₂ de 40 % con oxígeno puro. El número inicial de células fue de 5×10^5 células/ml. Después de 72,75 horas de proliferación y un número de células de $2,1 \times 10^6$ células/ml, las células CAP-1D5 se infectaron con virus de la gripe A/PR/8/34 (adaptado: en PEM, 4º pase, $2,01 \times 10^6$ virus/ml). No se llevó a cabo cambio de medio. El valor MOI fue de 0,025 y se añadió tripsina en una concentración final de 3×10^{-5} U/ml.

En otra técnica (B26), se cultivaron células CAP-1D5 en un biorreactor STR de 1 litro (Sartorius) en medio PEM a 120 rpm, pH = 7,4 a 7,2 y una presión parcial de oxígeno pO₂ de 40 % con oxígeno puro. El número inicial de células fue de 8×10^5 células/ml. Después de 92 horas de proliferación las células CAP-1D5 (adaptado: en PEM, 4º pase, $3,75 \times 10^6$ virus/ml) se infectaron con virus de la gripe A/PR/8/34. Previamente se llevó a cabo un cambio completo de medio y el pH se ajustó en 7,6. El valor MOI fue de 0,025 y se añadió tripsina en una concentración final de 3×10^{-5} U/ml.

En una tercera técnica (wave), se cultivaron células CAP-1D5 en un biorreactor Wave de 1 litro (Wave Biotech AG) en medio PEM con glutamina 4 mM y piruvato 4 mM y glucosa 20 mM con una frecuencia de agitación de 13 rpm, con un ángulo de 7°, pH = 7,3 a 6,9 y una presión parcial de oxígeno pO₂ de 40 % en oxígeno puro y una presión parcial de CO₂ de 7,5 %. El número inicial de células fue de 5×10^5 células/ml. Después de 72 horas de proliferación, las células CAP-1D5 (adaptado: en PEM, 4º pase, $1,87 \times 10^5$ virus/ml) se infectaron con virus de la gripe A/PR/8/34. El número de células antes de la infección fue de $2,1 \times 10^6$ células/ml. No se llevó a cabo un cambio de medio. El valor MOI fue de 0,025 y se añadió tripsina en una concentración final de 3×10^{-5} U/ml.

En una cuarta técnica, se cultivaron células MDCK.SUS2 en el biorreactor STR de 1 litro (Sartorius) en medio AEM. El número inicial de células fue de 5×10^5 células/ml. Después de 118,25 horas de proliferación, las células MDCK.SUS2 se infectaron con virus de la gripe A/PR/8/34 (Lohr y col., Vaccine, 2010, 28(38):6256-64).

Los resultados están representados en la Figura 9. Durante 192 horas se determinaron el número de células vivas y el número de células muertas, así como el pH, la concentración de glucosa, lactosa, glutamina, amonio, ácido glutámico y piruvato en el medio. Además, a partir del momento de la infección se determinaron las unidades log HA /100 µl y los valores TCID₅₀ (Genzel and Reichl, Vaccine production determined - state of the art and future needs in upstream processing in Methods in Biotechnology: Animal Cell Biotechnology - Methods and Protocols, Eds R. Pörtner; Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007, 457-473; Kalbfuss y col., 2008; Biologicals 36(3): 145-61).

Las células CAP-1D5 proliferan más rápido en las tres preparaciones y con mayor densidad al comparar con las células MDCK.SUS2. Los títulos virales en los cultivos celulares CAP-1D5 alcanzan un valor máximo de aproximadamente 2,5 para las unidades log HA /100 µl. El título viral del cultivo celular MDCK.SUS2 alcanza un valor máximo de aproximadamente 3 para las unidades log HA /100 µl. Los títulos virales en los cultivos celulares CAP-1D5 aumentan mucho antes en comparación con el título viral en el cultivo celular MDCK.SUS2.

Ejemplo 11: Ensayo de cultivo para aumentar el rendimiento de virus en matraces vibratorios en medio PEM o 293SFMI o con cambio de medio 1:1 o completo antes de la infección

Para optimizar el rendimiento de virus en los cultivos celulares CAP-1D5 que se cultivan en matraces vibratorios, las

células CAP y D5 se cultivaron en medios 293SFMI (Invitrogen) y PEN (Invitrogen) y se llevó a cabo un cambio de medio 1:1 o un cambio completo de medio.

- 5 Se cultivó la línea celular de amniocitos permanentes CAP-1D5 en 50 ml de medio PEM con glutamina 4 mM y piruvato 4 mM de piruvato a 37 °C, 8 % de CO₂ y 100 rpm en matraces vibratorios de 100 ml. A partir de la infección de las células con el virus de la gripe A/PR/8/34 con una MOI de 0,025 se llevó a cabo un cambio de medio. Si se efectuó un cambio de medio 1:1, al infectar las células se usó tripsina en una concentración de 1 x 10⁻⁵ U/célula. Si se llevó a cabo un cambio un cambio completo de medio, al infectar las células se usó tripsina en una concentración de 1 x 10⁻⁶ U/célula. El cambio de medio se efectuó tanto con medio PEM como con medio 293SFMI. La concentración de células al infectar fue de 5 x 10⁶ células/ml.
- 10 Los resultados se muestran en la Figura 10. Durante 72 horas, se determinaron el número de células vivas, la tasa de supervivencia, el pH, así como las unidades log HA /100 µl mediante valoración de la hemaglutinina en un proceso convencional (Lohr y col., Vaccine, 2009, 27(37), 4975-4982; Genzel y col., Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(2):461-75).
- 15 El título viral aumentó más rápido en aquellos cultivos celulares en los cuales antes de la infección con el virus de la gripe A/PR/8/34 se llevó a cabo un cambio completo de medio que en los cultivos celulares en los que se llevó a cabo un cambio de medio 1:1. Además, los títulos virales de los cultivos celulares en los que antes de la infección con el virus de la gripe A/PR/8/34 se llevó a cabo un cambio completo de medio alcanzaron un título viral máximo mayor que en los cultivos celulares en los que se llevó a cabo un cambio de medio 1:1.
- 20 El número de células vivas de los cultivos celulares con cambio de medio completo antes de la infección disminuyó de 5 x 10⁶ células/ml después de 24 horas, de modo que fue de aproximadamente 2 x 10⁴ células/ml después de 48 horas. El cultivo celular con medio PEM y cambio de medio 1:1 antes de la infección disminuyó menos bruscamente. En este caso, el número de células vivas después de 72 horas fue todavía de aproximadamente 7 x 10⁵ células/ml.

El pH en todos durante todo el período de tiempo de 72 horas estuvo en el intervalo de 7,6 a 7,2.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe, que comprende:
 - a) infectar un amniocito humano permanente con un virus de la gripe;
 - 5 b) cultivar el amniocito humano permanente;
 - c) expresar el virus de la gripe; y
 - d) aislar el virus de la gripe del medio,en el que el amniocito humano permanente expresa los productos génicos adenovirales E1A y E1B.
- 10 2. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según la reivindicación 1, en el que el amniocito humano permanente se encuentra en la fase de proliferación exponencial o entre la fase de proliferación exponencial y la fase de proliferación estacionaria en el momento de la infección con el virus de la gripe.
3. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según la reivindicación 1, en el que el aislamiento del virus de la gripe del medio en la etapa d) se efectúa por centrifugación diferencial o zonal en gradiente de densidad.
- 15 4. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según la reivindicación 1, en el que los productos génicos adenovirales E1A y E1B comprenden los nucleótidos 1 a 4344, 505 a 3522 o los nucleótidos 505 a 4079 del adenovirus humano serotipo-5.
5. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el amniocito humano permanente expresa el producto génico adenoviral pIX.
- 20 6. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, antes de la infección con un virus de la gripe, tiene lugar un cambio completo de medio o una dilución 1:2 con medio.
7. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la infección con un virus de la gripe se añade una concentración de tripsina de 1×10^{-4} U/célula, 1×10^{-5} U/célula, 3×10^{-5} U/célula, 5×10^{-5} U/célula o 1×10^{-5} U/célula.
- 25 8. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la infección con un virus de la gripe se usa una cantidad de virus indicada como valor MOI en el intervalo de 0,001 a 0,3.
9. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el virus de la gripe es un virus de la gripe humana, un virus de la gripe equina o un virus de la gripe porcina.
- 30 10. Procedimiento de producción de una vacuna a base de virus de la gripe según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el virus de la gripe se selecciona de las cepas de virus de la gripe A/PR/8/34, A/Uruguay/716/2007, A/Brisbane/59/2007, B/Florida/4/2006, gripe porcina (A/Swine (H1N2) Bakum/1832/00) o gripe equina (A/Equine, A/Newmarket/1/93 (H3N8)).
- 35 11. Uso de un amniocito humano permanente para la producción de una vacuna a base de virus de la gripe, en el que el amniocito humano permanente expresa los productos génicos adenovirales E1A y E1B.

