

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 401**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2007 E 07825694 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2066345**

54 Título: **Fabricación de vacunas contra virus de la gripe sin usar huevos**

30 Prioridad:

11.09.2006 US 843720 P
18.06.2007 US 936279 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TSAI, THEODORE F. y
TRUSHEIM, HEIDI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 536 401 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).

Fabricación de vacunas contra virus de la gripe sin usar huevos**Descripción****5 CAMPO TECNICO**

Esta invención está en el campo de la fabricación de vacunas para proteger contra el virus de la gripe.

10 ANTECEDENTES DE LA TECNICA

15 El proceso actual para preparar vacunas estacionales contra infección de virus de gripe humana implica los pasos siguientes [1,2]: (a) aislamiento de cepas de virus circulantes; (b) análisis antigénico y genético de los virus aislados; (c) selección de cepas de siembra para su uso durante la próxima estación; (d) preparación de cepas de siembra de alto crecimiento por redistribución o el uso de genéticas inversas; (e) lanzamiento de cepas de siembra para los fabricantes de vacunas; (f) evaluación por los fabricantes de la idoneidad de la cepa para la producción industrial; y (g) cultivo de las cepas de siembra para producir virus de los que se fabrican las vacunas.

20 Los pasos (a) a (e) de este proceso se realizan por la FDA y centros para la gripe internacionales aprobados por el gobierno, típicamente bajo el patronazgo de la Organización Mundial de la Salud; los pasos (f) y (g) se realizan por los mismo fabricantes.

25 El paso (d) transiciona un virus de uno que está adaptado de forma natural para infectar humanos a uno que crecerá a títulos altos bajo condiciones de crecimiento industriales. Para el virus de la gripe A, este paso implica típicamente crear una cepa redistribuida 6:2 que incluye los segmentos de genoma que codifican Ha- y Na- para las cepas seleccionadas en (c) y los seis segmentos del genoma restantes de una cepa que crece eficientemente en huevos de gallina, y esta cepa es habitualmente la A/PR/8/34. El procedimiento de redistribución es seguido después por el paso repetido de la cepa en huevos embrionados para permitir la adaptación del huevo y la mejora del crecimiento. Para el virus de la gripe B, se obtienen cepas prototipo con buenas características de crecimiento por paso directo y repetido en huevos embrionados sin intentar generar redistribuciones.

30 Así los pasos realizados antes del lanzamiento a los fabricantes de vacunas implican pasar virus de la gripe por huevos. Incluso si los virus se cultivan por un fabricante en el paso (g) en un sustrato celular, en lugar de en huevos, el virus todavía habrá pasado a través de huevos en alguna etapa entre el aislamiento en el paso (a) y la recepción por un fabricante en el paso (e).

35 Por ejemplo, el paso (a) implica exponer un sustrato a una muestra del paciente, de tal manera que cualquier virus en la muestra infectará el sustrato. El sustrato puede entonces amplificar la cantidad de virus presente, y los virus amplificados están después disponibles para estudio adicional. Este paso puede tener lugar en huevos o en células mamíferas. Las células conocidas para su uso en aislamiento primario incluyen células MRC-5 [3], células Vero [4, 5], células MDCK [6], células HepG2 [7], células LLC-MK2 [8], etc. En general, sin embargo, los huevos de gallina continúan siendo usados para aislar cepas de referencia para la fabricación de vacunas contra la gripe. El uso de huevos es tan importante para los procedimientos actuales que en la estación 2003-04 la FDA rechazó el uso de la cepa H3N2 (A/Fujian/411/2002) más apropiada ya que no había sido aislada originalmente en huevos [2, 9] y no había disponibles cepas aisladas en huevos antigénicamente similares.

45 Se ha propuesto anteriormente eliminar el uso de huevos de varias etapas de la fabricación del virus de la gripe.

50 La referencia 10 propone que las vacunas deberían ser cultivadas en cultivo celular usando o una (i) cepa de alto crecimiento de un aislado clínico pasado o (ii) un redistribuido derivado de al menos una cepa del virus de la gripe mamífera de origen natural, siempre que el aislado o redistribuido no se haya pasado por huevos de ave. Así el proceso descrito en la referencia 10 empieza con un virus de siembra que ya ha sido seleccionado o manipulado para el crecimiento en el cultivo celular de elección.

55 La referencia 11 compara virus pasados a través de huevos con los pasados a través de células MDCK, pero selecciona específicamente los primeros para la fabricación de vacunas.

60 La referencia 12 sugiere que los virus de siembra para vacunas contra gripes pandémicas podrían prepararse propagando la cepa pandémica directamente en cultivo celular mamífero en lugar de a través de huevos embrionados, pero indica que el paso por el huevo era obligatorio para la fabricación inter-pandémica. La razón para este paso por el huevo obligatorio es que se ha creído que actúa como un "filtro" para agentes extraños: las agencias reguladoras han aceptado que un serie de pasos en un sistema aviar, entre el aislado clínico original de un humano y la vacuna final para la administración a humanos, evitará que se co-repliquen agentes extraños de tipo mamífero con el virus de la gripe.

65

La invención tiene por objeto proporcionar procedimientos adicionales útiles en la fabricación de vacunas contra la gripe, en los que se reduce el uso de huevos, y preferiblemente se evita del todo. En un aspecto particular, la invención tiene por objeto proporcionar procedimientos adicionales y mejorados útiles en el aislamiento del virus de la gripe.

5

DIVULGACION DE LA INVENCION

Aunque se ha propuesto anteriormente eliminar el uso de huevos de varias etapas de la fabricación de virus de la gripe, la invención difiere de estas propuestas en varios aspectos.

10

Enlace de Receptores

Los virus de la gripe humana enlazan con los oligosacáridos receptores que tienen un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal (ácido siálico α 2,6 enlazado con galactosa), pero los huevos en cambio tienen oligosacáridos receptores con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal. El cultivo de virus de la gripe humana en huevos proporciona presión de selección en hemaglutinina lejos del enlace Sia(α 2,6)Gal hacia el enlace Sia(α 2,3)Gal

15

Como los huevos, las células Vero expresan predominantemente receptores Sia(α 2,3)Gal [15]. Por el contrario las células MDCK y las células PER.C6 expresan ambas Sia(α 2,3)Gal y Sia(α 2,6)Gal. La referencia 16 informa de la transfección de células MDCK para sobre-expresar α -2,6-sialiltransferasa para favorecer la selección del enlace Sia(α 2,6)Gal. Incluso sin dichas manipulaciones, sin embargo, es posible cultivar virus de la gripe en células MDCK sin desplazarlas hacia el enlace Sia(α 2,3)Gal. Por lo tanto la invención puede usar células que expresan tanto Sia(α 2,3)Gal como Sia(α 2,6)Gal, pero puede producir virus de la gripe que tienen una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal

20

25

En realizaciones preferidas del primer y segundo aspectos de la invención, los virus de la gripe usados para la infección en el paso (i) tienen una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal. Esta preferencia de enlace se mantiene durante el paso (ii) y el paso (iii), de tal manera que el virus de la gripe producido en el paso (iii) tiene una preferencia para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal.

