

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 745**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/08 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2005 E 05853236 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 1824990**

54 Título: **Métodos de producción de composiciones de vacuna contra la gripe**

30 Prioridad:

08.12.2004 US 634690 P

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

28.05.2015

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
ONE MEDIMMUNE WAY
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**DANG, QI y
SCHWARTZ, RICHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 745 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

Métodos de producción de composiciones de vacuna contra la gripe

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las vacunas contra cepas diversas y en evolución de la gripe son importantes no sólo desde un punto de vista sanitario de la población, sino también comercialmente, ya que cada año numerosos individuos son infectados por diferentes cepas y tipos del virus de la gripe. Los niños, los ancianos, aquellas personas sin los cuidados sanitarios adecuados y las personas inmunodeficientes presentan un riesgo especial de muerte por dichas infecciones. Para mayor preocupación, el problema de las infecciones por gripe es que las nuevas cepas de la gripe evolucionan fácilmente, necesitando por ello la continua producción de nuevas vacunas.

15 Durante 50 años se han producido numerosas vacunas capaces de producir una respuesta inmunitaria protectora específica para dichos virus diferentes de la gripe e incluyen, por ejemplo, vacunas de virus completos, vacunas de virus degradados, vacunas de antígenos de superficie y vacunas de virus vivos atenuados. Sin embargo, aunque las formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacunas son capaces de producir una respuesta inmunitaria sistémica, las vacunas de virus vivos atenuados tienen la ventaja de ser también capaces de estimular la inmunidad local de la mucosa en el tracto respiratorio. Una vacuna que comprende un virus vivo atenuado que es susceptible de ser producida de forma rápida y económica y que es susceptible de ser transportada / almacenada con facilidad, es por lo tanto bastante deseable. También serían deseables métodos para aumentar la producción de dichos virus, y por lo tanto de vacunas contra dichos virus, especialmente para las cepas de virus que han demostrado ser difíciles de producir y/o de escalar para la producción comercial mediante el uso de los métodos tradicionales.

25 Hasta la fecha, toda las vacunas contra la gripe disponibles comercialmente en los Estados Unidos se han propagado en huevos de gallina embrionados. Aunque muchas cepas del virus de la gripe crecen bien en los huevos de gallina, la producción de la vacuna depende de la disponibilidad de dichos huevos. Debido a que debe organizarse el suministro de huevos, y las cepas para la producción de las vacunas deben elegirse con meses de antelación con respecto a la siguiente época de gripe, la flexibilidad de esta metodología puede ser limitada, y a menudo da como resultado retrasos y faltas de producción y de distribución. También, algunas cepas del virus de la gripe crecen peor en huevos (por ejemplo, no se producen con un elevado título) que otras cepas de la gripe. Por lo tanto, son altamente deseables métodos para aumentar la producción, por ejemplo, de las cepas deseadas de dichos virus, y por lo tanto de las vacunas.

35 En los años recientes también se han desarrollado sistemas para la producción de virus de la gripe en cultivo celular (véase, por ejemplo, Furminger, Vaccine Production, en Nicholson et al. (eds.) Textbook of Influenza, páginas 324 - 332; Merten et al. (1996), Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, en Cohen & Shafferman (eds.) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines, páginas 141 - 151). Sin embargo, dichos sistemas también pueden implicar la producción o el aumento de escala en huevos, y por lo tanto pueden encontrarse con problemas de productividad, especialmente en lo que respecta a algunas cepas específicas. Por lo tanto, también es muy deseable cualquier método para aumentar la producción de virus / vacunas en estos sistemas.

45 El presente inventor y sus colaboradores han realizado un trabajo considerable en la producción del virus de la gripe para la producción de vacunas; véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 03/091401, el documento WO 05/014862 y las Solicitudes de Patente PCT PCT/US05/017734, depositadas el 20 de mayo de 2005, y el documento PCT/US05/035614, depositado el 4 de octubre de 2005. La presente invención proporciona métodos para aumentar la producción del virus de la gripe y de composiciones de virus para la producción de composiciones de vacuna. Algunos aspectos de la actual invención son aplicables al huevo de gallina tradicional y a nuevos estilos de producción de vacunas en cultivo celular (y también en sistemas combinados) que comprenden las etapas del crecimiento de los virus en huevos de gallina, y comprenden otros numerosos beneficios que serán apreciables a partir de la revisión de lo siguiente.

55 SUMARIO DE LA INVENCION

60 La actual invención está definida por las reivindicaciones. Con más detalle, la invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de partículas reagrupadas del virus de la gripe B adaptadas al frío, comprendiendo el método: (a) introducir una pluralidad de virus reagrupados de la gripe B adaptados al frío en huevos de gallina embrionados SPF; (b) incubar los huevos hospedadores a una temperatura de $31 \pm 0,5$ °C; y (c) recuperar las partículas del virus de la gripe a partir de los huevos hospedadores, mediante lo cual el rendimiento, cuantificado mediante la determinación de un título logarítmico medio del cultivo tisular infeccioso por mililitro de dosis (\log_{10} de la TCID₅₀/ml) del líquido alantoideo de los huevos hospedadores, es de al menos 1,01 veces el rendimiento obtenible mediante el cultivo de los huevos a 33 °C. También se describen en este documento métodos para la producción de partículas del virus de la gripe mediante la introducción de una pluralidad de vectores (por ejemplo, plásmidos, virus, etc., véase a continuación) que comprenden o que codifican para el genoma o el genoma parcial de un virus de la

gripe, en uno o más huevos hospedadores o en otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) e incubar los huevos hospedadores o las otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) a una temperatura por debajo de 33 °C; y recuperar las partículas del virus de la gripe a partir de los huevos hospedadores o de las otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero). La presente divulgación también incluye métodos para aumentar el rendimiento de las partículas del virus de la gripe que comprenden la incubación de dichas partículas víricas a una temperatura por debajo de 33 °C (por ejemplo, a 31 °C) en células hospedadoras (por ejemplo, un cultivo celular continuo de células MDCK o Vero) o en huevos embrionados. El log₁₀ del título de la TCID₅₀/ml de las partículas víricas producidas a una temperatura por debajo de 33 °C puede ser mayor que el de las mismas partículas víricas producidas a 33 °C. Los métodos descritos en este documento pueden incluir la introducción del virus de la gripe (por ejemplo, un virus reagrupado) en uno o más huevos embrionados que son capaces de dar soporte a la replicación del virus de la gripe, infectando así dichos huevos embrionados. Los métodos descritos en este documento también pueden incluir la introducción del virus de la gripe (por ejemplo, un virus reagrupado) en células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) que son capaces de dar soporte a la replicación del virus de la gripe, infectando así dichas células hospedadoras. El virus producido puede ser un virus de la gripe de la cepa B, un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, un virus de la gripe atenuado sensible a la temperatura adaptado al frío, o cualquier combinación de los mismos. El virus puede comprender un esqueleto de PR8, aunque alternativamente, el virus puede comprender un esqueleto de la cepa de la gripe Ann Arbor B, un esqueleto de B/Leningrad/14/17/55, un esqueleto de B/14/5/1, un esqueleto de B/USSR/60/69, un esqueleto de B/Leningrad/179/86, un esqueleto de B/Leningrad/14/55 o un esqueleto de B/England/2608/76. El virus puede ser la B/Jilin/20/03 ca. Los huevos pueden ser huevos de gallina SPF. Las células hospedadoras pueden ser células MDCK. También, la incubación por debajo de 33 °C puede comprender la incubación de los huevos o de otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) a entre 29 °C y 33 °C, o a entre 31 °C y 33 °C, o a entre 31 °C y 32 °C, o a 31 °C.

También se describe en este documento el virus de la gripe producido mediante dichos métodos anteriores, así como las composiciones que comprenden dichos virus, y vacunas contra la gripe que comprenden dichos virus (por ejemplo, vacunas intranasales de virus vivos atenuados). Dicho virus que puede cultivarse mediante la actual divulgación, puede comprender opcionalmente, por ejemplo, CAIV (virus de la gripe adaptados al frío, por ejemplo, en formulaciones trivalentes), virus tales como los de la Publicación PCT WO 05/014862, virus tales como los descritos, por ejemplo, en las Publicaciones PCT WO 01/183794, en el documento WO 00/60050, en el documento USPN 6.544.785 y en el documento USPN 6.649.372, así como otros virus y tipos de virus similares y relacionados.

Estos y otros objetos y características de la invención serán más completamente apreciables cuando se lea la siguiente descripción detallada junto con las figuras y las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1: muestra una tabla que muestra el rendimiento de virus (TCD₅₀/ml) de cepas B ca en función de la temperatura de incubación secundaria.

La Figura 2: muestra el gráfico del rendimiento (TCID₅₀/ml) de cepas B ca en función de la temperatura de incubación secundaria.

La Figura 3: muestra una tabla que muestra el rendimiento de virus (TCID₅₀/ml) de B/Jilin/20/03 ca en función de la temperatura de incubación secundaria.

La Figura 4: muestra una tabla con los fenotipos de diversas cepas de la gripe B ca que expresan los característicos fenotipos ca y ts cuando se cultivan en huevos incubados a unas temperaturas de entre 29 °C y 33 °C.

La Figura 5: muestra una tabla que muestra el título de HA de los líquidos alantoideos de huevos infectados incubados a varias temperaturas y recogidos 72 horas después de la infección.

La Figura 6: muestra una tabla que muestra la cantidad de HA en el ARN vírico del líquido alantoideo de huevos infectados incubados a varias temperaturas.

La Figura 7: muestra una tabla que muestra la proporción entre la copia del genoma y el virus infeccioso determinada mediante la sustracción de la cantidad de partículas infecciosas (log₁₀ de la TCID₅₀) del número de copias.

La Figura 8: muestra una tabla que muestra el porcentaje de partículas infecciosas de B/Jilin/20/03 ca y de B/Ann Arbor/1/94 ca cuando se cultivan a 31 y 33 °C.