Fig. 1A

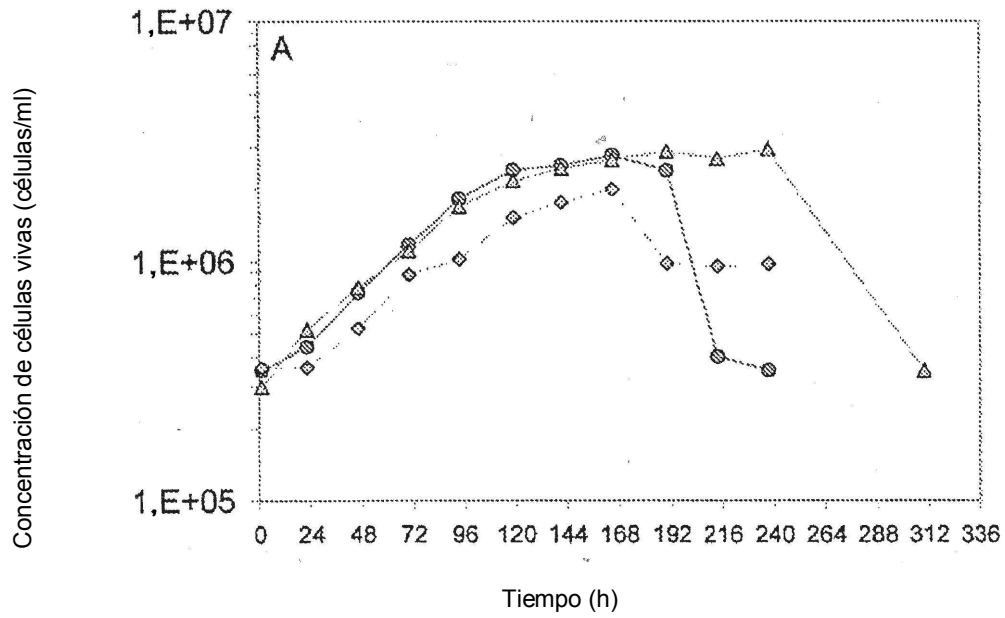


Fig. 1B

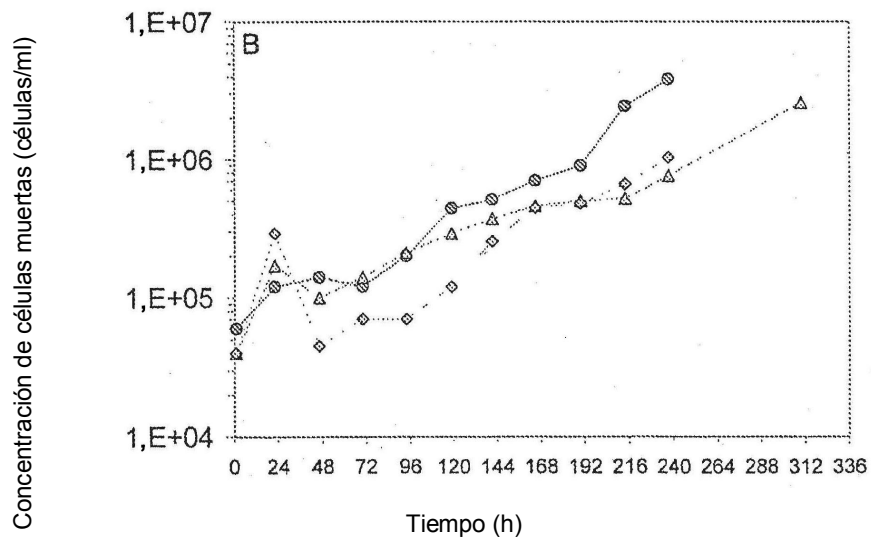


Fig. 1C

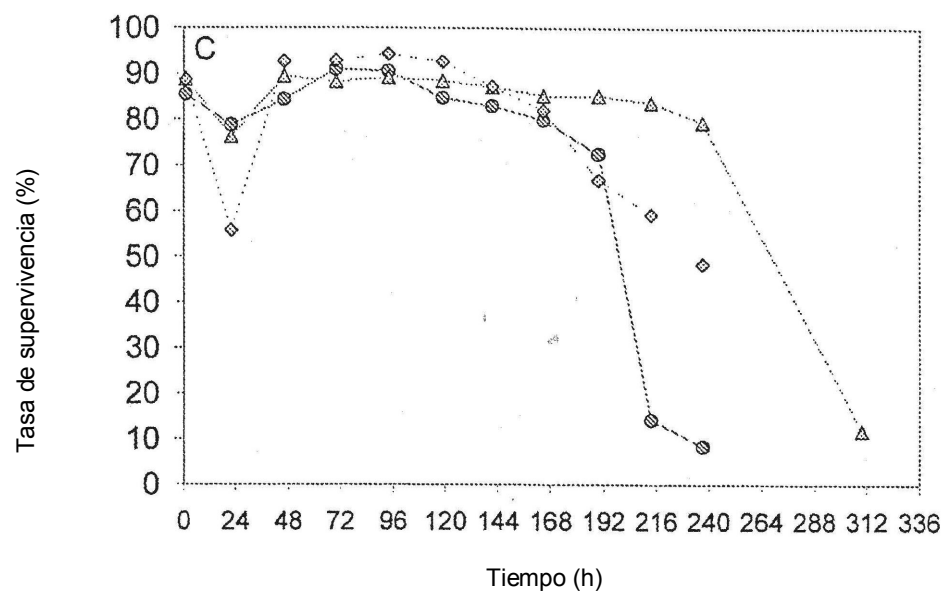


Fig. 1D

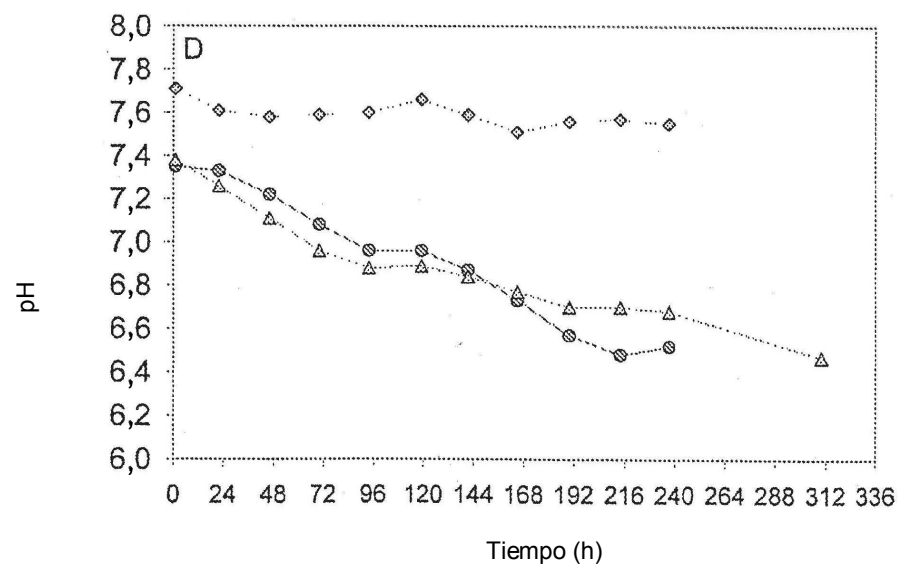


Fig. 1E

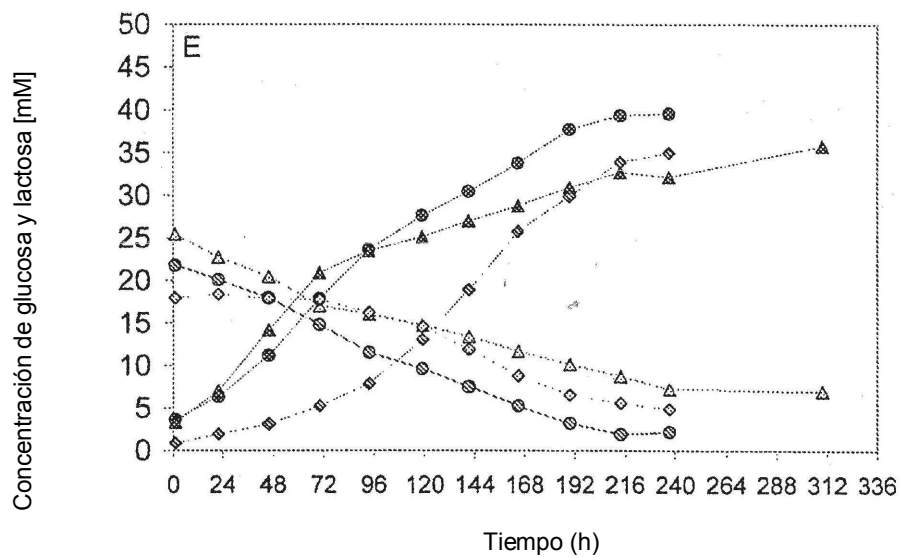