30

En realizaciones preferidas del tercer y cuarto aspectos de la invención, los virus de la gripe usados para la infección en el paso (ii) tienen una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal. Esta preferencia de enlace se mantiene durante el paso (iii) y el paso (iv), de tal manera que el virus de la gripe producido en el paso (iv) tiene una preferencia de enlace para oligosacárido con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal.

35

40

Para determinar si un virus tiene una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal se pueden usar varios ensayos. Por ejemplo, la referencia 13 describe un ensayo ligado a enzimas en fase sólida para la actividad de enlace el receptor del virus de la gripe que da mediciones de sensibilidad y cuantitativas de las constantes de afinidad. La referencia 14 usó un ensayo en fase sólida en el que se evaluó el enlace de los virus de dos sialilglicoproteínas (ovomucoide, con determinantes Sia(α 2,3)Gal; y α ₂-macroglobulina de cerdo, con determinantes Sia(α 2,6)Gal), y también describe un ensayo en el que el enlace de los virus se evaluó contra dos análogos de receptores: ácido siálico libre (Neu5Ac) y 3'-sialilactosa (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc). La referencia 15 informa de un ensayo usando una matriz de glicano que fue capaz de diferenciar con claridad las preferencias del receptor para ligamientos α 2,3 o α 2,6. La referencia 16 informa de un ensayo basado en la aglutinación de eritrocitos humanos modificados enzimáticamente para contener o Sia(α 2,6)Gal o Sia(α 2,3)Gal. Dependiendo del tipo de ensayo, se puede realizar directamente con el mismo virus, o puede ser realizado indirectamente con hemaglutinina purificada del virus.

45

50

Materiales de Referencia

El proceso actual para fabricar virus de la gripe implica la preparación de reactivos de referencia para cada cepa, concretamente (i) un suero anti-HA y (ii) viriones completos purificados. Estos reactivos calibrados se usan en un ensayo SRDI para determinar el nivel de HA en antígenos a granel producidos por los fabricantes, permitiéndoles de esta manera diluir las masas para dar la cantidad deseada de HA por dosis.

60

Con el proceso actual, donde las cepas de referencia se han pasado a través de huevos y las cepas de producción están optimizadas para el crecimiento en huevos, los sueros y antígenos en los reactivos de referencia están bien emparejados. Se ha descubierto, sin embargo, que los sueros pueden ser un pobre emparejamiento para antígenos producidos en cultivo celular, presumiblemente debido a las diferentes presiones de selección en los

65

diferentes sistemas. La pobre reactividad entre los sueros de referencia y el antígeno implica que los niveles de HA serán subestimados, llevando a (i) dosis menores de un granel dado y (ii) sobredosificación de HA en una vacuna.

5 Para superar este problema de emparejar antígenos derivados de cultivo celular con sueros desarrollados contra materiales derivados de huevos, la invención proporciona materiales de referencia basados en virus que no han sido adaptados para crecimiento basado en huevos.

10 Así la invención proporciona en la reivindicación 1 un proceso para preparar un antisuero de un animal no humano, que comprende los pasos de: (i) administrar al animal no humano una hemaglutinina de virus de la gripe purificada; y después (ii) recuperar del animal no humano suero que contiene anticuerpos que reconocen la hemaglutinina, caracterizado porque la hemaglutinina usada en el paso (i) es de un virus cultivado en una línea celular mamífera.

15 La hemaglutinina usada en el paso (i) es preferiblemente de un virus que no ha sido cultivado nunca en huevos. Por ejemplo, la hemaglutinina puede tener una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal.

20 La hemaglutinina preferida usada para desarrollar el antisuero es glicosilada con glicanos obtenibles del cultivo en una línea celular mamífera (por ejemplo las líneas celulares descritas en la presente), como MDCK.

Los antisueros pueden ser generados para virus de la gripe A y virus de la gripe B.

25 El animal es preferiblemente un mamífero, como una cabra o más preferiblemente una oveja. Los antisueros pueden ser preparados convenientemente en ovejas extrayendo HA de virus purificados por tratamiento con bromelaina, seguido por purificación por sedimentación en gradiente de sacarosa. Se administra una dosis de alrededor de 50 μ g de hemaglutinina intramuscularmente a una oveja en combinación con adyuvante completo de Freund (FCA). Se puede dar una dosis de 10 μ g dos semanas después, y después 2-4 dosis adicionales en intervalos semanales. Posteriormente, se puede recoger el suero. Antes del uso, puede ser diluido (por ejemplo con tampón PBS que contiene azida sódica) e introducido en contenedores. El suero puede ser expuesto a un pH ácido (por ejemplo pH durante dos horas) para cumplir con los reglamentos de la fiebre aftosa.

35 La invención también proporciona en la reivindicación 2 un proceso para preparar un antisuero de un animal no humano, que comprende los pasos de: (i) cultivar virus de la gripe en una línea celular mamífera; (ii) purificar el antígeno de hemaglutinina de virus cultivados en el paso (i); (iii) administrar la hemaglutinina purificada del paso (ii) al animal no humano; y después (iv) recuperar del animal no humano suero que contiene anticuerpos que reconocen la hemaglutinina.

En la presente se divulga un antisuero obtenible por estos procesos.

40 En la presente se divulga un gel que incluye este antisuero. Así un proceso como se describe anteriormente para preparar un antisuero de un animal puede incluir el paso adicional de mezclar el antisuero con un gel. El gel es adecuado para realizar un ensayo SRID, por ejemplo es un gel de agarosa.

45 En la presente se divulgan materiales de referencia de antígenos. Así la invención describe un proceso para preparar un material de referencia del antígeno, que comprende los pasos de: (i) cultivar virus de la gripe en una línea celular; (ii) purificar virus cultivados en el paso (i) y (iii) inactivar el virus, caracterizado porque el virus de la gripe usado en el paso (i) no se ha cultivado nunca en huevos. El proceso puede incluir un paso adicional de: (iv) liofilizar el virus inactivado.

50 El virus usado en el paso (i) no se ha cultivado nunca en huevos. Por ejemplo, su hemaglutinina puede tener una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal

55 El material de referencia está libre de materiales derivados de huevos (por ejemplo libre de ovoalbúmina, libre de ovomucoide, libre de ADN de pollo). Las glicoproteínas en el material de referencia serán glicosiladas con glicanos obtenibles del cultivo en una línea celular mamífera (por ejemplo las líneas celulares descritas en la presente, como MDCK. Los materiales de referencia pueden generarse para virus de la gripe A y virus de la gripe B.

60 Los materiales de referencia se usan habitualmente en parejas, y por lo tanto la invención también divulga un kit que comprende: (i) antisuero obtenible por estos procesos y (ii) material de referencia del antígeno obtenible por estos procesos.

65 La invención también proporciona en la reivindicación 8 un proceso para preparar el kit, que comprende los pasos de: (i) hacer un antisuero como se ha descrito anteriormente; (ii) hacer un material de referencia del antígeno como se ha descrito anteriormente; y (iii) combinar los productos de los pasos (i) y (ii) en un kit.