La Figura 9: muestra una tabla que muestra las secuencias de nucleótidos de B/Jilin/20/03 ca cultivado a 33 °C (1 Lote) y a 31 °C (2 Lotes) en comparación con el correspondiente MVS.

La Figura 10: muestra una tabla que compara los títulos de HAI de virus cultivados a dos temperaturas con respecto al antisuero producido contra B/Jilin/20/03 wt.

5 La Figura 11: muestra un gráfico que ilustra la replicación del virus en hurones después de la inoculación intranasal con el virus B/Jilin/20/03 *ca* cultivado a 31 o a 33 °C.

La Figura 12: muestra una tabla que compara el título de HAI del suero en el día 14 de hurones inmunizados con B/Jilin/20/03 *ca* cultivado a 31 o a 33 °C.

10 La Figura 13: muestra un gráfico que ilustra el pase secundario de B/Jilin/20/03 *ca* cultivado a 31 y a 33 °C en huevos SPF a diferentes temperaturas de incubación secundaria.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 La presente invención está definida por las reivindicaciones. También se describen en este documento métodos para el aumento en la producción de virus, más específicamente de cepas B del virus de la gripe adaptadas al frío que son adecuadas para la producción de vacunas, que incluyen, pero no se limitan a, FluMist®. Están incluidos métodos para el cultivo de, por ejemplo, cepas víricas, a unas temperaturas disminuidas durante la incubación en huevos (por ejemplo, la incubación secundaria en huevos) o en otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) tras la inoculación. Las características adicionales se describen con más detalle en este documento.

20 Los expertos en la materia apreciarán que la divulgación típica descrita en este documento también comprende las etapas / métodos / composiciones que son conocidos en la materia, por ejemplo, la ovoscopia de los huevos, la inoculación de los huevos con virus, etc. Por lo tanto, los expertos en la materia son capaces de determinar las condiciones apropiadas, subetapas, detalles de etapas, etc., para dichas etapas conocidas para producir los virus, las soluciones víricas, las composiciones apropiadas. Las etapas individuales se describen con mayor detalle a continuación.

25 Los expertos en la materia también apreciarán que no es necesario que todas las diversas etapas de este documento para la producción de virus / vacunas se realicen o existan en la misma serie de producción. Por lo tanto, aunque pueden llevarse a cabo o existir todas las etapas y/o las composiciones descritas o mencionadas en este documento, también, una o más etapas pueden opcionalmente, por ejemplo, omitirse, modificarse (en ámbito, orden, ubicación, etc.) o similares.

35 PRODUCCIÓN DE CEPAS DE LA GRIPE DE B ADAPTADAS AL FRÍO

El rendimiento global de algunas cepas B de la gripe adaptadas al frío (*ca*), tales como la cepa B/Jilin/20/03, que están destinadas a su uso en una formulación de vacuna, es a menudo suficiente para permitir la producción adecuada del número deseado de dosis de vacuna contra la gripe cuando se cultivan siguiendo las condiciones de elaboración actualmente aprobadas de incubación secundaria a 33 °C. También se describen en este documento métodos para la incubación de huevos o de otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) a unas temperaturas de menos de 33 °C, por ejemplo, a 31 °C (u opcionalmente a entre aproximadamente 29 °C y aproximadamente 32 °C), en lugar de a 33 °C, lo que aumenta el rendimiento de dichas cepas y permite por tanto un aumento en la producción del virus para la vacuna. Dichas incubaciones en huevos o en otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) se describen opcionalmente como incubaciones "secundarias" en este documento para diferenciarlas de las incubaciones primarias en huevos a 37 °C usadas para desarrollar los embriones de los huevos o en las células hospedadoras a unas temperaturas más altas usadas para proliferar las células antes de la infección. Algunos ejemplos de este documento comparan las características de la cepa B/Jilin/20/03, y de otras cepas de la gripe B *ca*, cultivadas a 31 °C y a 33 °C, y muestran que un virus cultivado a 31 °C comparte unas características biológicas indistinguibles de las de un virus cultivado a 33 °C.

Los datos incluidos en los ejemplos de este documento demuestran que el mayor rendimiento de B/Jilin/20/03 *ca* a unas temperaturas por debajo de 33 °C (por ejemplo, 31 °C) no es único para la cepa B/Jilin/20/03. Todas las demás cepas de la gripe de B *ca* ensayadas también se replicaban más eficazmente a unas temperaturas por debajo de 33 °C, incluyendo B/Ann Arbor/1/94 *ca*, que ha mostrado una eficacia demostrable en ensayos fundamentales de la vacuna. Además, los ejemplos de este documento muestran la caracterización detallada de la vacuna B/Jilin/20/03 *ca* a partir de virus cultivados a 31 °C y a 33 °C, que enfatiza que las dos vacunas son equivalentes entre sí en las características examinadas. De hecho, las características físicas y biológicas de las cepas de vacunas del B *ca* cultivadas a unas temperaturas por debajo de 33 °C, por ejemplo, a 31 °C, son equivalentes a las de las otras cepas de la gripe B *ca* cultivadas a 33 °C que han sido usadas o ensayadas en seres humanos. Véase a continuación.

Los resultados de la comparabilidad y de las caracterizaciones descritas en los ejemplos de este documento muestran que las curvas de crecimiento de B/Jilin/20/03 *ca* y de otras siete cepas de la gripe B *ca* en huevos producen, todas, unos elevados títulos de virus cuando se cultivan a unas temperaturas por debajo de 33 °C (estando las temperaturas óptimas generalmente entre 29 °C y 32 °C). También, un crecimiento a unas temperaturas menores no modificó negativamente los rasgos biológicos característicos de la vacuna. Por lo tanto, las diferentes

5 cepas de gripe B *ca* de vacuna, incluyendo B/Jilin/20/03 *ca*, expresaron los genotipos característicos de *ca* y sensibilidad a la temperatura (*ts*) tanto si originalmente se cultivaban a 29 °C, a 31 °C o a 33 °C. Adicionalmente, la proporción global entre las partículas totales y las partículas infecciosas era similar entre las diferentes cepas, incluyendo la B/Jilin/20/03 *ca*, y era equivalente entre 31 °C y 33 °C. La cantidad de partículas totales se midió mediante la determinación del número de copias del genoma mediante una RT-PCR cuantitativa. Además, también se midieron las partículas totales de la B/Jilin/20/03 *ca* mediante microscopía de transmisión electrónica. Los ejemplos de este documento también muestran que los genomas de B/Jilin/20/03 *ca* cultivado a 31 °C o a 33 °C, cuando fueron secuenciados, eran idénticos entre sí, así como al de la siembra maestra de virus (MVS), y que la antigenicidad de la B/Jilin/20/03 *ca* cultivada a 31 °C o a 33 °C es sustancialmente la misma, según se demuestra con el ensayo de hemaglutinación-inhibición (HAI). Los ejemplos de este documento también demuestran que la replicación en huevos de la B/Jilin/20/03 *ca* cultivada a 31 °C o a 33 °C es equivalente con respecto al tiempo y a las temperaturas óptimas, y que la replicación en la nasofaringe de hurones de la B/Jilin/20/03 *ca* cultivada a 31 °C o a 33 °C también es equivalente. Adicionalmente, según se muestra mediante los ejemplos de este documento, la inmunogenicidad de la B/Jilin/20/03 *ca* es equivalente cultivada a 31 °C o a 33 °C. Por ejemplo, se inmunizaron grupos de hurones con estas dos preparaciones y se midieron los títulos de HAI de los animales 14 días después de la inmunización. Los títulos medios de HAI de los sueros de estos dos grupos de animales eran idénticos.

20 Dichos datos combinados demuestran que las características biológicas de la B/Jilin/20/03 *ca* son comparables tanto si el virus se cultiva a unas temperaturas por debajo de 33 °C (por ejemplo, a 31 °C) como a 33 °C. Las cepas de la vacuna tienen unas características biofísicas equivalentes (por ejemplo, antigenicidad, proporciones entre partículas totales y partículas infecciosas, y secuencia) así como las propiedades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Adicionalmente, el mejor crecimiento de la B/Jilin/20/03 *ca* a unas temperaturas por debajo de 33 °C (por ejemplo, a 31 °C) también se aplica a otras cepas de la gripe B *ca*. Por lo tanto, la actual divulgación incluye el crecimiento de dichas cepas de virus, por ejemplo, la cepa B/Jilin/20/03 *ca*, o de otras cepas de la gripe b *ca*, a unas temperaturas por debajo de 33 °C (por ejemplo, a 31 °C) para usos tales como la elaboración de vacunas tales como FluMist®, etc.