Fig. 1F

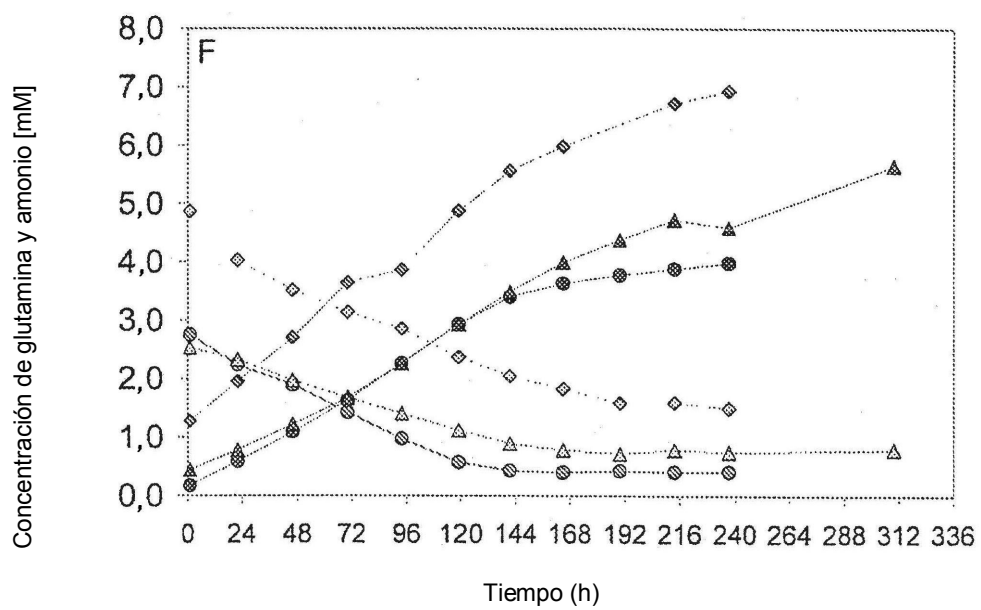


Fig. 1G

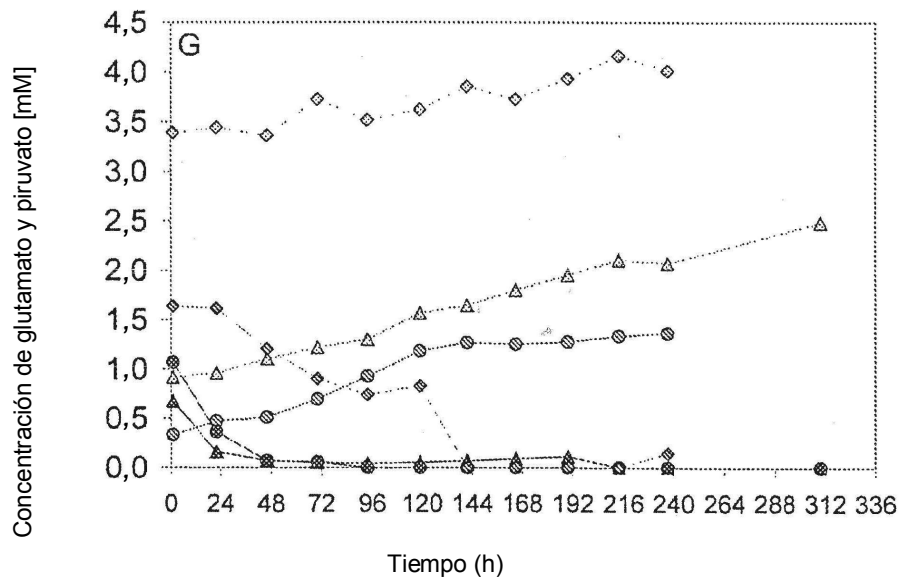


Fig. 2

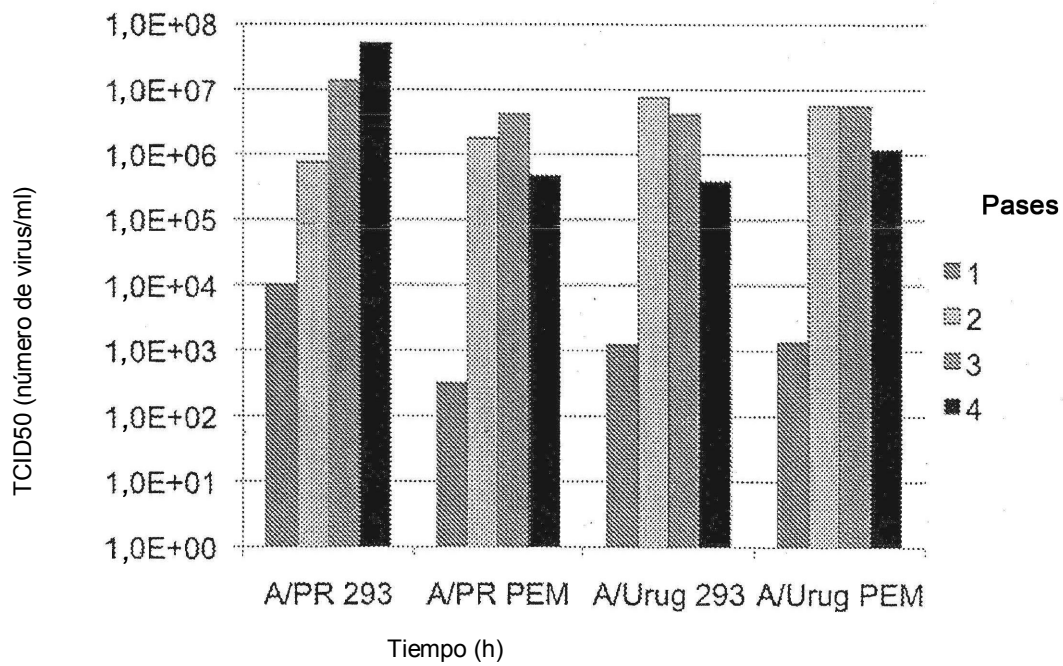


Fig. 3A

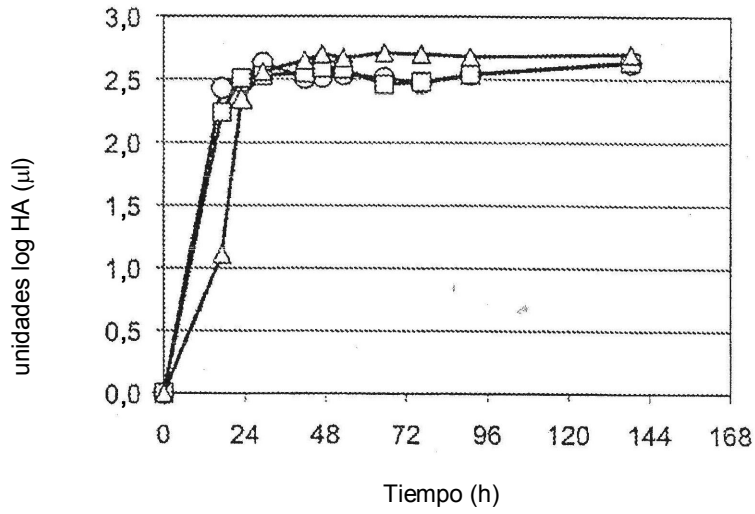


Fig. 3B

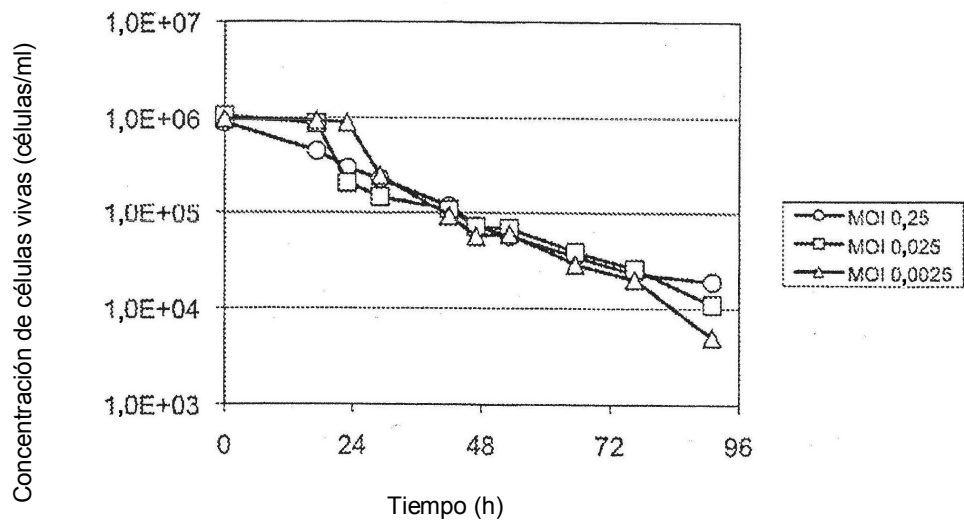