El antígeno y el antisuero son adecuados y pretendidos para su uso en ensayos SRID, y la invención divulga un ensayo de inmunodifusión radial simple para la hemaglutinina del virus de la gripe, caracterizado porque el ensayo usa antisuero obtenible por estos procesos y/o material de referencia del antígeno obtenible por estos procesos. El ensayo SRID implicará pasos para preparar un gel que incluye el antisuero, aplicar el material de referencia del antígeno (reconstituido, donde sea necesario, en un medio acuoso) al gel (típicamente en un pocillo), y después permitir al antígeno difundirse radialmente en el gel. El antígeno puede ser tratado con un detergente, como un detergente Zwittergent antes del uso.

10 ***Virus (incluyendo virus de siembra) preparados o aislados por técnicas de la invención***

Los virus de la gripe A preferidos (incluyendo virus de siembra, virus aislados de muestras de pacientes usando células MDCK, virus redistribuidos, etc.) incluyen menos de 6 (es decir 0, 1, 2, 3, 4 ó 5) segmentos víricos de un virus de la gripe PR/8/34. Preferiblemente no incluyen segmentos de PR/8/34. Si hay presente cualquier segmento de PR/8/34 entonces estos no incluirán el segmento PR/8/34 HA y habitualmente no incluirán el segmento PR/8/34 NA. Así los virus preferidos son aquellos en los que al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del PR/8/34. Más preferiblemente, al menos uno de los segmentos NP, M, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del PR/8/34. Por lo tanto la invención puede mejorar sobre las vacunas existentes añadiendo a los antígenos de HA y NA normales uno o más antígenos que contienen epítomos que son representativos de una cepa circulante.

De manera similar, los virus de la gripe A preferidos incluyen menos de 6 (es decir (0, 1, 2, 3, 4 ó 5) segmentos víricos de un virus de la gripe AA/6/60 (A/Ann Arbor/6/60). Preferiblemente no incluyen segmentos de AA/6/60. Si hay presente algún segmento de AA/6/60 estos no incluirán el segmento AA/6/60 HA y habitualmente no incluirán el segmento AA/6/60 NA. Por lo tanto los virus preferidos son aquellos en los que al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/6/60. Más preferiblemente, al menos uno de los segmentos NP, M, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/6/60.

Los virus de la gripe B preferidos incluyen menos de 6 (es decir 0, 1, 2, 3, 4 ó 5) segmentos virales de un virus de la gripe AA/1/66 (B/Ann Arbor/1/66). Preferiblemente no incluyen segmentos de AA/1/66. Si hay presente algún segmento de AA/1/66 estos no incluirán el segmento AA/1/66 HA y habitualmente no incluirán el segmento AA/1/66 NA. Por lo tanto los virus preferidos son aquellos en los que al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/1/66. Más preferiblemente, al menos uno de los segmentos NP, M, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/1/66.

Los virus de la gripe preferidos de la invención (incluyendo virus de siembra, virus aislados de muestras de pacientes usando células MDCK, virus redistribuidos, etc.) incluyen hemaglutinina con una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia(α 2,3)Gal terminal. Esta preferencia de enlace se trata con más detalle anteriormente.

Los virus de la gripe preferidos de la invención (incluyendo virus de siembra, virus aislados de muestras de pacientes usando células MDCK, virus redistribuidos, etc.) incluyen glicoproteínas (incluyendo hemaglutinina) con un patrón de glicosilación diferente de los virus derivados de huevos. Por lo tanto las glicoproteínas comprenderán glicofomas que no se ven en virus cultivados en huevos de gallina, por ejemplo pueden tener ligamientos de azúcar no aviares, incluyendo ligamientos de azúcar mamíferos.

Líneas celulares

La invención implica el uso de líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe, y evita el uso de huevos. La línea celular será típicamente de origen mamífero. Las células de origen mamíferas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluyendo humanos y monos) y perro, aunque no se prefiere el uso de células de primate. Se pueden usar varios tipos de células, como células de riñón, fibroblastos, células de la retina, células pulmonares, etc. Ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuadas son, por ejemplo células de mono verde africano, como las células de riñón como en la línea celular Vero [21-23]. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo células de riñón, como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

Por lo tanto las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, MDCK; CHO; CLDK; HKCC; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6 [24]; FRhL2; WI-38; etc. Las líneas celulares adecuadas están ampliamente disponibles, por ejemplo de la colección American Type Cell Culture (ATCC) [25], de la Coriell Cell Repositories [26], o de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Por ejemplo la ATCC suministra varias células Vero diferentes bajo los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK bajo el número de catálogo CCL-34. La PER.C6 está disponible de la ECACC bajo el número de depósito 96022940. Cualquiera de estos tipos celulares puede ser usado para el cultivo, redistribución y/o paso de acuerdo con la invención.

Las líneas celulares más preferidas son aquellas con glicosilación tipo mamífero. Como una alternativa menos preferida a las líneas celulares mamíferas, los virus pueden ser cultivados en líneas celulares aviares [por ejemplo refs. 27-29], incluyendo líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas, por ejemplo fibroblastos de embrión de pollo (CEF), etc., pero el uso de células mamíferas implica que las vacunas pueden estar libres de ADN aviar y proteínas de huevo (como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo de esta manera la alergenicidad.

Las líneas celulares más preferidas para cultivar virus de la gripe son las líneas celulares MDCK [30-33], derivadas de riñón canino de Madin Darby. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también se pueden usar varios derivados de esta línea celular. Por ejemplo, la referencia 30 divulga una línea celular MDCK que se adaptó para el cultivo en suspensión ('MDCK 33016' o '33016-PF', depositada como DSM ACC 2219, ver también las refs. 34 y 35). De manera similar, la referencia 36 divulga una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo libre de suero ('B-702', depositado como FERM BP-7449). La referencia 37 divulga células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y MDCK-SF103' (ATCC PTA-6503). La referencia 38 divulga líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Cualquiera de estas líneas celulares MDCK se puede usar con la invención.

Los virus pueden ser cultivados en células en cultivo adherente o en suspensión. También se pueden usar cultivos de microportadores. En algunas realizaciones, las células pueden ser por lo tanto adaptadas para el cultivo en suspensión.

Las líneas celulares son cultivadas preferiblemente en medio de cultivo libre de suero y/o medio libre de proteínas. En el contexto de la presente invención un medio es referido como medio libre de suero cuando no tiene aditivos de suero de origen humano o animal. Las células que crecen en dichos cultivos contienen de manera natural proteínas por ellas mismas, pero se entiende que un medio libre de proteínas significa uno en el que la multiplicación de las células tiene lugar con exclusión de (sin la adición al medio de cultivo de) proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero puede incluir opcionalmente (en el medio de cultivo) proteínas como tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para el crecimiento vírico.

Las líneas celulares que soportan la replicación de virus de la gripe se cultivan preferiblemente por debajo de 37° C [39] (por ejemplo 30-36° C, o a alrededor de 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C) durante la replicación vírica. Por ejemplo, en el sexto aspecto, las células MDCK pueden cultivarse (antes, durante o después del paso de aislamiento) a estas temperaturas, particularmente durante la replicación vírica.