30 Por lo tanto, también se describe un método para la producción de partículas del virus de la gripe mediante la introducción de al menos un vector (por ejemplo, un virus de la gripe de la cepa B tal como un virus reagrupado 6:2 que opcionalmente puede comprender la cepa de la gripe PR8, la Ann Arbor B, la B/Leningrad/14/17/55, la B/14/5/1, B/USSR/60/69, la B/Leningrad/179/86, la B/Leningrad/14/55, la B/England/2608/76 o la B/Jilin/20/03 *ca*, o uno o más plásmidos) que comprende un genoma, un genoma parcial (por ejemplo, que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete (es decir, menos de todos los segmentos del ARNv) de un virus de la gripe, en al menos un huevo hospedador o en otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) capaces de dar soporte a la replicación del virus de la gripe; la incubación del huevo hospedador o de las otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) a una temperatura por debajo de 33 °C; y, la recuperación de las partículas del virus de la gripe a partir del huevo hospedador o de las otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero). También se describe en este documento un método para aumentar el rendimiento de las partículas de virus de la gripe que comprende la incubación de dichas partículas víricas a una temperatura por debajo de 33 °C (por ejemplo, a 31 °C). También se describe en este documento un método para el aumento en el rendimiento de partículas del virus de la gripe mediante la introducción de al menos un vector que comprende un genoma o un genoma parcial de un virus de la gripe, en al menos un huevo hospedador o en otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero); la incubación del huevo hospedador o de otra célula hospedadora a una temperatura por debajo de 33 °C; en el que el rendimiento de las partículas del virus de la gripe producidas a una temperatura por debajo de 33 °C es mayor de el de las mismas partículas víricas producidas a 33 °C. El log₁₀ del título de la TCID₅₀/ml de las partículas víricas producidas a una temperatura por debajo de 33 °C puede ser mayor que el de las mismas partículas víricas producidas a 33 °C. El log₁₀ del título de la TCID₅₀/ml de un virus producido a una temperatura de menos de 33 °C puede ser de al menos aproximadamente 7,0, o de al menos aproximadamente 7,2, o de al menos aproximadamente 7,4, o de al menos aproximadamente 7,6, o de al menos aproximadamente 7,8, o de al menos aproximadamente 8,0, o de al menos aproximadamente 8,2, o de al menos aproximadamente 8,4, o de al menos aproximadamente 8,6, o de al menos aproximadamente 8,8, o de al menos aproximadamente 9,0, o de al menos aproximadamente 9,2, o de al menos aproximadamente 9,4, o de al menos aproximadamente 9,6, o de al menos aproximadamente 9,8. Los métodos descritos en este documento pueden incluir la introducción del virus de la gripe (por ejemplo, de un virus reagrupado) en uno o más huevos embrionados que son capaces de dar soporte a la replicación del virus de la gripe, infectando así dichos huevos embrionados. Los métodos descritos en este documento pueden incluir la introducción del virus de la gripe (por ejemplo, de un virus reagrupado) en células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) que son capaces de dar soporte a la replicación del virus de la gripe, infectando así dichas células hospedadoras. El virus implicado puede comprender opcionalmente: un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, un virus de la gripe atenuado adaptado al frío sensible a la temperatura; o cualquier combinación de los mismos. Se contempla que el virus implicado sea un virus reagrupado 6:2. El virus implicado puede ser un virus de la gripe de la cepa B reagrupado 6:2. Las cepas B del virus de la gripe que pueden ser utilizadas en los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, cepas de la gripe PR8, la Ann Arbor B (por ejemplo, la B/Ann Arbor/1/94, la B/Ann Arbor/1/66, la B/Leningrad/14/17/55, la B/14/5/1, la B/USSR/60/69, la B/Leningrad/179/86, la B/Leningrad/14/55, la B/England/2608/76 o la B/Jilin/20/03 *ca*). También, el virus implicado puede comprender al menos un segmento de una cepa de la gripe Ann Arbor B o un virus B elegido de entre el grupo:

B/Leningrad/14/17/55, B/14/5/1, B/USSR/60/69, B/Leningrad/179/86, B/Leningrad/14/55, B/England/2608/76 y B/Jilin/20/03 ca.

El huevo hospedador puede ser un huevo de gallina embrionado SPF. La célula hospedadora puede ser una célula animal. Las células animales útiles para la producción del virus de la gripe son conocidas en la materia e incluyen, pero no se limitan a, células MDCK (véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. 4.500.413 y 6.455.298), células Vero (véase, por ejemplo, el documento 6.146.873) y células PerC6 (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 01/38362 y WO 02/40665). La célula hospedadora puede ser una célula MDCK. También, la incubación puede producirse a entre aproximadamente 29 °C y aproximadamente 33 °C, a entre aproximadamente 31 °C y aproximadamente 33 °C, o a entre aproximadamente 31 °C y aproximadamente 32 °C, o aproximadamente a 31 °C. Adicionalmente, la incubación puede producirse a entre 29 °C y 33 °C, a entre 31 °C y 33 °C, o a entre 31 °C y 32 °C, o a 31 °C. También se describe en este documento un virus de la gripe producido mediante los métodos de este documento, y las composiciones de vacunas que comprenden dicho virus (por ejemplo, vacunas intranasales líquidas de virus vivos atenuados, tales como FluMist).

Los métodos descritos en este documento pueden comprender métodos en los que el título (\log_{10} de la TCID₅₀/ml) resultante de la incubación de los huevos o de otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero) por debajo de 33 °C es mayor o igual a un título resultante de la incubación de la misma partícula vírica (es decir, el mismo tipo / cepa de virus, etc.) a 33 °C o más. Dicha comparación se realiza opcionalmente entre las incubaciones a 31 °C y las incubaciones a 33 °C. El \log_{10} del título de la TCID₅₀/ml resultante de la incubación a 31 °C puede ser desde al menos aproximadamente 1,01 hasta al menos aproximadamente 1,10 veces mayor, desde al menos aproximadamente 1,025 hasta al menos aproximadamente 1,05 mayor, o desde al menos aproximadamente 1,03 hasta al menos aproximadamente 1,04 veces mayor, que el \log_{10} del título de la TCID₅₀/ml resultante de la incubación a 33 °C. También, el \log_{10} del título de la TCID₅₀/ml resultante de la incubación a 31 °C puede ser desde al menos 1,01 hasta al menos 1,10 veces mayor, desde al menos 1,025 hasta al menos 1,05 mayor, o desde al menos 1,03 hasta al menos 1,04 veces mayor que el \log_{10} del título de la TCID₅₀/ml resultante de la incubación a 33 °C.

Los métodos descritos en este documento comprenden formas de realización en las que el fenotipo *ca y/o ts* de la partícula vírica es esencialmente similar cuando el virus se incuba por debajo de 33 °C (por ejemplo, a 31 °C) o a 33 °C o más (por ejemplo, a 33 °C). También, los métodos descritos en este documento pueden comprender formas de realización en las que el rendimiento vírico de la partícula vírica resultante de la incubación por debajo de 33 °C (por ejemplo, a 31 °C) es mayor o igual al rendimiento vírico de la misma partícula vírica cuando se incuba a 33 °C (por ejemplo, a 33 °C) o más. Aquí, el rendimiento vírico se cuantifica opcionalmente a través del uso de un ensayo de dosis infecciosa media en cultivo tisular (TCID₅₀) que mide los viriones infecciosos en el líquido alantoideo de los huevos hospedadores infectados con la partícula vírica que son incubados a menos de 33 °C y un ensayo de dosis infecciosa media en cultivo tisular (TCID₅₀) que mide los viriones infecciosos en el líquido alantoideo de los huevos hospedadores infectados con la partícula vírica que son incubados a 33 °C o más. Alternativamente, el rendimiento vírico se cuantifica opcionalmente a través del uso de un título de hemaglutinación del líquido alantoideo de los huevos hospedadores infectados con la partícula vírica que son incubados a menos de 33 °C y un título de hemaglutinación del líquido alantoideo de los huevos hospedadores que son infectados con la partícula vírica e incubados a 33 °C o más. El rendimiento vírico también se cuantifica opcionalmente mediante la comparación entre la cantidad de ARN vírico en el líquido alantoideo de los huevos hospedadores infectados con la partícula vírica incubados a menos de 33 °C y la cantidad de ARN vírico en el líquido alantoideo de los huevos hospedadores infectados con la partícula vírica e incubados a 33 °C o más. El rendimiento vírico también se cuantifica opcionalmente mediante una comparación entre el porcentaje de partículas infecciosas en el líquido alantoideo de los huevos hospedadores que son infectados con la partícula vírica que son incubados a menos de 33 °C y el porcentaje de partículas infecciosas en el líquido alantoideo de los huevos hospedadores que son infectados con la partícula vírica e incubados a 33 °C o más. El rendimiento vírico se cuantifica opcionalmente a través del uso de un ensayo de dosis infecciosa media en cultivo tisular (TCID₅₀) que mide los viriones infecciosos en el líquido alantoideo del sobrenadante de las células hospedadoras infectadas con la partícula vírica que son incubadas a menos de 33 °C y un ensayo de dosis infecciosa media en cultivo tisular (TCID₅₀) que mide los viriones infecciosos del sobrenadante de las células hospedadoras infectadas con la partícula vírica que son incubadas a 33 °C o más. Alternativamente, el rendimiento vírico se cuantifica opcionalmente a través del uso de un título de hemaglutinación del sobrenadante de las células hospedadoras infectadas con la partícula vírica que son incubadas a menos de 33 °C y un título de hemaglutinación del sobrenadante de las células hospedadoras infectadas con la partícula vírica que son incubadas a 33 °C o más. El rendimiento vírico también se cuantifica opcionalmente mediante la comparación entre la cantidad de ARN vírico en el sobrenadante de las células hospedadoras infectadas con la partícula vírica incubadas a menos de 33 °C y la cantidad de ARN vírico en el sobrenadante de las células hospedadoras infectadas con la partícula vírica e incubadas a 33 °C o más. El rendimiento vírico también se cuantifica opcionalmente mediante una comparación entre el porcentaje de partículas infecciosas en el sobrenadante de las células hospedadoras que son infectadas con la partícula vírica que son incubadas a menos de 33 °C y el porcentaje de partículas infecciosas en el sobrenadante de las células hospedadoras que son infectadas con la partícula vírica e incubadas a 33 °C o más.

Los métodos descritos en este documento pueden incluir aquellos en los que una secuencia de ácidos nucleicos de la partícula vírica infecciosa incubada a menos de 33 °C es idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de la partícula vírica infecciosa cuando se incubaba a 33 °C o más. También, los métodos descritos en este documento pueden incluir aquellos en los que la antigenicidad de las partículas víricas que son incubadas a menos de 33 °C es sustancialmente la misma que la antigenicidad de las mismas partículas víricas (es decir, el mismo tipo de virus, etc.) cuando se incuban a 33 °C o más. Dicha antigenicidad se mide opcionalmente mediante un ensayo HAI. Adicionalmente, los métodos descritos en este documento pueden incluir aquellos en los que las partículas víricas provocan una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, un hurón, un ser humano, un primate no humano, un mamífero), que es esencialmente la misma, o similar, a la respuesta inmunitaria provocada en el mismo sujeto (o tipo de sujeto), por una partícula vírica del mismo tipo producida a través de una incubación a 33 °C o más.