Fig. 3C

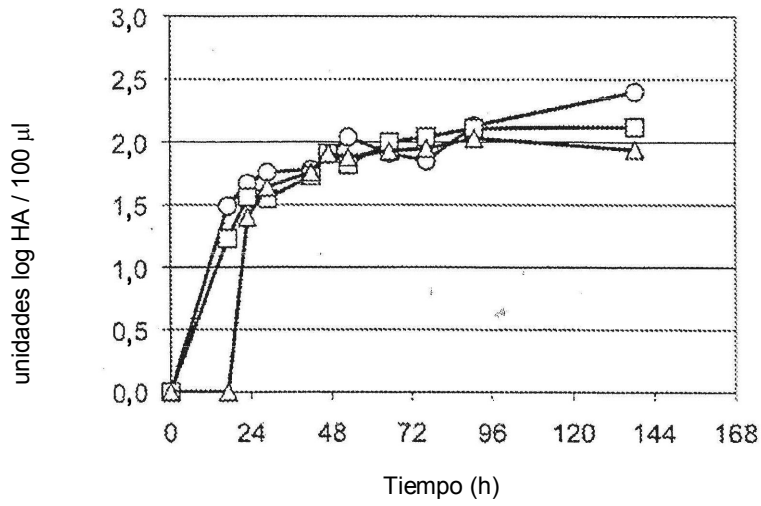


Fig. 3D

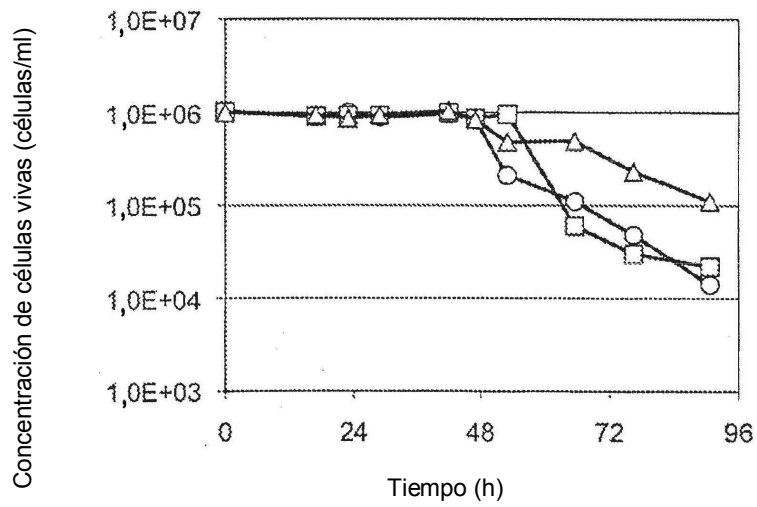


Fig. 3E

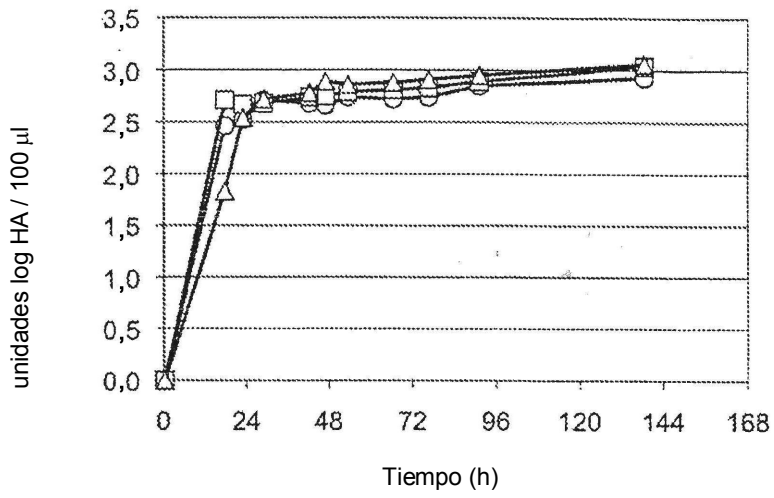


Fig. 3F

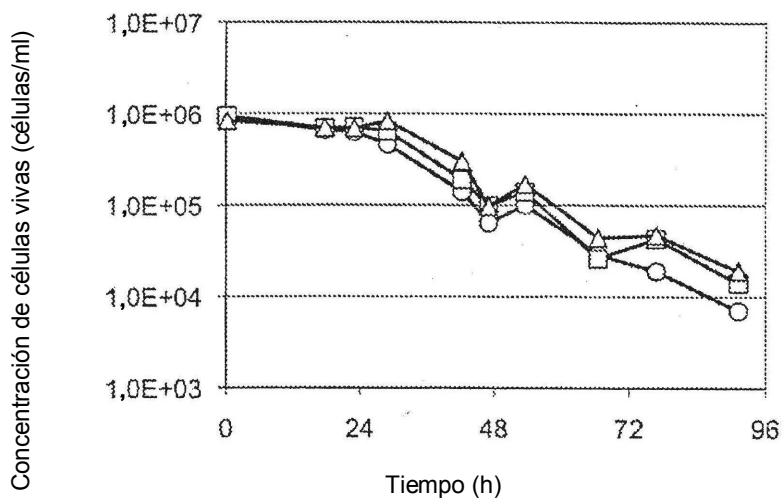


Fig. 4A

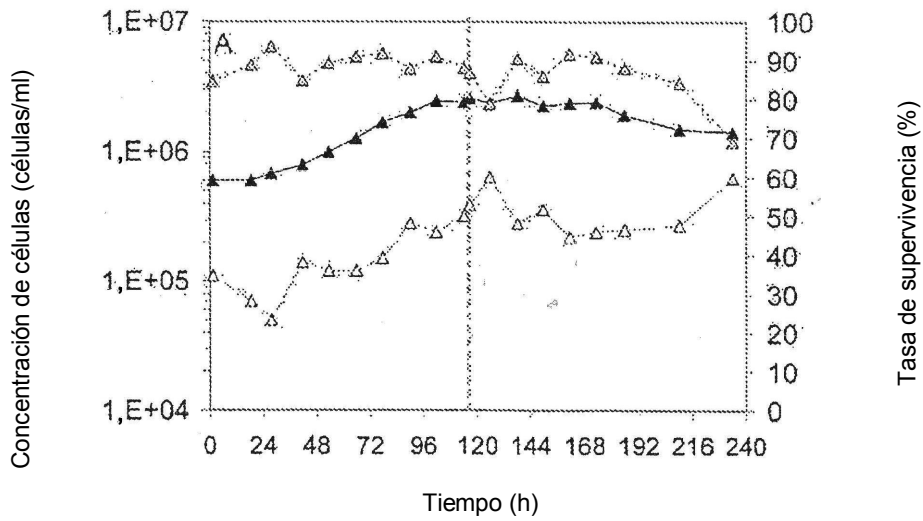


Fig. 4B