Los métodos para propagar virus de la gripe en células cultivadas (por ejemplo para cultivar virus de la gripe en células MDCK cultivadas de acuerdo con el sexto aspecto) incluyen generalmente los pasos de inocular un cultivo de células con un inóculo de la cepa a ser cultivada, cultivar las células infectadas para un periodo de tiempo deseado para la propagación del virus, como por ejemplo como se determina por el título del virus o la expresión del antígeno (por ejemplo entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recoger el virus propagado. Las células cultivadas son inoculadas con un virus (medido por PFU o TCIP₅₀) a la proporción celular de 1:500 a 1:1, preferiblemente de 1:100 a 1:5, más preferiblemente de 1:50 a 1:10. El virus se añade a una suspensión de las células o se aplica a una monocapa de las células, y el virus es absorbido en las células durante al menos 60 minutos pero habitualmente menos de 300 minutos, preferiblemente entre 90 y 240 minutos a de 25° C a 40° C, preferiblemente de 28° C a 37° C. El cultivo celular infectado (por ejemplo monocapas) puede ser retirado o por congelación-descongelación o por acción enzimática para aumentar el contenido vírico de los sobrenadantes del cultivo recolectados. Los fluidos recolectados son después o inactivados o almacenados congelados. Las células cultivadas pueden ser infectadas a una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de alrededor de 0,0001 a 10, preferiblemente de 0,002 a 5, más preferiblemente de 0,001 a 2. Todavía más preferiblemente, las células son recolectadas a una m.o.i. de alrededor de 0,01. Las células infectadas pueden ser recolectadas de 60 a 60 horas después de la infección. Preferiblemente, las células se recolectan de 34 a 48 horas después de la infección. Todavía más preferiblemente, las células se recolectan de 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (típicamente tripsina) se añaden generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación vírica, y las proteasas se pueden añadir en cualquier etapa adecuada durante el cultivo, por ejemplo antes de la inoculación, al mismo tiempo que la inoculación o después de la inoculación [39].

En las realizaciones preferidas, particularmente con células MDCK, un línea celular no se pasa de un banco de células de trabajo maestro más allá de 40 niveles de duplicación de la población.

El inóculo vírico y el cultivo vírico están preferiblemente libres de (es decir, se habrán probado para y habrán dado un resultado negativo de contaminación por) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y/o parvovirus [40]. De manera similar, las líneas celulares MDCK preferidas usadas con el sexto aspecto están libres de (es decir, se habrán probado para y habrán dado un resultado negativo de infección por) virus del herpes simple,

virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y/o parvovirus. Se prefiere particularmente la ausencia del virus del herpes simple.

5 Una línea celular MDCK usada con la invención preferiblemente no contiene marcador para resistencia a G418 (véase la referencia 16). Así la línea celular puede ser sensible a tratamiento con G418.

La línea celular usada con la invención preferiblemente no contiene plásmidos exógenos (véase la referencia 16), excepto por cualquiera que se pueda requerir para técnicas genéticas inversas.

10 **General**

El término "comprende" abarca "incluye" así como "consiste", por ejemplo una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X+Y.

15 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

20 El término "alrededor de" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo $x \pm 10\%$.

A menos que se indique lo contrario, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere cualquier orden específico de mezclado. Así los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando haya tres componentes, entonces dos componentes pueden ser combinados entre sí, y después la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

25 Donde se usan materiales animales (y particularmente bovino) en el cultivo de células, deberían ser obtenidos de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs), y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). En general, se prefieren cultivos celulares en ausencia total de materiales derivados de animales.

30 Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición entonces ese compuesto puede ser reemplazado alternativamente por un profármaco adecuado.

35 **BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 muestra el esquema de asilamiento del virus de la gripe de especímenes clínicos.

40 La Figura 2 compara títulos de HA de 9 muestras víricas aisladas en células MDCK-33016. En cada muestra, la barra de la izquierda es en el paso 2 y la barra de la derecha es en el paso 5.

La Figura 3 compara títulos de HA de 10 muestras de virus de la gripe cultivados en tres tipos de células MDCK diferentes. Para cada muestra, las tres barras con: izquierda, 33016 en suspensión; medio 33016 adherente; y derecha, células CCL-34 MDCK.

45 La Figura 4 muestra el enlace de tres virus con lectinas SNA o MAA. La Figura 4A muestra el enlace de un aislado original, la Figura 4B muestra el enlace después del cultivo en células MDCK 33016, y la 4C muestra el enlace después del cultivo en huevos.

50 Las Figuras 5 y 6 muestran el enlace de virus con 3-SL o 6-SLN. en ambas Figuras hay seis grupos de columnas: las tres de más a la izquierda muestran el enlace con 3-SI a diferentes concentraciones (1 μM , 0.5 μM , 0.25 μM) y las tres de más a la derecha muestran el enlace con 6-SLN a diferentes concentraciones (0.25 μM , 0.125 μM , 0.0625 μM). Dentro de cada uno de los seis grupos cada columna muestra un virus diferente. En la Figura 5, las tres columnas son, de izquierda a derecha: (i) un virus aislado de células; (ii) un virus aislado de huevos; y (iii) un virus aviar. En la Figura 6, las cuatro columnas son, de izquierda a derecha: (i) virus después de dos pasos en huevos; (ii) virus después de dos pasos en MDCK; (iii) virus después de cinco pasos en huevos; (iv) virus después de cinco pasos en MDCK.

60 **MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION**

Aislamiento de virus de muestras de pacientes

Se obtuvieron especímenes clínicos (hisopos nasales y de garganta) que contenían subtipos del virus de la gripe A y/o B de niños y adultos durante la estación de la gripe del hemisferio norte 2006-2007. Se comparó la susceptibilidad y confiabilidad de la línea celular MDCK 33016 (DSM ACC 2219) cultivada en cultivo en suspensión libre de suero con la línea celular MDCK CCL 34 establecida (ATCC) y con huevos de gallina, por determinación de

títulos de hemaglutinina (HA), reacción en cadena de polimerasa (PCR) y titulación de virus. Se identificaron 248 muestras positivas de gripe por reacción en cadena de polimerasa (PCR) diagnóstica. La susceptibilidad y confiabilidad de la replicación y aislamiento de virus de la gripe se evaluó en la línea celular MDCK 33016 y en huevos de gallina por (i) títulos de hemaglutinina (HA); (ii) reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real para la medición de la carga vírica; y (iii) titulación de virus. La precisión de la replicación en las células se evaluó por secuenciación del gen de Ha en los especímenes clínicos originales y también en aislados del segundo paso en células MDCK y huevos de gallina. Los títulos de los virus obtenidos de aislados cultivados en células MDCK 3306 en suspensión se compararon con los de las células MDCK 33016 adheridas en placas.