EJEMPLOS: CARACTERIZACIÓN / COMPARACIÓN DE B/JILIN/20/03 Y OTROS VIRUS B CULTIVADOS A 31 °C Y A 33 °C

Curvas de crecimiento de B/Jilin/20/03 ca y de otras cepas de la gripe B ca

Como se observa en los ejemplos actuales, el rendimiento óptimo de las cepas de la gripe B ca era el mayor después de la incubación de huevos de gallina embrionados exentos de patógenos específicos (SPF) a entre 30 °C y 32 °C. Se inocularon los huevos embrionados SPF con una diversidad de diferentes cepas de la gripe B ca a aproximadamente 2,1 log₁₀ de la TCID₅₀/huevo y se incubaron a unas temperaturas que varían entre 28 °C y 35 °C durante 60 - 72 horas. Después de la incubación se recogieron los líquidos alantoideos de los huevos infectados y se titularon. Según se muestra en la tabla de la Figura 1 y en la gráfica de la Figura 2, la temperatura óptima de incubación estaba por debajo de 33 °C, y normalmente era de entre 31 °C y 32 °C. Como puede observarse, los perfiles de temperatura eran similares para todas las cepas ensayadas, incluyendo la B/Ann Arbor/1/94 ca, que tenía una eficacia clínica significativa frente a la gripe B wt (véase, por ejemplo, Belshe, et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 2001, 356: 1947 - 1951, y Belshe, et al., Pediatrics, 2001, 108: 24+) y la B/Jilin/20/03 ca, que es una cepa de particular significación en las recientes temporadas de gripe. Véanse las Figuras 2 y 3.

La temperatura óptima de incubación para cada cepa se determinó mediante la interpolación de la línea polinómica de mejor ajuste a lo largo de los puntos de datos para cada cepa. Se incubaron siete cepas de la gripe B ca, incluyendo representantes tanto de la estirpe Yamagata (B/Ann Arbor/1/94, B/Victoria/504/2000 y B/Johannesburg/5/99) como de la estirpe Victoria (B/Yamanashi/166/98, B/Brisbane/32/2002 y B/Beijing/243/97) a varias temperaturas, y se recogieron entre 60 y 72 horas después de la infección. La temperatura óptima estaba por debajo de 33 °C, y normalmente entre 31 °C y 32 °C. Véase la Figura 2. En la Figura 3 se muestran tres replicados independientes del perfil de temperatura de B/Jilin/20/03 ca. Como puede observarse, la temperatura óptima de incubación para la B/Jilin/20/03 ca era de aproximadamente 31 °C.

Ensayo del fenotipo de adaptación al frío (ca) y de sensibilidad a la temperatura (ts) -- Proporción de títulos de virus a 25 °C, a 33 °C y a 37 °C en células renales primarias de pollo

Se demostró que las cepas de la gripe B adaptadas al frío cultivadas en huevos embrionados SPF a entre 29 °C y 33 °C expresaban los fenotipos característicos ca y ts. Con objeto de demostrar que las condiciones de incubación no tendrían ningún impacto sobre las propiedades biológicas de una vacuna resultante, los materiales cultivados a diversas temperaturas fueron evaluados para comprobar la presencia de los fenotipos característicos ca y ts. Todas las cepas mostraron estos rasgos característicos, indicando por tanto que la temperatura de incubación de los huevos no tendría ningún impacto sobre las cepas de la vacuna. Véase la Figura 4.

Mediciones de rendimiento vírico a través del título de hemaglutinación (HA), la cantidad de ARN vírico y el porcentaje de partículas infecciosas

Otras mediciones del rendimiento vírico son coherentes con el rendimiento de los virus infecciosos. Las muestras de virus recogidas a diversas temperaturas fueron ensayadas para comprobar la actividad de HA, y la cantidad de ARN vírico se cuantificó mediante una PCR cuantitativa de transcripción inversa (QRT-PCR). Los resultados mostrados en las Figuras 5 y 6 eran coherentes con los resultados de la TCID₅₀. La mayor actividad de HA y cantidad de ARNv se observaron en los huevos que habían sido incubados a 31 °C.

La cantidad de ARN vírico con el segmento del gen HA en el líquido alantoideo de los huevos infectados incubados a diversas temperaturas y recogidos 72 horas después de la infección se proporciona en la Figura 6.

La proporción entre las partículas totales, medidas bien por el número de copias del genoma o bien mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), y las partículas infecciosas, también es evaluada en los ejemplos de este documento. La proporción entre el número de copias y la TCID₅₀ (Figura 7) reveló que existe una proporción constante entre el número de copias génicas y la TCID₅₀ entre las muestras incubadas a 31 °C o a 33 °C.

En los ejemplos se usó la TEM para evaluar la proporción entre las partículas víricas y las TCID₅₀ para las muestras seleccionadas. De forma similar a las proporciones de genoma:TCID₅₀, este análisis demostró que

aproximadamente un 3,3 % de las partículas totales de B/Jilin/20/03 cultivadas a 31 °C eran infecciosas. Véase la Figura 8. El porcentaje de partículas infecciosas para la B/Jilin/20/03 cultivada a 31 °C es comparable al valor obtenido a 33 °C ,y también es similar a los valores obtenidos para la B/AnnArbor/01/94 cultivada a 31 o a 33 °C. Estas proporciones también están en el intervalo de las de otras cepas de la gripe B ca de vacunas notificadas previamente.

Análisis de la secuencia genómica de virus B/Jilin/20/03 cultivados a 31 °C o a 33 °C

Según se muestra en los ejemplos de este documento, se extrajeron los ARN víricos (ARNv) a partir de virus cultivados a 31 °C y a 33 °C y se secuenciaron. Las secuencias genómicas de estos virus cultivados a diferentes temperaturas son idénticas entre sí y a la del MVS. Véase la Figura 9.

Antigenicidad demostrada mediante un HAI de la B/Jilin/20/03 ca cultivada a 31 °C o a 33 °C

Se ensayaron los virus de los ejemplos para determinar si sus características antigénicas eran comparables. Se evaluaron los títulos de HAI de la B/Jilin/20/03 ca cultivada a 31 °C y a 33 °C con respecto al antisuero de referencia para la B/Jilin/20/03. Los títulos de HAI estaban en unas dos veces entre sí, demostrando que su antigenicidad es idéntica. Véase la Figura 10.

Características *in vivo* de virus cultivados a 31 °C o a 33 °C

Con objeto de evaluar el rendimiento de la vacuna cultivada a estas dos temperaturas, se inocularon grupos de cinco hurones (seronegativos) intranasalmente con 7,0 log₁₀ de la TCID₅₀ de virus cultivados a 31 °C o a 33 °C. La replicación de la vacuna en la nasofaringe de estos animales se determinó midiendo el título vírico en muestras del lavado nasal en diversos puntos temporales tras la inmunización. La replicación del virus de la vacuna era equivalente tanto en cantidad como en duración entre los dos grupos. Véase la Figura 11. Además, se extrajeron muestras de sangre de los animales 14 días después de la inmunización y se determinaron los títulos de anticuerpo en los sueros contra la B/Jilin/20/03 wt mediante un HAI. Las respuestas de los anticuerpos a la inmunización eran idénticas entre los dos grupos de animales, demostrando así que la vacuna es igualmente inmunógena tanto si se cultiva a 31 °C como a 33 °C. Véase la Figura 11.

Con objeto de demostrar que el cultivo de la B/Jilin/20/03 ca a 31 °C no tenía ningún impacto sobre su capacidad para crecer a unas temperaturas similares a las encontradas en la nasofaringe humana, se inocularon vacunas cultivadas tanto a 31 °C como a 33 °C en huevos SPF y se incubaron a unas temperaturas de entre 30 °C y 33 °C. Según se muestra en la Figura 13, ambas vacunas se replicaron con unos perfiles de temperatura equivalentes, produciendo ambas los mayores títulos aproximadamente a 31 °C (la temperatura que se espera encontrar en las vías aéreas superiores del ser humano).

Los datos presentados en los ejemplos de este documento demuestran que las características biológicas y biofísicas de la B/Jilin/20/03 ca son comparables cuando se cultivan a 31 °C o a 33 °C. La cepa de vacuna cultivada a estas temperaturas tiene unas características biofísicas equivalentes (antigenicidad, proporción entre partículas totales y partículas infecciosas, y secuencia) así como las propiedades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo la expresión de los fenotipos *ca* y *ts*, la replicación y la inmunogenicidad en animales, y la replicación en huevos a diferentes temperaturas. Sin embargo, el virus cultivado a 31 °C, por oposición a 33 °C, mostró la mayor producción de virus. Adicionalmente, en este documento también se muestra el mejor crecimiento de la B/Jilin/20/03 a 31 °C ca para otras cepas de la gripe B ca ensayadas. Por lo tanto, los ejemplos de este documento apoyan las reivindicaciones de la actual invención en el cultivo de la cepa B/Jilin/20/03 ca (y de otras cepas de la gripe B ca) a unas temperaturas de menos de 33 °C, por ejemplo, a 31 °C (u opcionalmente a entre aproximadamente 29 °C y aproximadamente 32 °C), en lugar de a 33 °C, en huevos o en otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero), por ejemplo, para su uso en la elaboración de vacunas tales como FluMist® o de otras vacunas.

EJEMPLOS: MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos del fenotipo - *ca* y *ts*

Los ensayos de fenotipos se realizaron con células renales primarias de pollo (PCK) preparadas a partir de pollos de 3 días de edad. Las muestras se ensayaron para comprobar el fenotipo *ca* y *ts*. En resumen, las células PCK se lavaron con medio exento de suero (PAM) y se usaron en la titulación de las muestras. Las capas de células lavadas fueron inoculadas con el virus apropiado y se incubaron a las temperaturas indicadas. Después, las capas celulares se examinaron para comprobar el efecto citopático causado por la replicación del virus en las células, dando como resultado células muertas. Los fenotipos fueron asignados como: *ca* - la diferencia en el título medio de la TCID₅₀ entre 33 °C y 25 °C era de dos logs o menos; y, *ts* - la diferencia en el título medio de la TCID₅₀ entre 37 °C o 39 °C y 33 °C era de dos logs o más. Las muestras ensayaron por duplicado a 25 °C, a 33 °C y a 37 °C. Las placas se incubaron durante seis días (fenotipo *ts*) o diez días (fenotipo *ca*) y las lecturas del CPE se realizaron al final de la incubación. Los títulos notificados en los ejemplos de este documento eran un promedio de la TCID₅₀/ml ± DT.