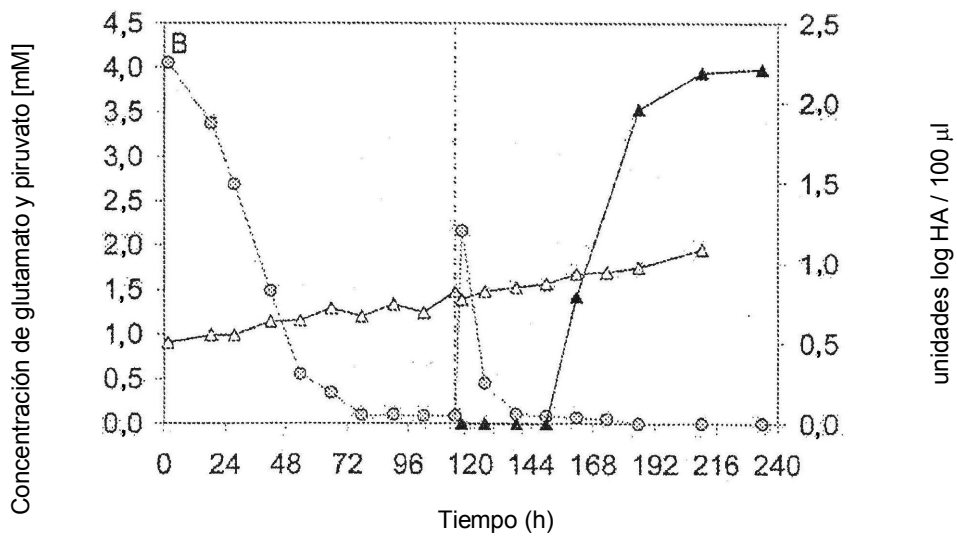


Fig. 4C

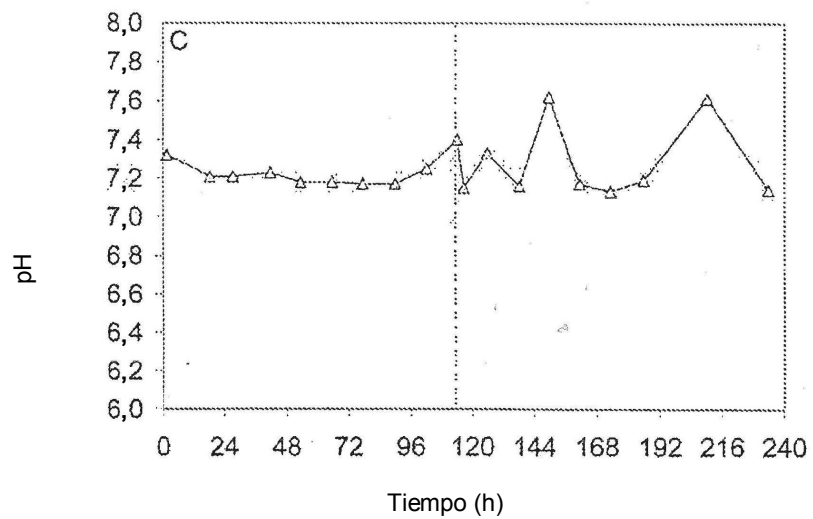


Fig. 4D

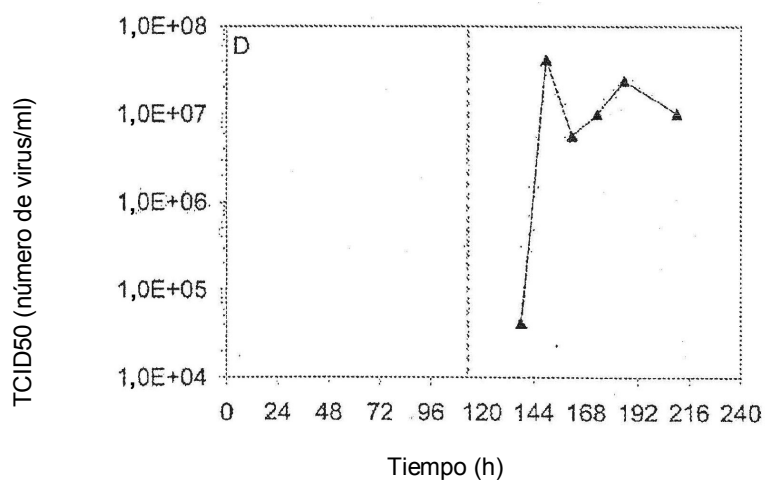


Fig. 5A

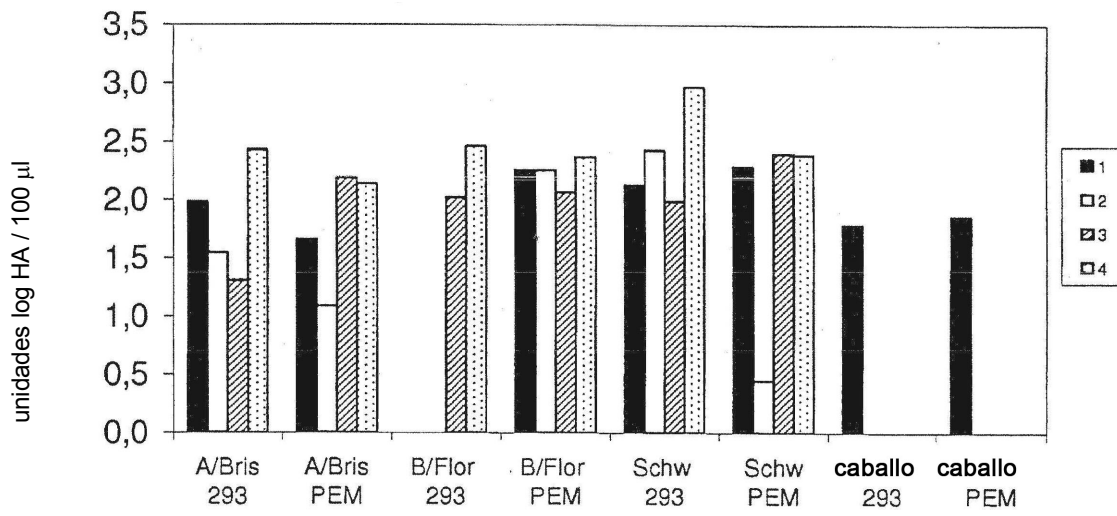


Fig. 5B

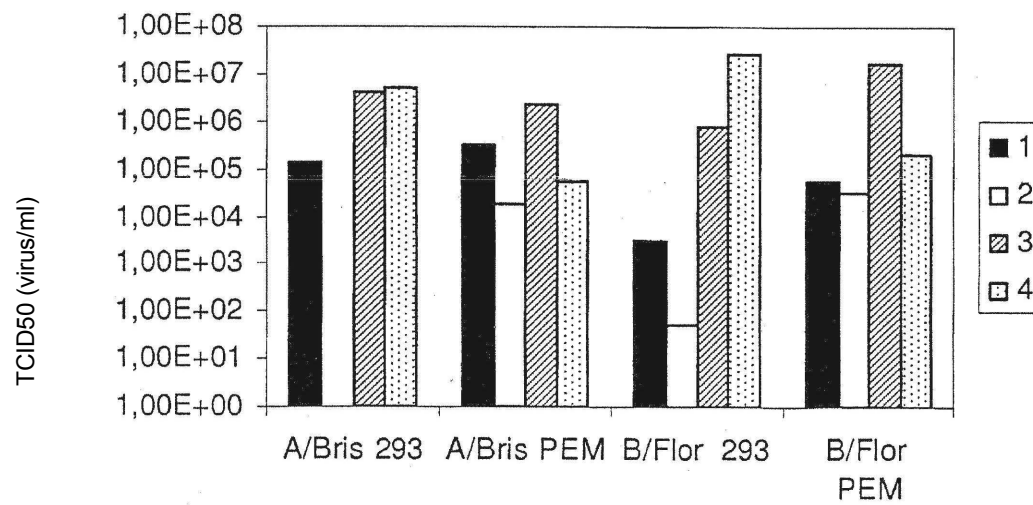


Fig. 6A