Los resultados indicaron que la capacidad de aislamiento de la línea celular en suspensión MDCK 33016 es superior a la línea celular MDCK CCL establecida, y mucho mayor que la de los huevos de gallina. Después del paso de muestras de virus en células MDCK 33016, las sustituciones de aminoácidos se identificaron en no aislados. Por el contrario, casi todos los virus pasados por huevos contenían una o más sustituciones de aminoácidos, predominantemente en el gen de HA1. Las mutaciones en el sitio de enlace de anticuerpos del gen de HA, observado después del paso en huevos, puede resultar en modificaciones a la antigenicidad de los virus de la gripe.

El 55% de las muestras clínicas obtenidas de pacientes con enfermedad respiratoria aguda, se identificaron como positivos para la gripe, con los siguientes tipos víricos: 79% A/H3N2; 12.5% A/H1N1; 1.6% B, 0.4% H3/B y 6.5% no tipificable. El aislamiento vírico de especímenes clínicos fue posible usando células MDCK 33016 (Figura 1). Por el contrario, de los virus inyectados en huevos de especímenes clínicos, ninguno se aisló satisfactoriamente. Se consiguieron resultados negativos similares con fibroblastos de embrión de pollo (CEF) recién preparados. El aislamiento y establecimiento de virus de la gripe en huevos pudo conseguirse solamente usando sobrenadantes de cultivos de MDCK 33016 con un título HA positivo.

La primera recolección de cada célula fue inoculada adicionalmente en huevos, con propósitos de referencia. El números de aislamientos de virus con éxito, usando cada enfoque, se muestra en las cajas de la Figura 1, con el número de diferentes tipos virales inyectados también mostrados. Los tres subtipos de virus aislados de células MDCK 33016, ganaron HA razonable (>32) y título de virus ($>1 \times 10^6$) después del segundo paso en huevos, con ambos títulos aumentando con pasos adicionales (Figura 2).

Las células MDCK 33016 cultivadas en suspensión fueron superiores a la línea celular adherente (CCL-34) para el aislamiento de virus de la gripe de hisopos clínicos para los tres subtipos. La línea celular en suspensión mostró una sensibilidad más alta para material de hisopo de la gripe positivo como se demuestra por la tasa de recuperación (tabla 1). Las secuencias de Ha se compararon entre diferentes pasos en células MDCK 33016 y huevos con el aislado original (Tabla 2), y no se encontraron mutaciones para las cepas de la gripe A aisladas en células MDCK 33016 incluso después de 5 pasos, mientras que las cepas de la gripe A aisladas en huevos mostraron mutaciones en el sitio de enlace de anticuerpos de la proteína HA después de 2 pasos. No se encontraron mutaciones para las cepas de la gripe B aisladas en células MDCK 33016 o huevos.

Se encontraron altos rendimientos de virus, o al menos un nivel de registro, después de la replicación de aislados en células MDCK 33016 en suspensión en comparación con las células MDCK 33016 adheridas (Figura 3).

Por lo tanto la línea celular en suspensión MDCK 33016 es un sistema ideal para el aislamiento y replicación de cepas de la gripe del tipo salvaje, ya que ofrece una mayor capacidad de aislamiento en comparación con huevos de gallina. Además, debido a la alta precisión de replicación, el uso de aislados basados en células para la producción de un vacuna contra la gripe humana puede llevar a un vacuna más auténtica. El emparejamiento mejorado entre las cepas del tipos salvaje circulantes y las contenidas en la vacuna debería ofrecer mayor protección contra la gripe para la vacuna.

En conclusión: (a) todas las cepas de virus fueron aisladas con éxito en células MDCK 33016 en comparación con huevos; (b) las cepas de virus aisladas de células MDCK pudieron ser propagadas con éxito en huevos; (c) la tasa de recuperación de los tres subtipos de virus de la gripe es superior en células MDCK 33016 cultivadas en suspensión, cuando se comparan con las células adherentes; y (d) las sustituciones del gen de HA, cuando se coparan con las del material original, no estaban presentes en ninguno de los aislados cultivados en células MDCK 33016 pero estaban presentes después del segundo paso en huevos. Por lo tanto la línea celular en suspensión MDCK 33016 es un sustrato muy adecuado para el aislamiento y propagación de subtipos de virus de la gripe humana ya que es muy fiable para el paso de virus de la gripe de tipo salvaje de aislados clínicos y conserva un carácter auténtico de los virus de tipo salvaje.

Enlace de receptores

Se investigaron las preferencias de receptores de los virus aislados originales, de virus cultivados en huevos y de virus cultivados en MDCK. Los estudios usaron lectinas con ligamientos 2,3-sialil (MAA) o ligamientos 2,6 sialil (SNA) o 2,3-sialilactosa (3-SL, un análogo del receptor de huevo) y 2,6-sialil-N-acetilactosamina (6-SLN, un análogo del receptor humano) sialilglicopolímeros [193].

La Figura 4 muestra los resultados de un estudio representativo. Los picos etiquetados muestran el enlace con las lectinas SNA o MAA. El virus original (4A) y el virus cultivado en MDCK 33016 (4B) tienen picos distintos para SNA y MAA, mientras que los picos SNA y MAA se superponen sustancialmente para virus cultivados en huevos (4C).

También se examinó la especificidad de enlace en experimentos adicionales usando 3-SL y 6-SLN. Un resultado de ejemplo se muestra en la Figura 5. El enlace en la izquierda del gráfico indica una preferencia por el receptor aviar, mientras que el enlace en la derecha indica una preferencia por el receptor humano. Como se ve en la Figura 5, el virus aislado de células favorece fuertemente los receptores humanos.

La Figura 6 muestra datos usando un aislado de Stuttgart (A/H1N1) después de 2 ó 5 pasos en huevos o en MDCK 33016 cultivado en suspensión . Los virus pasados por MDCK muestran una fuerte preferencia por 6-SLN.

En conclusión, todos los virus A y B humanos clínicos cultivados en MDCK enlazan con 6-SL_n en lugar de con 3-SL, excepto que se descubrió que algunos aislados no enlazan con nada en este ensayo. A diferencia de los aislados clínicos originales, los virus adaptados de huevos enlazan o con 3-SL o con ninguno de 3-SL o 6-SLN.

Cambios debidos al cultivo en huevos

Se aislaron varias cepas de virus de la gripe A y B en células MDCK y se pasaron hasta 5 veces a través de uno de los siguientes sustratos: huevos,; células MDCK CCL-34, células MDCK 33016; células Vero; o células HEK 293-T. El gen de HA de los virus se secuencio después de cada paso y se midieron los títulos de HA.

Aunque la secuencia de HA para algunas cepas (por ejemplo A/H1N1/Bayern/7/95) era estable durante el paso a través de los huevos y a través de las MDCK 33016, para otras no lo era. Por ejemplo, la secuencia de HA de A/H1N1/Nordrhein Westfalen/1/05 adquirió una mutación D203N en el sitio de enlace de anticuerpos D después de 2 pasos a través de huevos, y después de 2 pasos más adquirió adicionalmente una R329K. Por el contrario, la secuencia no se alteró en virus pasados en paralelo a través de MDCK 33016.