ES 2 536 745 T3

Ensayos de HA y de HAI

5 El ensayo de hemaglutinación (HA) se realizó mediante el uso de un 0,5 % de RBC de pollo preparados en PBS. Las muestras se diluyeron sucesivamente dos veces en placas de 96 pocillos en un volumen de 50 µl. A la muestra diluida sucesivamente se añadieron 50 µl de un 0,5 % de RBC de pollo y se mezclaron, y las placas se incubaron durante un mínimo de 30 minutos antes de ser leídas para comprobar la actividad de HA. Cada muestra fue ensayada por duplicado y el título de HA se notificó como la media de dos duplicados.

10 En el ensayo de HAI las muestras séricas se trataron y se diluyeron sucesivamente dos veces comenzando con una dilución de 1:4 en un volumen de 25 µl. Se añadieron veinticinco microlitros de virus, correspondientes a 4 unidades de HA y se mezclaron, y la muestra se incubó durante media hora a la temperatura ambiente. Al final de la incubación se añadieron 50 µl de un 0,5 % de RBC de pollo y se mezclaron, y las placas se incubaron durante un mínimo de 30 minutos antes de ser leídas para comprobar la actividad de HAI.

15 Replicación e inmunogenicidad en hurones

Se obtuvieron hurones (de 7 semanas de edad) y se pusieron en cuarentena en una instalación controlada durante 2 semanas. Se preparó un volumen reciente de inóculo suficiente para administrar 1 ml a cada uno de los cinco hurones mediante la dilución de soluciones madre del virus de la gripe hasta una dosis final de 7,05 log₁₀ de la TCID₅₀ en 1x de SPG.

20 Se extrajeron muestras sanguíneas de los animales para obtener una muestra sérica previa a la inmunización, y después se inmunizaron intranasalmente con 1 ml (0,5 ml por fosa nasal) de la B/Jilin/20/03 ca que había sido cultivada a 31 °C o a 33 °C. Después de la incubación se recogieron muestras nasales de cada hurón a unos intervalos específicos entre 8 y 168 horas después de la inmunización mediante el lavado de las fosas nasales con 1 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato. Las muestras del lavado nasal recuperadas fueron congeladas inmediatamente y almacenadas a -80 °C hasta que fueron usadas para la titulación vírica. El suero se recogió en los días 0, 14, 21 y 28 para la determinación de la respuesta de HAI.

30 Para medir el título de virus en las muestras de lavados nasales, se sembraron células MDCK en placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos y se cultivaron hasta una confluencia del 100 % a 37 °C y a un 5 % de CO₂. Inmediatamente antes de ensayar las muestras de lavados nasales, se eliminó el medio de crecimiento celular de cada pocillo, las células se lavaron dos veces con medio de crecimiento vírico incompleto (VGM) sin TPCK-tripsina, y después con VGM completo (0,18 ml), a cada pocillo se añadió TPCK-tripsina. Al mismo tiempo se descongelaron las muestras de lavados nasales y se diluyeron sucesivamente con VGM completo. Después se añadieron alícuotas (0,02 ml) de virus diluidos o sólo de medio (control negativo) a ocho pocillos cada una en placas por triplicado. Las placas se colocaron a 33 °C a un 5 % de CO₂ durante seis días y después se evaluaron microscópicamente para comprobar la presencia del efecto citopático vírico (CPE) en cada pocillo. El número de pocillos positivos para el CPE por placa se convirtió en un valor de dosis infecciosa mediana (TCID₅₀/ml) mediante el uso del método de Karber.

Replicación en huevos

45 Con objeto de producir los líquidos alantoideos que contienen virus para las diferentes cepas B ca, se almacenaron huevos exentos de patógenos específicos (SPF) durante menos de 7 días a 14 ± 2 °C después de su recepción, y se incubaron a 37,5 ± 1 °C y a un 70 ± 10 % de humedad relativa durante 264 ± 12 horas. Después de la incubación, se retiraron los huevos, se comprobaron mediante un ovoscopio y los huevos aceptables fueran inoculados con aproximadamente 2,1 log₁₀ de la TCID₅₀/huevo de virus, y se incubaron a unas temperaturas que varían entre 28 °C y 35 °C durante 48, 60 72 u 84 horas. Después, los huevos se comprobaron mediante un ovoscopio y se refrigeraron a 5 ± 3 °C durante 12 - 24 horas antes de recogerlos. Se desinfectó la superficie de los huevos mediante una pulverización con etanol al 70 % v/v y se transfirieron a una cámara de bioseguridad (BSC) y se dejaron secar al aire. Se prepararon los huevos de la BSC para ser recogidos punzando la parte superior del huevo mediante el uso de un punzón para huevos. Las cáscaras punzadas de los huevos se retiraron mediante el uso de una espátula de acero inoxidable estéril, y posteriormente se recogió el líquido alantoideo mediante el uso de una pipeta de 10 ml. Se recogió el líquido alantoideo recogido en cada punto temporal de recogida y las muestras se alícuotaron y se almacenaron a, o por debajo de, -60 °C antes de su titulación.

Ensayo de la TCID₅₀

60 El ensayo de la TCID₅₀ se realizó de acuerdo con el siguiente método. Por supuesto se apreciará que también podrían usarse otros ensayos similares. Para el ensayo se usaron placas de 96 pocillos y células renales caninas Madin Darby (MDCK) de 4 días de edad confluentes al 100 %. Las placas de cultivo celular se lavaron 2 veces con medio de crecimiento de virus (VGM) mediante el uso de un Skatron™ Cell Washer. A cada placa se añadieron 180 µl por pocillo de VGM completo con tripsina y las placas se pusieron a 33 °C y un 5 % de CO₂ hasta la inoculación. Al mismo tiempo se descongelaron las muestras de virus de ensayo y de virus de control y se diluyeron previamente en VGM con tripsina en bloques de predilución de 96 pocillos. Las muestras se diluyeron sucesivamente 10 veces

5 hasta entre 10-3 y 10-4 mediante el uso de una estación de pipeteo SerialMate. Entonces las muestras de virus se transfirieron desde los bloques de predilución hasta las columnas 1^a y 12^a de bloques de dilución recién preparados llenados con VGM con tripsina. Las muestras se diluyeron sucesivamente adicionalmente con una estación de pipeteo SerilMate hasta entre 10-5 y 10-10. Las placas de cultivo de las células MDCK que contenían VGM con tripsina se retiraron de la estufa de incubación y se inocularon con las muestras de virus diluidas mediante el uso de una estación de pipeteo SerialMate. Las placas se pusieron a 33 °C y a un 5 % de CO2 durante seis días. Se añadió colorante de metiltiazoltetrazolio (MTT) a las placas de cultivo tisular para detectar el efecto citopático (CPE). Después las placas se leyeron con un espectrofotómetro para determinar el número de pocillos con CPE en las placas de cultivo tisular. El título de la TCID₅₀ de las muestras se calculó basándose en el número total de pocillos con CPE.

Análisis de la secuencia

15 Se analizaron tres materiales víricos mediante secuenciación. Dos expansiones víricas, la Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773 y la Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773, se cultivaron a 33 °C y a 31 °C, respectivamente. También se incluyó en el estudio un lote del fabricante, el lote N° 600054C, cultivado a 31 °C. Como referencia se usó la B/Jilin/20/03 MVS, Lote N° 0141900073.

20 Para la secuenciación se aisló el ARN vírico mediante el uso del QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Venlo, Holanda) y el ADNc se amplificó mediante una RT-PCR como molde. Las reacciones de la secuencia se llevaron a cabo mediante el uso de un ABI PRISM TM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) con un conjunto de cebadores específicos de la secuencia y cada molde de ADNc amplificado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de extensión de la secuencia se purificaron y se analizaron mediante una electroforesis capilar mediante el uso de un ABI Genetic Analyzer 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados de las secuencias se analizaron mediante el uso de un DNA Sequencing Analysis (Applied Biosystems) y un Sequencer (Gene Codes Corp.).

Q RT-PCR para las determinaciones del número de copias genómicas

30 Para determinar el número de copias genómicas se extrajo el ARN por duplicado o por triplicado mediante el uso del Qiagen QIAamp Viral RNA mini kit. El ARN se retrotranscribió por duplicado mediante el uso del High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los ADNc se analizaron individualmente mediante una Q-PCR mediante el uso de cebadores y una sonda específica para el gen HA del virus de la gripe B mediante el uso del TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) en el ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los resultados se analizaron mediante el uso del programa informático Sequence Detection, Versión 1.9 (Applied Biosystems) y los valores se convirtieron a copias/ml con Microsoft Excel.

40 La cantidad de ARN vírico se determinó mediante el uso de una curva estándar generada con diluciones sucesivas de un plásmido que contiene el gen HA de B/Yamanashi. El plásmido se diluyó desde 10 pg hasta 1 fg por reacción. La cantidad por reacción se convirtió en virus/ml multiplicando los fg de ARN de HA/reacción x 4.000.000 (virus diluido a 1:10 antes de la extracción, ARN diluido a 1:10 durante la etapa de la RT, 5 µl de ADNc analizado, con aproximadamente 200 moléculas de ARN vírico por fg de plásmido HA). Estos cálculos asumen una eficacia del 100 % para todas las etapas, y que no hay ARN extravírico presente.