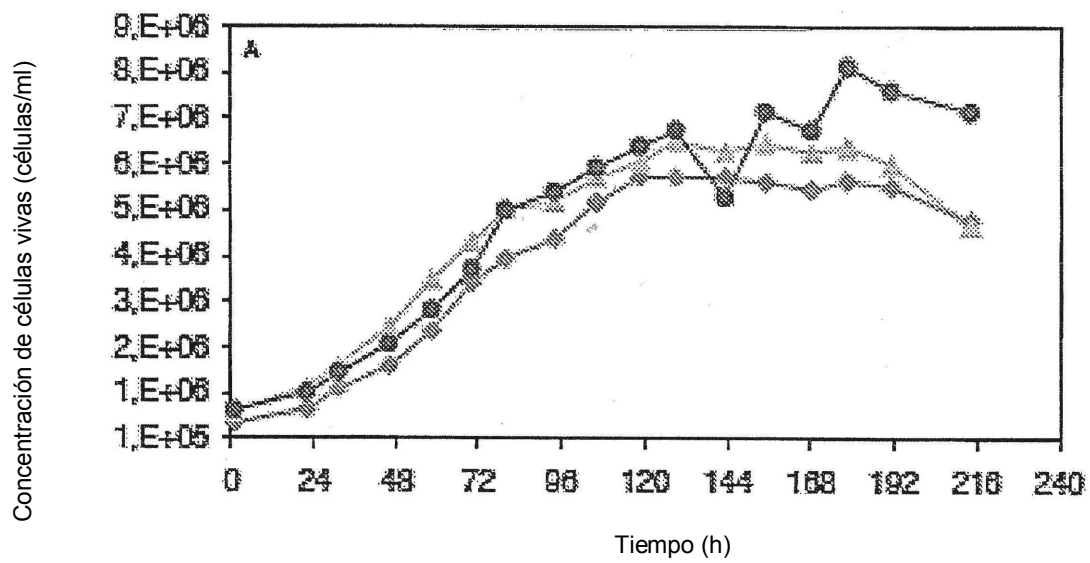


Fig. 6B

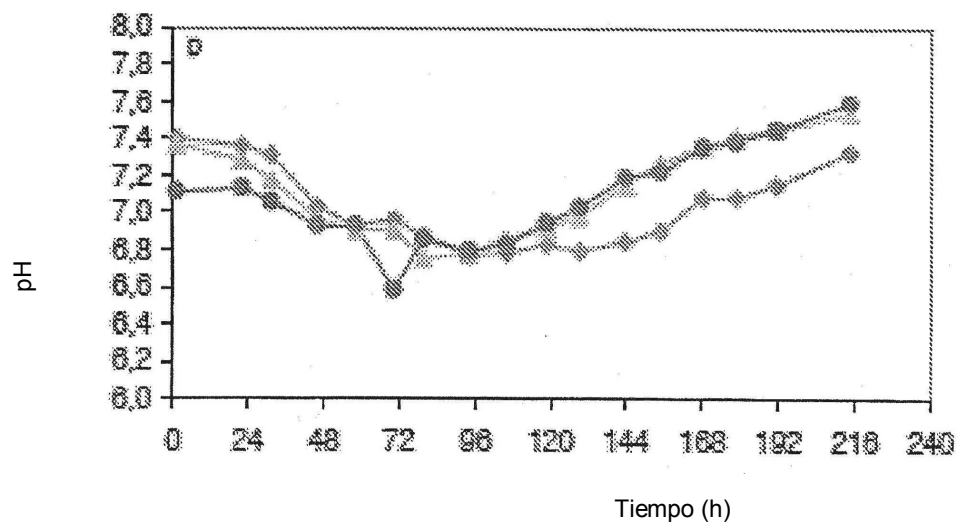


Fig. 7A

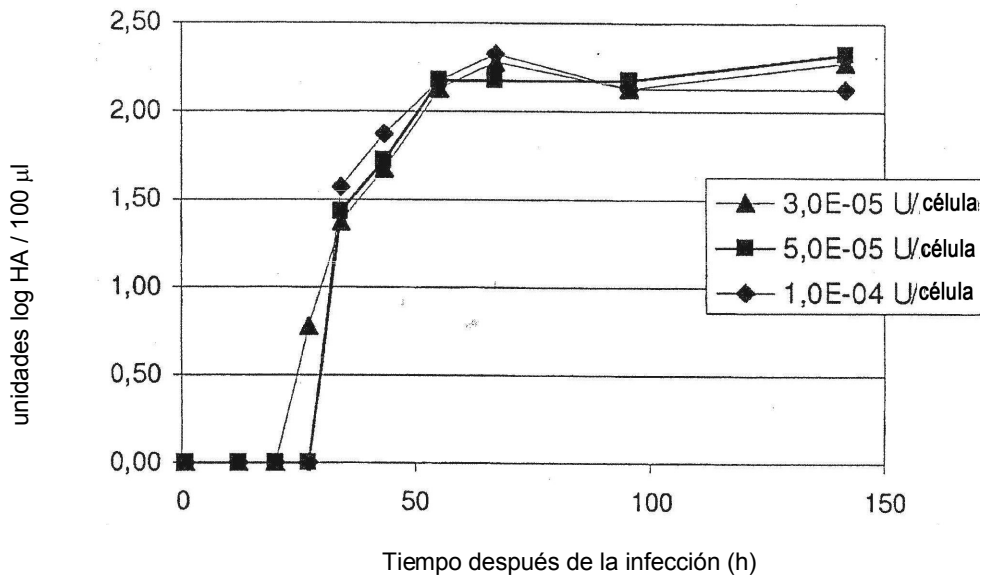


Fig. 7B

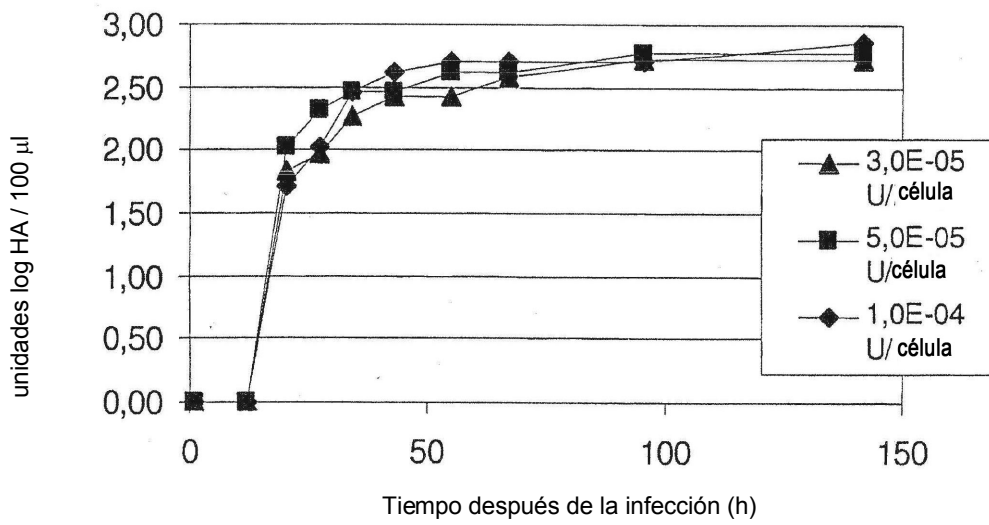


Fig. 7C

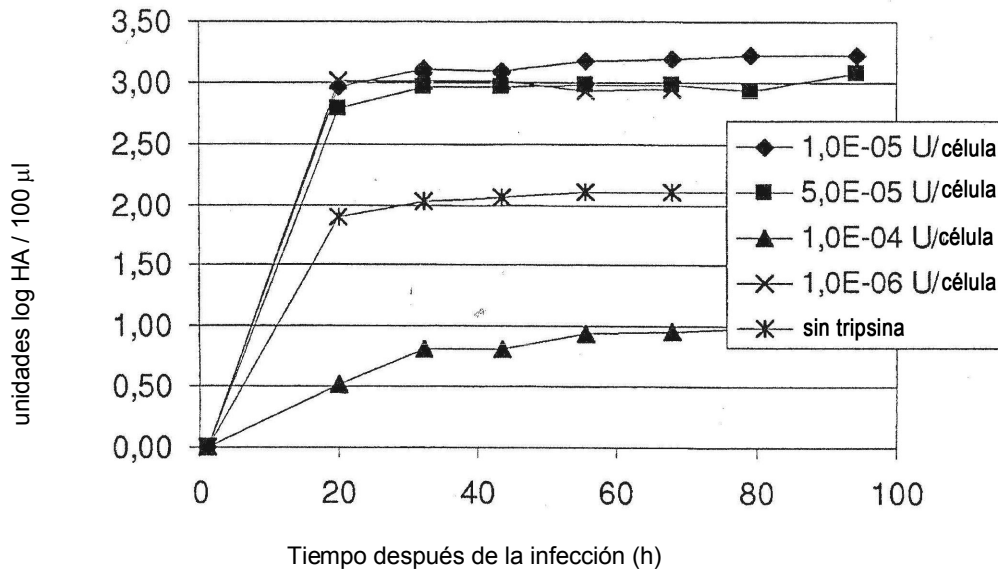


Fig. 8A