Para esta cepa A/H1N1/NRW/1/05, no se observo crecimiento cuando se cultivó con células Vero. Los otros cuatro sustratos pudieron soportar su crecimiento, pero los títulos de HA variaron. Por ejemplo, los títulos de 32-256 se observaron en huevos, pero las células 293-T dieron títulos más bajos (16-32) y las MDCK 33016 dieron títulos más altos (32-152).

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y se pueden hacer modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito de la invención.

TABLA 1: Tasa de recuperación después del primer paso de muestras positivas para gripe en líneas celulares MDCK 33016 y ATCC (CCL-34)

Tasa de recuperación n (%) de acuerdo con la cepa viral					
	Total n=248 (%)	A/H1N1 (n=31)	A/H3N2 (n=196)	B (n=4)	No tipificable (n=16)
33016	178(72)	26 (83.9)	150 (76.5)	4 (100)	9 (56.3)
CCL-34	156(63)	23 (74.2)	135 (68.9)	2 (50)	4 (25.0)

* 1 infectada doble (H3/B) que podría ser aislada en ambas líneas celulares MDCK

TABLA 2: Comparación de secuencias de hemaglutinina después de 2 ó 5 pasos en células MDCK 33016-PF o huevos con el aislado original

	Aislado (serotipo)	Paso (huésped)	Comparación con el material original (nucleótido)	Comparación con el material original (aminoácido)
5	295 (H1N1)	P2 (MDCK)	0*	0*
		P2 (huevo)	1*	D203N*
10	124 (H3N2)	P2 (MDCK)	0	0
		P5 (MDCK)	0	0
		P2 (huevo)	1	L210P
15	128 (H3N2)	P2 (MDCK)	0	0
		P5 (MDCK)	0	0
		P2 (huevo)	3	L210P
20	146 (H3N2)	P2 (MDCK)	0	0
		P5 (MDCK)	0	0
		P2 (huevo)	1	L210P
25	171 (H3N2)	P2 (MDCK)	0	0
		P5 (MDCK)	0	0
		P2 (huevo)	1	H199L
30	215 (B)	P5 (MDCK)	0**	0**
		P2 (huevo)	0**	0**
35	419032(B)	P5 (MDCK)	0	0
		P2 (huevo)	0	0

0 = Sin mutación detectable
 * para aislado original sólo estaba disponible la secuencia Ha1
 ** comparación con el aislado P2 (MDCK 33016)

REFERENCIAS

[1] Gerdil (2003) Vaccine 21:1776-9.
 [2] Palese (2006) Emerging Infectious Diseases 12:61-65.
 [3] de Oña et al. (1995) J Clin Microbiol 33:1948-49.
 [4] Monto et al. (1981) J Clin Microbiol 13(1): 233-235.
 [5] Govorkova et al. (1995) J Infect Dis. 172(1):250-3.
 [6] Tobita et al. (1975) Med Microbiol Immunol (Berl). 162(1):9-14 y 23-27.
 [7] Ollier et al. (2004) J Clin Microbiol 42(12):5861-5.
 [8] Schepetiuk & Kok (1993) J Virol Methods 42(2-3):241-50.
 [9] WHO (2003) Weekly epidemiological record 78:73-80
 [10] Patente US 6,344,354. See also WO97/38094.
 [11] Patente US 5,162,112
 [12] Medema et al. (2004) Virus Res. 103(1-2):9-15.
 [13] Robertson et al. (1995) Vaccine 13:1583-8.
 [14] Merten et al. (1996) Advances in Experimental Biology 397:141-151.
 [15] Govorkova et al. (1996) J. Virol., 70:5519-24.
 [16] Mastrovovich et al. (2003) J Virol 77:8418-25.
 [17] Gambaryan & Matrosovich (1992) J Virol Methods 39(1-2):111-23.
 [18] Mastrovovich et al. (1999) J Virol 73: 1146-55.
 [19] Stevens et al. (2006) J Mol Biol 355:1143-55.
 [20] Couceiro & Baum (1994) Mem Inst Oswaldo Cruz 89(4):587-91.
 [21] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.
 [22] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.
 [23] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.
 [24] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.
 [25] <http://www.atcc.org/>
 [26] <http://locus.umdj.edu/>
 [27] WO03/076601.
 [28] WO2005/042728.
 [29] WO03/043415.
 [30] WO97/37000.
 [31] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
 [32] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240-7.

- [33] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
 [34] WO03/023021
 [35] WO03/023025
 5 [36] EP-A-1260581 (WO01/64846).
 [37] WO2006/071563.
 [38] WO2005/113758.
 [39] WO97/37001.
 [40] WO2006/027698.
 10 [41] Hoffmann et al. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
 [42] Subbarao et al. (2003) *Virology* 305:192-200.
 [43] Liu et al. (2003) *Virology* 314:580-590.
 [44] Ozaki et al. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
 [45] Webby et al. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
 15 [46] WO00/60050.
 [47] WO01/04333.
 [48] Patente US 6649372.
 [49] Neumann et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.
 [50] WO2007/002008.
 20 [51] WO2006/067211.
 [52] WO01/83794.
 [53] Hoffmann et al. (2000) *Virology* 267(2):310-7.
 [54] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
 [55] WO02/28422.
 25 [56] WO02/067983.
 [57] WO02/074336.
 [58] WO01/21151.
 [59] WO02/097072.
 [60] WO2005/113756.
 30 [61] Huckriede et al. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
 [62] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
 [63] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
 [64] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.
 [65] Herlocher et al. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
 35 [66] Le et al. (2005) *Nature* 437(7062):1108.
 [67] EP-B-0870508.
 [68] US 5948410.
 [69] WO2007/052163.
 [70] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.
 40 [71] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services
 Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary
 Medicine (CVM). Mayo 2001.
 [72] Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
 [73] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12.
 45 [74] Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80.
 [75] Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
 [76] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 [77] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
 [78] Nony et al. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
 50 [79] Patente US 6,372,223.
 [80] WO00/15251.
 [81] WO01/22992.
 [82] Hehme et al. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.
 [83] Patente US 6355271.
 55 [84] WO00/23105.
 [85] US 5,057,540.
 [86] WO96/33739.
 [87] EP-A-0109942.
 [88] WO96/11711.
 [89] WO00/07621.
 60 [90] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [91] Sjolanderet et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 [92] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
 [93] WO95/17211.
 [94] WO98/42375.
 65 [95] Singh et al] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.