Recuento de partículas totales mediante el uso de microscopía de transmisión electrónica

50 Las determinaciones del recuento de partículas totales mediante microscopía de transmisión electrónica fueron realizadas por Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD. Cada preparación se agitó vorticialmente y se suspendió concienzudamente. Se mezclaron dieciocho microlitros de cada muestra con un volumen igual de una solución que contenía un estándar de esferas de látex, en tubos de micrófuga por separado (esferas de látex de 110 nM de diámetro; 1,5 x 10¹⁰ partículas por mililitro; Structure Probe Inc., West Chester, PA). Las mezclas de partícula vírica / esferas de látex se diluyeron en agua ultrapura a una dilución 1:10 en tubos de micrófuga por separado, y agitaron vorticialmente y se suspendieron concienzudamente. Para preparar las rejillas se juntaron estrechamente rejillas de cobre de 300 de malla recubiertas con formvar y carbono y se cerraron con pinzas. Cada rejilla se aclaró con albúmina sérica bovina al 0,01 % y el exceso de solución se eliminó mediante el uso de papel de filtro. Cada muestra se diluyó en agua ultrapura, variando desde 1:3 hasta 1:15 en diluciones variables. Se puso una alícuota de 2,5 microlitros de cada muestra diluida en rejillas por separado y se dejó secar al aire durante aproximadamente cinco minutos. Después de cinco minutos se eliminó cualquier exceso de material de las rejillas mediante el uso de papel de filtro. Después de que cada rejilla se hubiera secado completamente al aire, las muestras se fijaron y se tiñeron con 20 microlitros de ácido fosfotúngstico acuoso al 2,0 %, que se puso en cada mejilla y se dejó incubar durante 30 segundos. Cualquier exceso de tinción se eliminó con papel de filtro. Cada muestra se examinó concienzudamente y se contó el número total de partículas víricas mediante el uso de un microscopio de transmisión electrónica Hitachi HU-12A.

DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS GENERALES EN LA PRODUCCIÓN DE LA VACUNA

Para facilitar el análisis y la descripción, puede considerarse que las diversas etapas de la producción de la composición de vacuna en general comprenden o entran en cuatro amplios grupos. El primer grupo comprende aspectos tales como la infección conjunta, el reagrupamiento, la selección de reagrupados y la clonación de reagrupados. El segundo grupo comprende aspectos tales como la purificación y la expansión de los reagrupados. El tercer grupo comprende la expansión adicional de los reagrupados en huevos o en otras células hospedadoras (por ejemplo, MDCK y Vero), junto con la recogida y la purificación de dichas soluciones víricas recogidas. El cuarto grupo comprende la estabilización de las soluciones víricas recogidas y los ensayos de potencia / esterilidad de las soluciones víricas. Sin embargo, debe entenderse que la división de los aspectos de la invención en las cuatro anteriores categorías generales es únicamente con fines explicativos / organizativos y no debería realizarse inferencia alguna de interdependencia de las etapas, etc. De nuevo, se apreciará que opcionalmente se usan otras etapas (tanto similares como diferentes) con los métodos de la invención (por ejemplo, los métodos de incubación, por ejemplo, la incubación secundaria del huevo, a 31 °C).

Como se ha mencionado anteriormente, para facilitar el análisis y la descripción, puede considerarse que las diversas etapas de la producción de la vacuna comprenden cuatro amplios grupos. El primer grupo comprende aspectos tales como la infección conjunta, el reagrupamiento, la selección de reagrupados y la clonación de reagrupados

GRUPO 1

Los aspectos de la producción de la composición de vacuna que se clasifican ampliamente en este documento como pertenecientes al Grupo 1 comprenden métodos y composiciones relacionados con la optimización de la infección conjunta de las líneas de cultivo celular, por ejemplo, con un virus maestro donante y uno o más tipos de virus naturales, con objeto de producir específicamente los virus reagrupados deseados; la selección de los virus reagrupados apropiados; y la clonación de los virus reagrupados seleccionados. El reagrupamiento de las cepas de virus de la gripe es bien conocido por los expertos en la materia. El reagrupamiento tanto del virus de la gripe A como del virus de la gripe B se ha usado tanto en cultivo celular como en huevos para producir cepas víricas reagrupadas. Véase, por ejemplo, Tannock et al., Preparation and characterisation of attenuated cold-adapted Influenza A reassorted derived from the A/Leningrad/134/17/57 donor strain, Vaccine (2002) 20: 2082 - 2090. El reagrupamiento de las cepas de la gripe ce también se conoce como constructos de plásmidos. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 03/091401, mencionadas anteriormente.

El reagrupamiento, en resumen, comprende generalmente la mezcla (por ejemplo, en huevos o en cultivo celular) de segmentos de genes de diferentes virus. Por ejemplo, los típicos 8 segmentos de cepas del virus de la gripe B pueden mezclarse entre, por ejemplo, una cepa natural con un epítipo de interés y una cepa "donante", por ejemplo, que comprende una cepa adaptada al frío. El reagrupamiento entre dos tipos de virus puede producir, entre otros, virus que comprenden la cepa con el epítipo natural para un segmento y la cepa adaptada al frío para los otros segmentos. Desafortunadamente, para crear los reagrupados deseados, a veces es necesario realizar un gran número de reagrupamientos. Después de ser reagrupados, los virus también pueden ser seleccionados (por ejemplo, para encontrar los reagrupados deseados). Después pueden formarse los reagrupados deseados (por ejemplo, expandirse en número).

La tradicional optimización, selección y clonación de los reagrupados deseados para el virus de la gripe B se producen normalmente mediante la infección conjunta de cepas del virus en un cultivo celular (por ejemplo, de células CEK), seguida de la selección con los anticuerpos apropiados, por ejemplo, contra el material de uno de los virus parentales (habitualmente realizado en huevos), y la clonación o la expansión del virus, etc., que normalmente se realiza en un cultivo celular. Sin embargo, dicho reagrupamiento tradicional presenta inconvenientes ya que son necesarios miles de reagrupamientos para crear el segmento mixto deseado. Cuando se realizan dichos reagrupamientos, puede apreciarse que el resultado final no es un verdadero reagrupamiento aleatorio. En otras palabras, existen presiones que sesgan el proceso en los sistemas. Para las cepas de la gripe A, sin embargo, dichos procesos no parecen tener dicho sesgo. Para las cepas A, la infección conjunta de las cepas (normalmente en cultivos celulares tales como de células CEK) está seguida por la selección y la clonación al mismo tiempo, de nuevo, normalmente en un cultivo celular.

Optimización del reagrupamiento

Varias formas de realización que utilizan las etapas del Grupo 1 pueden optimizar el proceso de reagrupamiento con objeto de reducir el número de reagrupamientos necesarios (y aumentar así el rendimiento / estabilidad del proceso de producción de la vacuna), etc. Las etapas que utilizan dichas técnicas de optimización normalmente se materializan con el reagrupamiento de cepas de la gripe B y normalmente se realizan en un cultivo celular, por ejemplo, de células CEK. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 05/014862.

Otros métodos de reagrupamiento del virus de la gripe pueden mezclar opcionalmente diluciones de un virus maestro donante (MDV) y un virus natural, por ejemplo, a una dilución de 1:5 de cada uno independientemente de la

concentración de las respectivas soluciones, que después son incubadas durante entre 24 y 48 horas a 25 °C y a 33 °C. Aunque dicha metodología a menudo es aceptable para las cepas de la gripe A, las cepas de la gripe B no dan normalmente unos resultados positivos con dicho protocolo. Por ejemplo, para conseguir el apropiado reagrupamiento 6:2 (es decir, 6 genes del MDV y 2 genes, NA y HA, del virus natural) a menudo deben realizarse miles de reagrupamientos.

Selección y clonación de los reagrupados

Las etapas del Grupo 1 también comprenden la selección de virus de la gripe reagrupados. Las cepas reagrupadas de la gripe A son susceptibles de selección tanto en cultivo celular (por ejemplo, en células CEK) como en huevos. Sin embargo, las cepas reagrupadas de la gripe B presentan problemas cuando son reagrupadas en cultivo celular (por ejemplo, cuando son seleccionadas en células CEK). Se cree que las células CEK interfieren con el gen M de las cepas de la gripe B, reduciendo por tanto la producción global. Varios métodos de producción de composiciones de vacuna, véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 05/014862, utilizan diferentes etapas para el reagrupamiento de los virus, por ejemplo, selección, etc. Dichas diversas etapas pueden usarse opcionalmente para crear virus para las composiciones de vacuna, etc., de este documento.

Caracterización de los reagrupados

Otros métodos más de producción de virus / vacunas utilizan aplicaciones de un ensayo de alto rendimiento de polimorfismo de la conformación de la hebra individual / electroforesis capilar (SS-CP/CE) para la determinación de la constelación génica de los virus de la gripe usados en este documento. Los virus de la gripe contienen 8 segmentos de genes, y como se ha descrito anteriormente, la infección conjunta de una única célula con dos cepas diferentes de la gripe puede producir virus reagrupados con unas nuevas constelaciones químicas distintas a las de cualquiera de los virus parentales. Por lo tanto, algunos métodos pueden usar un ensayo de SSCP/CE para determinar rápidamente la constelación de segmentos génicos de un gran número de muestras de virus de la gripe. Los segmentos génicos de los virus de la gripe se amplificaron opcionalmente mediante una RT-PCR mediante el uso de cebadores con marcaje fluorescente específicos para cada uno de los 8 segmentos. Véase también, Arvin et al. (2000) J. Clin. Micro. 38 (2): 839 - 845.

Prevención de la contaminación bacteriana

Algunos métodos de producción de virus / vacunas pueden comprender etapas para detectar y/o prevenir / detectar la contaminación microbiana de los huevos o de otros cultivos de células hospedadoras en los que se produce el virus de la gripe. Las estrategias de detección microbiana de la invención son útiles para una detección microbiana rápida / de alto rendimiento, y por lo tanto, al igual que con otras muchas etapas, son útiles para aumentar el rendimiento y aumentar la producción en la producción de virus / vacunas.