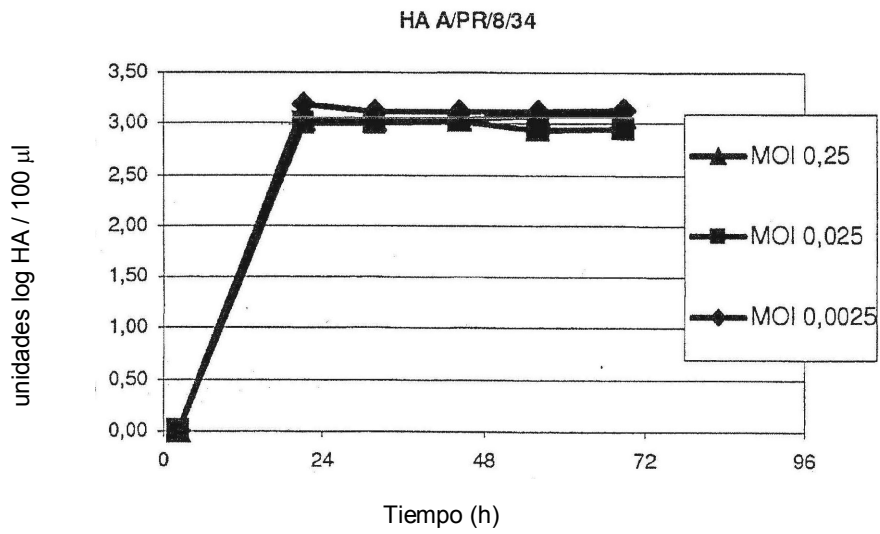


Fig. 8B

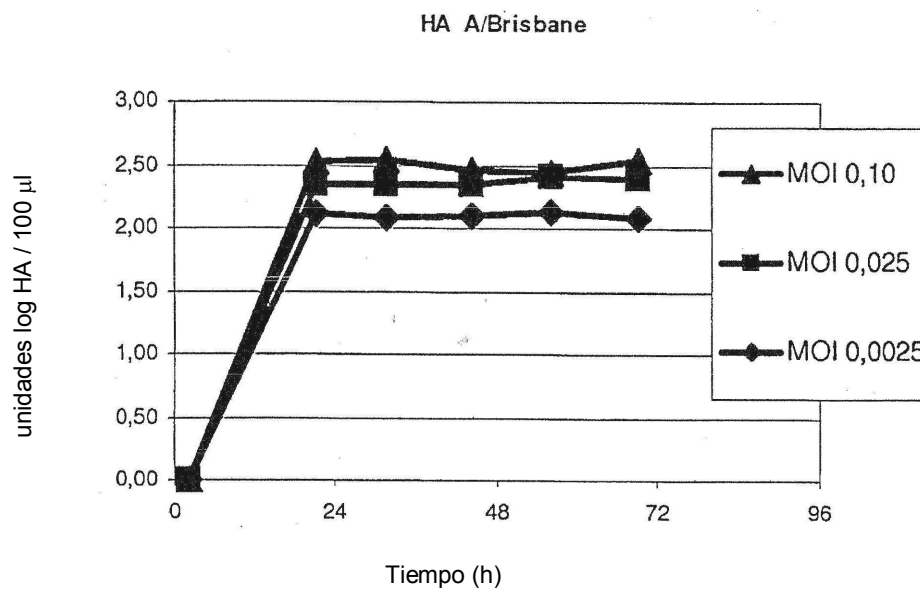


Fig. 8C

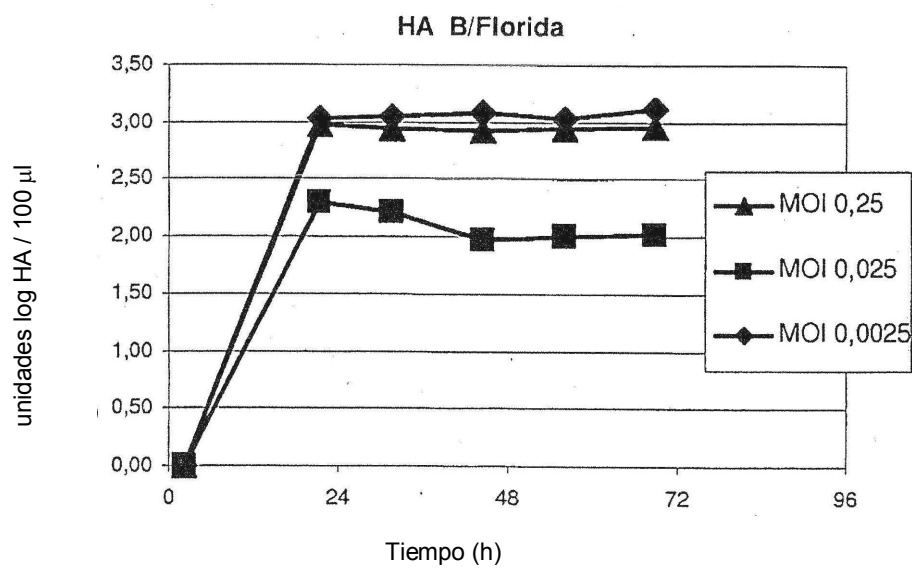


Fig. 8D

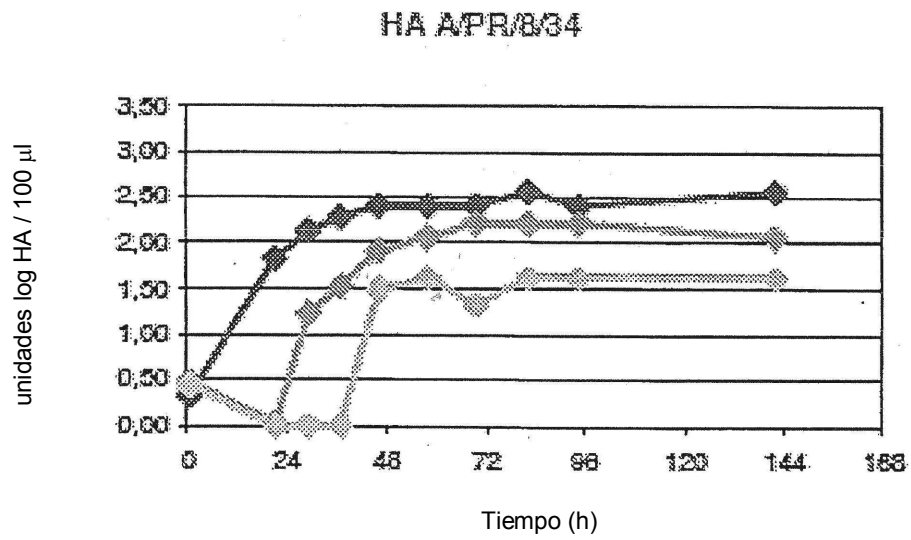


Fig. 8E

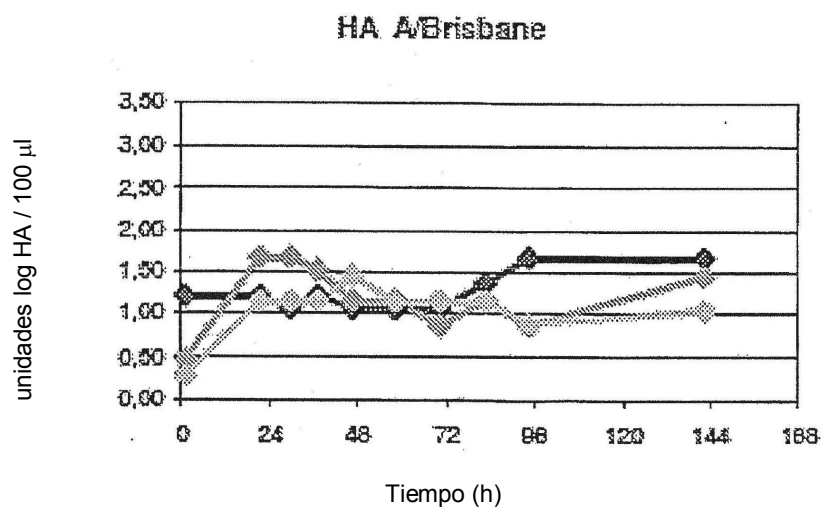


Fig. 8F