- [96] WO99/27960.
 [97] US 6,090,406
 [98] US 5,916,588
 5 [99] EP-A-0626169.
 [100] WO99/52549.
 [101] WO01/21207.
 [102] WO01/21152.
 [103] WO02/072012.
 10 [104] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
 [105] WO2004/064715.
 [106] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
 [107] Dyakonova et al. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
 [108] FR-2859633.
 [109] WO90/14837.
 15 [110] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
 [111] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
 [112] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 20 [113] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [114] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
 [115] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
 [116] US-2007/014805.
 25 [117] Suli et al. (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
 [118] WO95/11700.
 [119] Patente US 6,080,725.
 [120] WO2006/113373.
 [121] WO2005/097181.
 30 [122] Han et al. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.*
 [123] US-6630161.
 [124] Hayden et al. (1998) *J Clin Invest* 101(3):643-9.
 [125] Tassignon et al. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.
 35 [126] Myers et al. (1990) páginas 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.*
 [127] Ulrich (2000) Chapter 16 (páginas 273-282) of reference 113.
 [128] Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
 [129] Baldrick et al. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
 [130] US 4,680,338.
 40 [131] US 4,988,815.
 [132] WO92/15582.
 [133] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 [134] Wu et al. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
 [135] Vasilakos et al. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
 45 [136] Patentes US 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
 [137] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 [138] WO2004/060308.
 50 [139] WO2004/064759.
 [140] US 6,924,271.
 [141] US2005/0070556.
 [142] US 5,658,731.
 55 [143] Patente US 5,011,828.
 [144] WO2004/87153.
 [145] US 6,605,617.
 [146] WO02/18383.
 [147] WO2004/018455.
 60 [148] WO03/082272.
 [149] WO2006/002422.
 [150] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 [151] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 [152] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 [153] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
 65 [154] Thompson et al. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.

- [155] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 [156] WO02/26757.
 [157] WO99/62923.
 5 [158] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 [159] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 [160] WO98/40100.
 [161] Patente US 6,207,646.
 [162] Patente US 6,239,116.
 10 [163] Patente US 6,429,199.
 [164] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
 [165] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
 [166] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
 [167] WO01/95935.
 15 [168] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.
 [169] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.
 [170] WO03/035836.
 [171] WO01/22972.
 [172] Thompson et al. (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.
 20 [173] UK patent application GB-A-2220211.
 [174] WO 94/21292.
 [175] WO94/00153.
 [176] WO95/17210.
 25 [177] WO96/26741.
 [178] WO93/19780.
 [179] WO03/011223.
 [180] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 [181] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 [182] US-6586409.
 30 [183] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
 [184] US2005/0215517.
 [185] Potter & Oxford (1979) *BrMed Bull* 35: 69-75.
 [186] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
 [187] Zurbriggen et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
 35 [188] Piascik (2003) *J am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
 [189] Mann et al. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
 [190] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
 [191] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
 40 [192] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
 [193] Gambaryan et al. (1997) *Virology* 232:345-50.

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un proceso para preparar un antisuero de un animal no humano, que comprende los pasos de:
- 5 (i) administrar al animal no humano una hemaglutinina de virus de la gripe purificada; y después
(ii) recuperar del animal no humano suero que contiene anticuerpos que reconocen la hemaglutinina,
caracterizado porque la hemaglutinina usada en el paso (i) es de un virus cultivado en una línea celular
mamífera.
- 10 2. Un proceso para preparar un antisuero de un animal no humano, que comprende los pasos de:
- (i) cultivar virus de la gripe en una línea celular mamífera;
(ii) purificar el antígeno de hemaglutinina del virus cultivado en el paso (i);
15 (iii) administrar la hemaglutinina purificada del paso (ii) al animal no humano; y después
(iv) recuperar del animal no humano suero que contiene anticuerpos que reconocen la hemaglutinina.
3. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el animal no humano es una oveja.
4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la hemaglutinina está libre de materiales
20 derivados de huevo.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye el paso adicional de mezclar el antisuero
con un gel adecuado para un ensayo SRID.
- 25 6. El proceso de la reivindicación 1 en donde la hemaglutinina usado en el paso (i) es de un virus que no se ha
cultivado nunca en huevos.
7. El proceso de la reivindicación 1 en donde la hemaglutinina usada para desarrollar el antisuero es glicosilada con
30 glicanos obtenibles del cultivo en una línea celular mamífera.
8. Un proceso para preparar un kit, que comprende los pasos de (i) hacer un antisuero de acuerdo con una de las
reivindicaciones 1 a 4; (ii) hacer un material de referencia del antígeno por un proceso que comprende los pasos de
(a) cultivar virus de la gripe en una línea celular; (b) purificar virus cultivados en el paso (a); y (c) inactivar los virus,
caracterizado porque el virus de la gripe usado en el paso (a) no se ha cultivado nunca en huevos; y (iii) combinar
35 los productos de los pasos (i) y (ii) en un kit.
9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde la línea celular es una línea celular MDCK.
- 40 10. El proceso de la reivindicación 9 en donde la línea celular MDCK es la MDCK33016.