Muchas estrategias de producción actuales de la vacuna de la gripe, que pueden usarse opcionalmente con la invención de este documento, usan como componente el método tradicional para la expansión del virus de la gripe en huevos de pollo fértiles exentos de patógenos específicos. La posible contaminación microbiana puede producirse en diversos puntos durante la producción de los virus en los huevos. Desafortunadamente, los huevos de pollo pueden tener algunos microorganismos fuera de sus cáscaras como parte de su flora natural. También es posible tener microorganismos encerrados por la cáscara de huevo durante el desarrollo del embrión de pollo. Los huevos de pollo fertilizados se incuban a 37 °C con una humedad elevada para el desarrollo del embrión, lo que también constituye las condiciones de incubación primarias de cualquier tipo de contaminante microbiano. Otro posible momento de contaminación microbiana se produce cuando se punciona la cáscara para inocular el huevo. Aunque antes de la inoculación del virus los huevos se pulverizan a menudo con alcohol, todavía hay probabilidades de que entren microorganismos en el huevo.

Después de la expansión de los virus durante entre 2 y 3 días en los huevos, normalmente se extrae la parte superior de la cáscara del huevo para una recolección manual del líquido alantoideo, que contiene los virus, del interior del huevo. Véase, anteriormente. Esta recolección es otro punto en el que puede producirse una contaminación microbiana. Desafortunadamente, los huevos con dicha biocarga contaminante pueden escapar a la detección, necesitando su agrupamiento en múltiples frascos para minimizar el rechazo del lote completo debido a un fallo en el ensayo de MPA. Dado que normalmente se usan tres cepas de la gripe en la producción de una vacuna, se necesita la mezcla de las tres cepas para la masa final. El ensayo de MPA durante el proceso (ensayo de pureza microbiológica) se realiza, por ejemplo, al recoger el virus antes de usarlo en la mezcla y del llenado, para asegurar un producto exento de microbios.

Después de la incubación, se usa el método "tradicional" de observación con un ovoscopio para identificar los huevos infértiles y muertos que posiblemente hayan muerto debido a causas naturales o a una contaminación microbiana (es decir, la muerte de los huevos puede producirse debido a la infectividad del virus y/o a la expansión de microorganismos, requiriendo ambas la detección y la eliminación de dichos huevos). La observación con un ovoscopio comprende, por ejemplo, el proceso de sostener un huevo frente a una fuente lumínica en una habitación

oscurecida para permitir la visualización del embrión en desarrollo. Los nuevos muertos son excluidos de la inoculación con virus.

Adicionalmente, la contaminación microbiana puede producirse en diversos puntos de la producción del virus en un cultivo celular, por ejemplo, si la célula hospedadora de partida puede ser infectada por un microbio antes del cultivo inicial de las células hospedadoras. La preparación de un banco de células maestras (MCB) es esencial para su uso en la producción de virus para material de una vacuna. El MCB se ensaya intensamente para asegurar que no hay evidencias de agentes microbianos, opcionalmente puede ensayarse el MCB con pruebas de tumorigenicidad y/o de oncogenicidad. Alternativamente pueden introducirse microorganismos durante cualquier etapa que requiera la apertura del recipiente de crecimiento (por ejemplo, un fermentador) usado para el cultivo de las células hospedadoras. Las etapas que pueden requerir la apertura del recipiente de crecimiento incluyen, por ejemplo, durante cualquier adición de proteasa o de otro complemento al cultivo, y durante la infección vírica de las células hospedadoras. El uso de un medio y de unas instalaciones estériles, combinado con el desarrollo de procedimientos diseñados para minimizar la apertura del recipiente de crecimiento, es esencial para minimizar el riesgo de contaminación.

Como puede observarse a partir de los puntos anteriores, la detección de una contaminación microbiana puede ser necesaria en múltiples etapas durante la elaboración de la vacuna de la gripe. Hay una necesidad de eliminar o de reducir los microbios aviares y medioambientales, hay una necesidad de eliminar o de reducir la introducción de microbios medioambientales y humanos. Los métodos actuales de detección de microorganismos contaminantes incluyen, por ejemplo, métodos farmacopeicos (MPA y Biocarga). Los métodos actuales pueden incluir, por ejemplo, la observación con un ovoscopio del huevo durante la inoculación previa y posterior del huevo (lo que normalmente se realiza manualmente a una velocidad de aproximadamente 500 huevos/hora/persona); los ensayos de MPA y de Biocarga que son normalmente manuales y tardan aproximadamente 14 días para el MPA y aproximadamente 3 días para la Biocarga (que se realizan durante la preparación de un MCB y la recogida del virus); un ensayo de mycoplasma; que normalmente se realiza manualmente y tarda aproximadamente 28 días (realizado durante la recogida del virus); y un ensayo de mycobacterium, que normalmente es manual y tarda aproximadamente 56 días (realizado durante la recogida del virus). De nuevo, véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 05/014862, para las descripciones de diversas técnicas susceptibles de ser usadas con la actual invención.

GRUPO 2

Algunos aspectos de la producción de virus / vacunas que entran en el Grupo 2 incluyen la purificación adicional y la expansión del virus, etc. Después del proceso de un correcto reagrupamiento y de la clonación de los reagrupados (por ejemplo, los virus 6:2), dichas partículas víricas reagrupadas se purifican adicionalmente en huevos de gallina embrionados, y los clones correctos se expanden en cantidad (de nuevo a través del crecimiento en huevos de gallina) para generar una cepa maestra de virus (MVS) o una siembra maestra de virus, que a su vez, es adicionalmente expandida para generar una cepa maestra de virus de trabajo (MWVS) o siembra de virus de trabajo del fabricante. Muchos aspectos de la purificación de las partículas víricas a partir de huevos y el uso de dichos virus purificados para inocular más huevos con objeto de expandir la cantidad de partículas víricas, son bien conocidos por los expertos en la materia. Muchas de dichas técnicas son habituales en la actual producción de partículas víricas y se han venido usando durante al menos 40 años. Véase, por ejemplo, Reimer, et al., Influenza virus purification with the zonal ultracentrifuge, Science 1966, 152: 1379 - 81. Los protocolos de purificación pueden implicar, por ejemplo, una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (por ejemplo, en sacarosa al 10 - 40 %), etc. También, como se indica en este documento, otros procedimientos, etc., indicados en otros Grupos, también están opcionalmente presentes en el Grupo 2, por ejemplo, la prevención de la contaminación microbiana, etc.

GRUPO 3

Algunos aspectos de la producción de virus / vacunas que entran en el encabezamiento del Grupo 3 incluyen, por ejemplo, el acondicionamiento de los huevos embrionados o de otras células hospedadoras (por ejemplo, las condiciones específicas de manipulación y medioambientales implicadas en la incubación de los huevos o de otras células hospedadoras infectadas por virus), y la recogida y la clarificación del virus de la gripe a partir del líquido alantoideo de los huevos o del sobrenadante del cultivo de las células hospedadoras.

Por ejemplo, el acondicionamiento, el lavado, la observación con un ovoscopio y la incubación de los huevos que contienen el virus reagrupado que se va a usar en una vacuna; la inoculación, el precintado, etc. de dichos huevos; la observación con un ovoscopio de dichos huevos; la recogida de la solución de virus (por ejemplo, del líquido alantoideo) a partir de los huevos; el cultivo y la inoculación de las células hospedadoras; la recogida de la solución de virus (por ejemplo, del sobrenadante de cultivo celular) a partir de las células hospedadoras; y la clarificación de la solución de virus, pueden entrar todos en dicha categoría. De nuevo, debería apreciarse que diversas técnicas aplicables en las etapas de los Grupos 2 son igualmente aplicables en las etapas del Grupo 3 (por ejemplo, la observación con un ovoscopio, etc.). Varios aspectos de la producción de virus / vacunas que comprenden los Grupos 3 son bien conocidos por los expertos en la materia. Diversos aspectos de la observación con un ovoscopio de los huevos en la producción de virus, así como la inoculación de los huevos con virus y el lavado, la incubación, etc. de dichos huevos, son técnicas bien conocidas en la producción de virus / vacunas en huevos. Por supuesto, se

apreciará que dichas técnicas bien conocidas se usan junto con los aspectos únicos e innovadores de la actual invención. De nuevo, la Publicación PCT WO 05/014862, proporciona etapas adicionales tales como el balanceo, etc. que también pueden usarse con los métodos y las composiciones de la actual invención. Otras etapas similares pueden incluir la filtración y el calentamiento específicos de las composiciones, de nuevo, véase la Publicación PCT WO 05/014862.

Filtración y calentamiento

De nuevo, la Publicación PCT WO 05/014862 también proporciona otras etapas de filtración y calentamiento que opcionalmente pueden usarse con los métodos y las composiciones de la actual invención. Según se describe, el proceso de elaboración de FluMist™ puede usar huevos de pollo embrionados para generar siembras maestras de virus (MVS), siembras de virus de trabajo del fabricante (MWVS) y cosechas de virus (VH). Las siembras y las cosechas de virus pueden contener biocarga (normalmente contaminación bacteriana), que provocaría el rechazo de los lotes de producto de virus de siembra o a granel en el proceso de producción de la vacuna. Por supuesto, se apreciará que la enumeración con la descripción específica de los tipos de producto en particular usados, los tamaños, etc., no debe considerarse como limitante de la actual invención salvo que específicamente se establezca así.