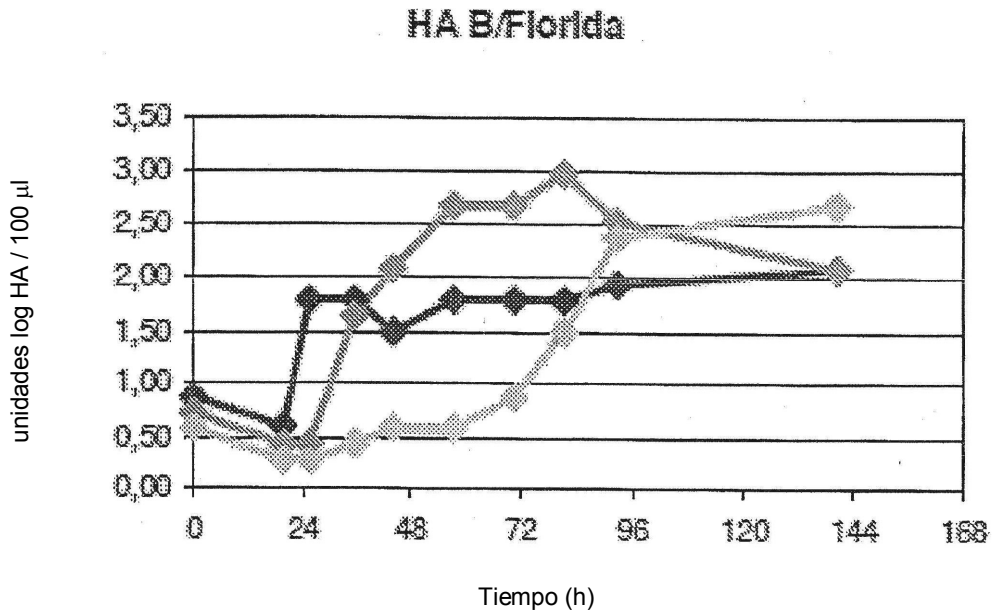


Fig. 9A

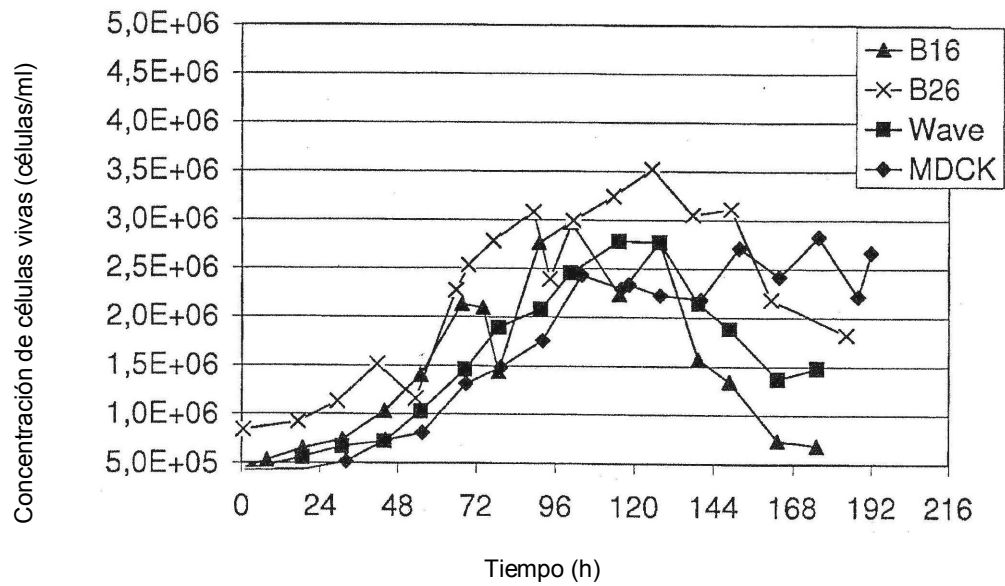


Fig. 9B

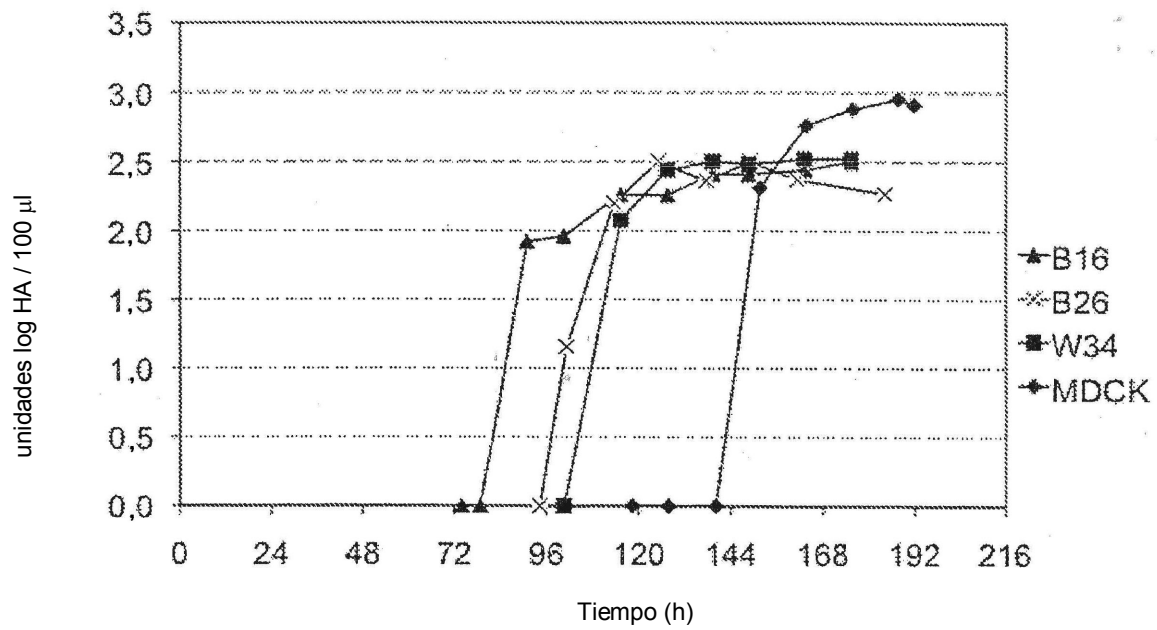


Fig. 10A

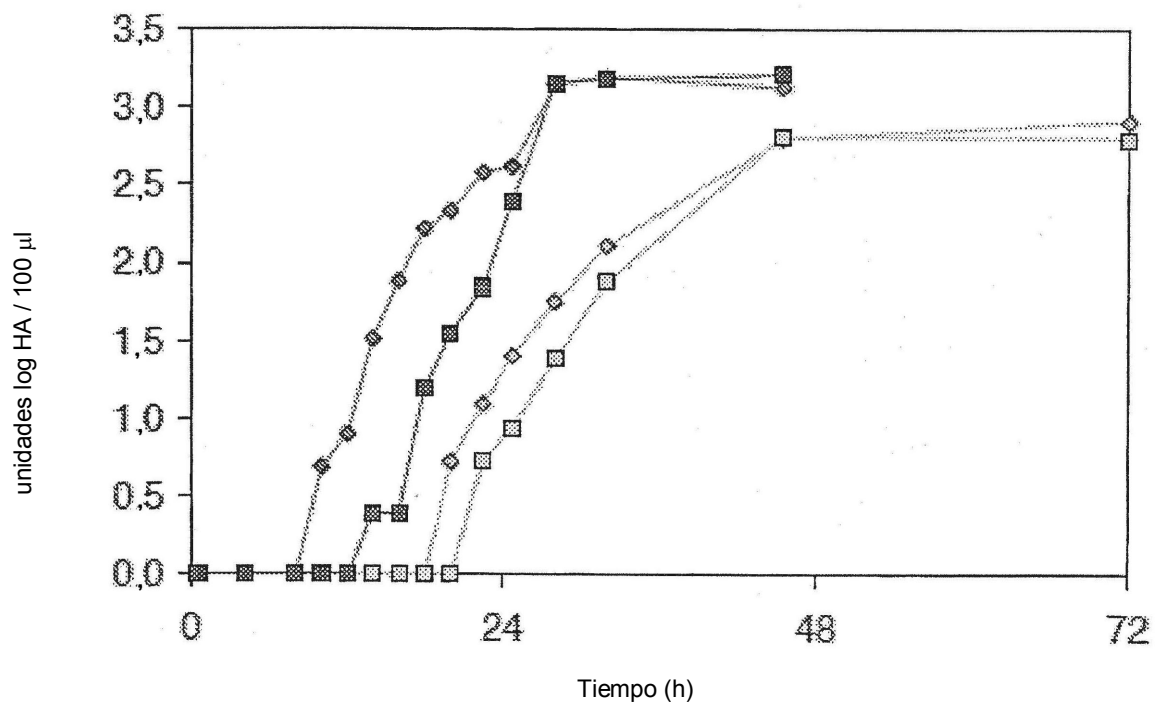


Fig. 10B

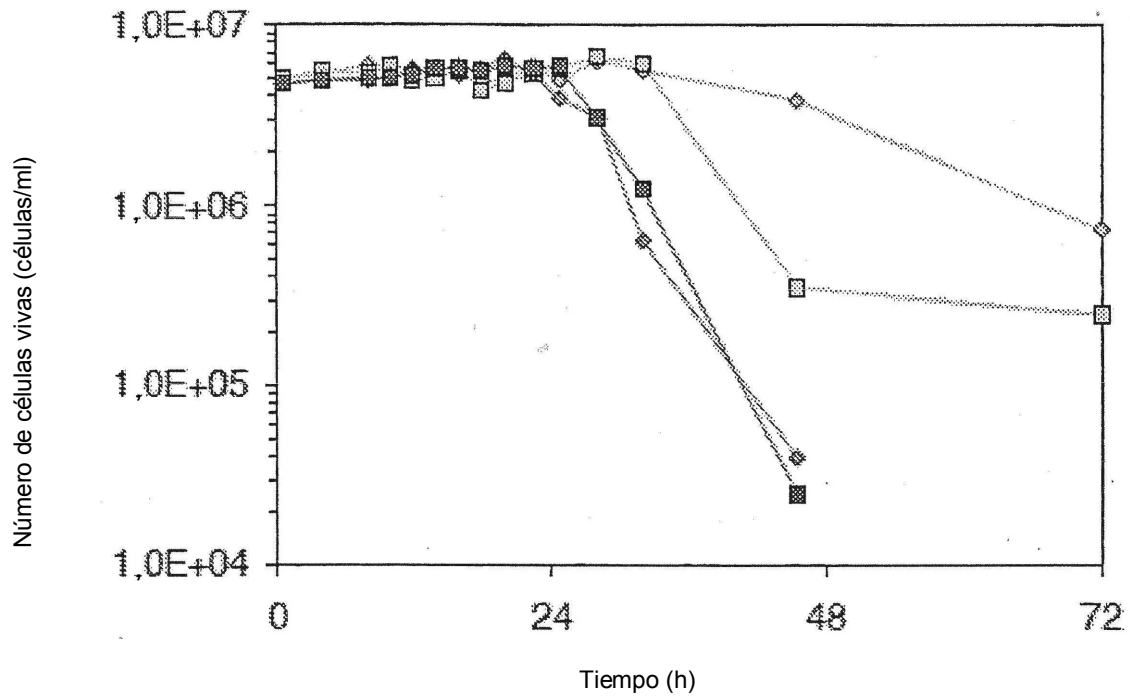


Fig. 10C