45

50

55

60

65

Figura 1

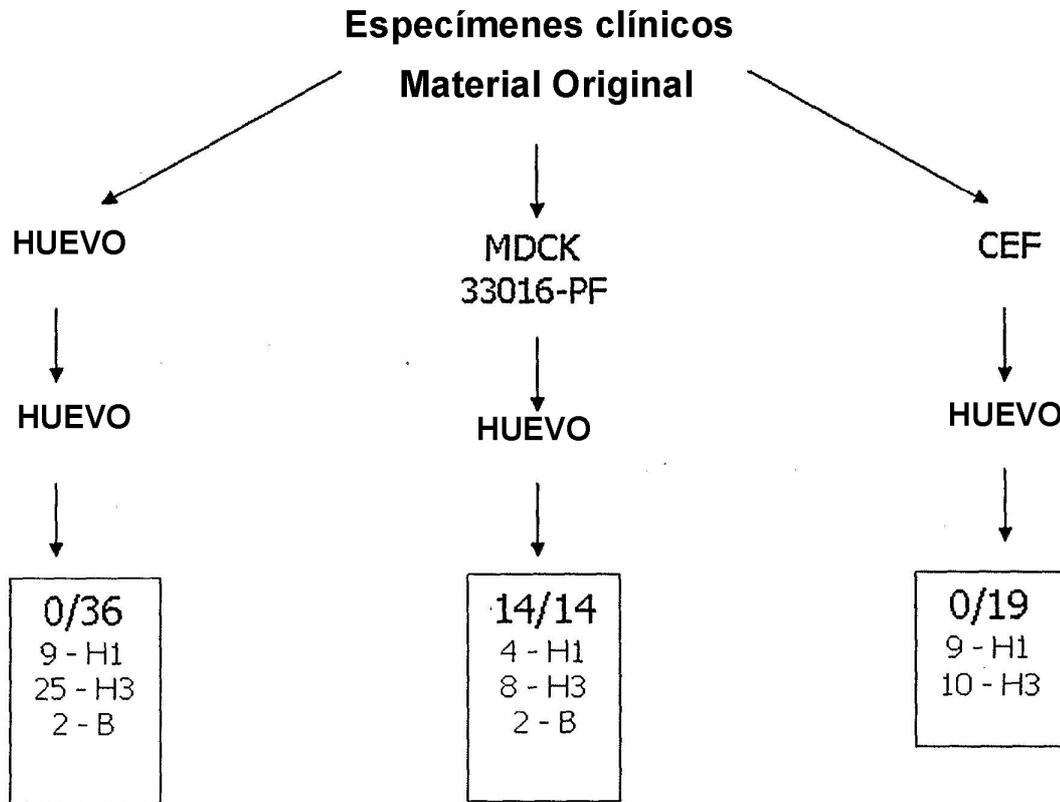


Figura 2

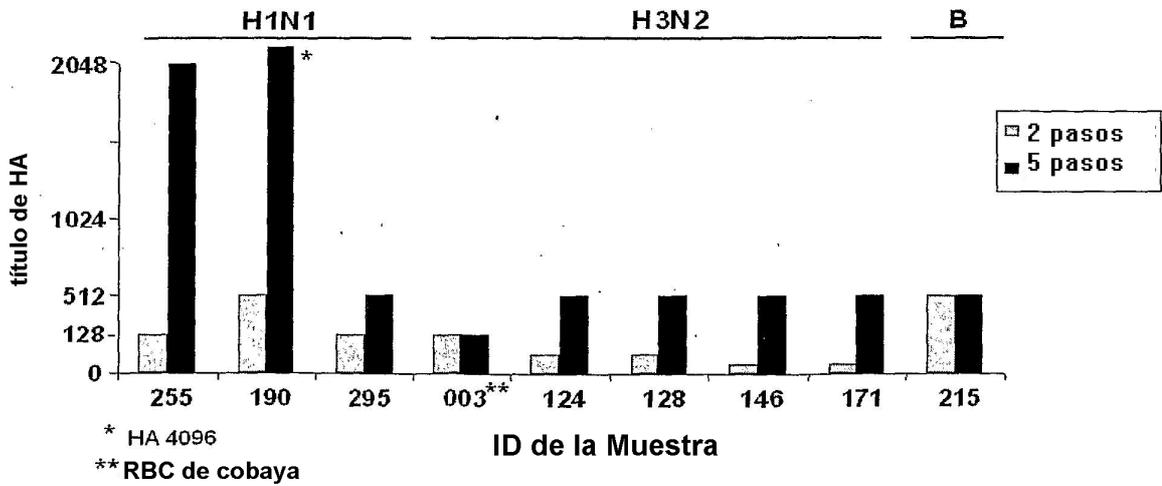


Figura 3

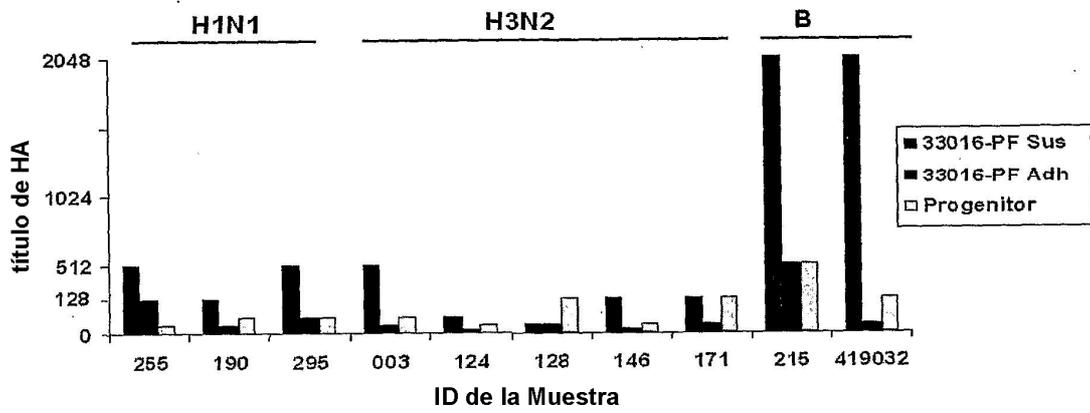


Figura 4

Figura 4A

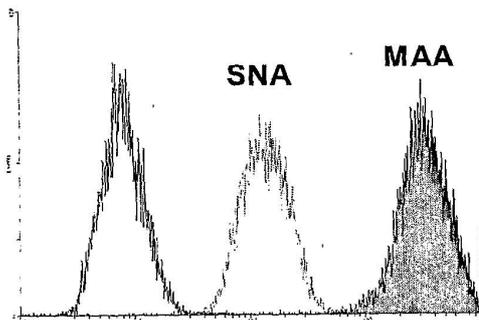


Figura 4B

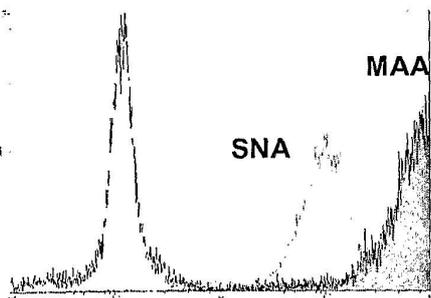


Figura 4C

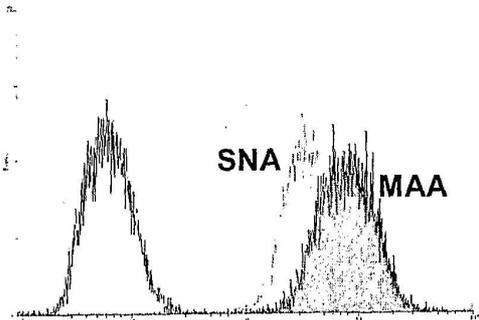


Figura 5

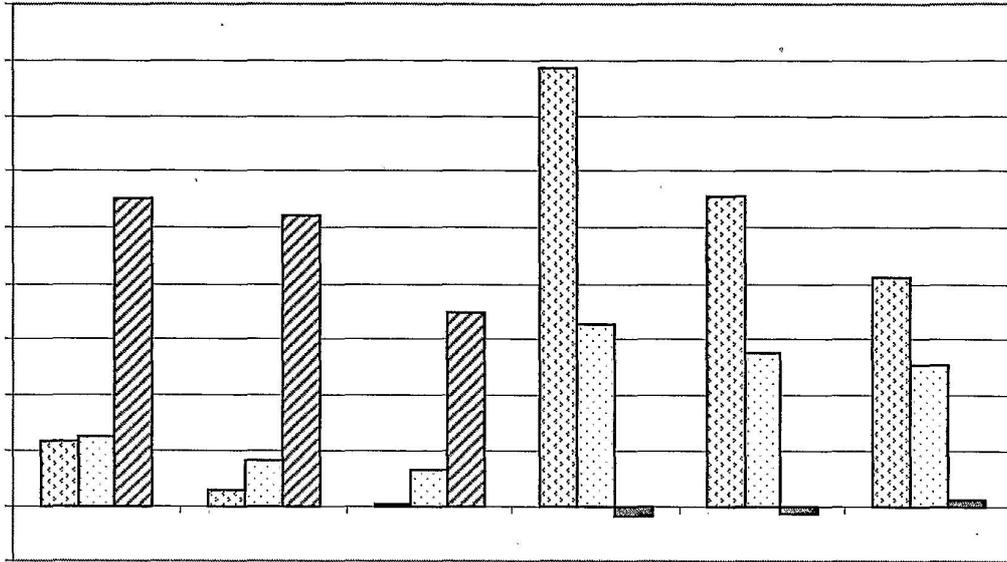


Figura 6