GRUPO 4

El Grupo 4 de los aspectos de la producción de una vacuna comprende, por ejemplo, las etapas relacionadas principalmente con la estabilización (por ejemplo, a través de la adición de componentes, de alteraciones en las proporciones de tampón / NAF, etc.) y los ensayos de potencia / esterilidad de las soluciones que contienen los virus. En algunas formas de realización, las soluciones / vacunas víricas finales de la invención pueden comprender virus vivos que son estables en forma líquida durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su almacenamiento "en circulación" (por ejemplo, en la venta y la comercialización cuando están refrigerados a 2 - 8 °C, 4 °C, 5 °C, etc.) durante una temporada de vacunación contra la gripe (por ejemplo, normalmente desde aproximadamente septiembre hasta marzo en el hemisferio norte). Por lo tanto, se desea que las composiciones de virus / vacunas conserven su potencia, o que pierdan su potencia a una velocidad aceptable durante el periodo de almacenamiento. En otras formas de realización, dichas soluciones / vacunas son estables en forma líquida a desde aproximadamente 2 °C hasta aproximadamente 8 °C, por ejemplo, a la temperatura de una nevera. Por lo tanto, el virus / vacuna producido a través de la actual invención y los métodos de la actual invención pueden ser producidos por, y/o usados con, dichos procedimientos, etc. De nuevo, véase la Publicación PCT WO 05/014862.

Concentración / diafiltración de cosechas de virus

En algunos métodos de producción de la composición de vacuna, las cosechas de virus se concentran opcionalmente mediante el uso de una columna apropiada. Véase la Publicación PCT WO 05/014862.

Estabilizantes / tampones

La producción de la composición de vacuna también puede incluir opcionalmente varias diluciones de NAF (normalmente NAF no fraccionado) que comprenden el virus de interés y combinaciones, por ejemplo, de sacarosa, arginina, gelatina, EDTA, etc. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 05/014862, para ejemplos de las diversas combinaciones posibles en las diferentes formulaciones de vacuna. Dichos métodos y composiciones son, en ciertas formas de realización, estables (es decir, no muestran pérdidas de potencia inaceptables) durante los periodos de tiempo seleccionados (normalmente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 15 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, etc.) a las temperaturas deseadas (por ejemplo, normalmente a 4 °C, a 5 °C, 8 °C, desde aproximadamente 2 °C hasta aproximadamente 8 °C o a más de 2 °C, etc.).

En algunas formulaciones, las composiciones pueden comprender un estabilizante de, por ejemplo, arginina (a un pH de desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,2), tanto en combinación con, como en lugar de, gelatina o productos relacionados y/o derivados de la gelatina (por ejemplo, hidrosilado de gelatina). De nuevo, véase la Publicación PCT WO 05/014862. También, en muchas soluciones de virus / soluciones de vacunas se utiliza opcionalmente una solución base de SPG (sacarosa, fosfato de potasio y glutamato monosódico).

De nuevo, la Publicación PCT WO 05/014862 proporciona otros métodos adicionales de estabilización de una composición de virus / vacuna, por ejemplo, la manipulación del nivel de NAF, etc.

DEFINICIONES

Salvo que se definan de otro modo, se entiende que todos los términos científicos y técnicos tienen el mismo significado al usado habitualmente en la materia a la que pertenecen. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

5 Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de ácidos nucleicos" se refieren a polímeros monocatenarios o bicatenarios de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos, o a quimeras o análogos de los mismos. Según se usa en este documento, el término incluye opcionalmente polímeros de análogos de nucleótidos naturales que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales, ya que hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de una forma similar a los nucleótidos naturales (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos). Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de un ácido nucleico en particular engloba opcionalmente secuencias complementarias, además de la secuencia indicada explícitamente.

10 El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen las secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. El término "gen" se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o a un ARNm codificado por esta secuencia genómica.

15 Los genes también incluyen segmentos de ácidos nucleicos no expresados que forman, por ejemplo, secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen "promotores" y "potenciadores," a los que se unen las proteínas reguladoras, tales como los factores de transcripción, dando como resultado la transcripción de las secuencias adyacentes o cercanas. Un promotor o un potenciador "específico tisular" es aquel que regula la transcripción en un tipo de tejido o en un tipo o tipos de células específicos.

20 El término "vector" se refiere al medio mediante el cual un ácido nucleico puede ser propagado y/o transferido entre organismos, células o componentes celulares. Algunos vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófago, provirus, fagémidos, transposones y cromosomas artificiales, y similares, que se replican de forma autónoma o que pueden integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido formado por ambos ADN y ARN en la misma hebra, un ADN o un ARN conjugado con polilisina, un ADN o un ARN conjugado con péptido, un ADN conjugado con un liposoma, o similares, que no tienen una replicación autónoma.

25 Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido, que es capaz de promover la expresión, así como la replicación, de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Normalmente, el ácido nucleico que va a ser expresado esta "unido operativamente" a un promotor y/o a un potenciador, y está sometido al control regulador de la transcripción por parte del promotor y/o del potenciador.

30 Un "vector de expresión bidireccional" está caracterizado por dos promotores alternativos orientados en direcciones opuestas con respecto a un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de forma que la expresión pueda ser iniciada en ambas orientaciones, dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de ambos ARN, de hebra positiva (+) o sentido, y de hebra negativa (-) o antisentido.

35 En el contexto de este documento, el término "aislado" se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente exento de los componentes que normalmente acompañan o interactúan con él en su entorno natural. El material aislado comprende opcionalmente un material que no se encuentra con el material en su entorno natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material está en su entorno natural, tal como una célula, el material ha sido sustituido en una ubicación de la célula (por ejemplo, el genoma o un elemento genético) no natural por un material que se encuentra en ese entorno. Por ejemplo, un ácido nucleico natural (por ejemplo, una secuencia codificante, un promotor, un potenciador, etc.) se vuelve aislado si es introducido mediante un medio natural en un locus del genoma (por ejemplo, un vector, tal como un plásmido o un vector vírico, o un amplicón) no natural para ese ácido nucleico. Dichos ácidos nucleicos también se denominan ácidos nucleicos "heterólogos".

40 El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína) ha sido alterado artificialmente o sintéticamente (de forma no natural). La alteración puede realizarse sobre el material dentro o fuera de su entorno o estado natural. Específicamente, cuando se refiere a un virus, por ejemplo, un virus de la gripe, es recombinante cuando es producido mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

45 El término "reagrupado," cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o polipéptidos derivados de más de una cepa o fuente vírica parental. Por ejemplo, un reagrupado 7:1 incluye 7 segmentos genómicos víricos (o segmentos génicos) derivados de un primer virus parental, y un único segmento genómico vírico complementario, por ejemplo, que codifica para hemaglutinina o neuraminidasa, de un segundo virus parental. Un reagrupado 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, lo más habitualmente los 6 genes internos de un primer virus parental, y dos segmentos complementarios, por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa, de un virus parental diferente.

50 El término "introducido", cuando se refiere a un ácido nucleico heterólogo o aislado, se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota en la que el ácido nucleico puede ser incorporado en el genoma de la célula (por ejemplo, un cromosoma, un plásmido, un plástido o un ADN mitocondrial), convertido en una replicón autónomo o expresado temporalmente (por ejemplo, un ARNm transfectado). El término incluye métodos tales como "infección", "transfección", "transformación" y "transducción." En el contexto de la invención, puede

emplearse una diversidad de métodos para la introducción de ácidos nucleicos en células procariotas, incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

El término "célula hospedadora" significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y da apoyo a la replicación y/o a la expresión del ácido nucleico. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, de insecto, de anfibio, de ave, o de mamífero, incluyendo células de un ser humano. Algunos ejemplos de células hospedadoras en el contexto de la invención incluyen células Vero (renales de mono verde africano), células BHK (renales de cachorro de hámster), células renales primarias de pollo (PCK), células renales caninas de Madin-Darby (MDCK), células renales bovinas de Madin-Darby (MDBK), células 293 (por ejemplo, células 293T) y células COS (por ejemplo, células COS1, COS7).

Virus de la gripe

Las composiciones y los métodos de este documento se refieren principalmente a la producción de virus de la gripe para vacunas. Los virus de la gripe están formados por un núcleo interno de una ribonucleoproteína que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado, y una cubierta lipoproteica externa revestida por una proteína de matriz. El virus de la gripe A y de la gripe B contienen cada uno ocho segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo. El genoma de la gripe A codifica para once polipéptidos. Los segmentos 1 - 3 codifican para tres polipéptidos, formando una polimerasa de ARN dependiente de ARN. El segmento 1 codifica para la proteína del complejo de la polimerasa PB2. El resto de las proteínas de la polimerasa PB1 y PA están codificadas por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de la gripe codifica para una pequeña proteína, la PB1-F2, producida a partir de un marco de lectura alternativo dentro de la región codificante PB1. El segmento 4 codifica para la glucoproteína superficial de la hemaglutinina (HA) implicada en la adhesión celular y la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica para el polipéptido de la nucleoproteína de la nucleocápside (NP), el principal componente estructural asociado con el ARN vírico. El segmento 6 codifica para una glucoproteína de neuraminidasa de la cubierta (NA). El segmento 7 codifica para dos proteínas de la matriz, denominadas M1 y M2, que son traducidas a partir de ARNm empalmados de una forma diferencial. El segmento 8 codifica para NS1 y NS2, dos proteínas no estructurales que son traducidas a partir de variantes de ARN empalmados de una forma alternativa.

Los ocho segmentos genómicos de la gripe B codifican para 11 proteínas. Los tres genes más grandes codifican para los componentes de la polimerasa de ARN, PB1, PB2 y PA. El segmento 4 codifica para la proteína de HA. El segmento 5 codifica para la NP. El segmento 6 codifica para la proteína NA y la proteína NB. Ambas proteínas, la NB y la NA, son traducidas a partir de marcos de lectura solapantes de un ARNm bicistrónico. El segmento 7 de la gripe B también codifica para dos proteínas: M1 y M2. El segmento más pequeño codifica para dos productos, NS1, que es traducido a partir del ARN completo, y NS2, que es traducido a partir de una variante de empalme del ARNm.

Vacuna contra el virus de la gripe

Históricamente, las vacunas contra el virus de la gripe se han producido principalmente en huevos de gallina embrionados mediante el uso de cepas de virus seleccionadas basándose en las predicciones empíricas de las cepas pertinentes. Más recientemente se han producido virus reagrupados que incorporan antígenos seleccionados para hemaglutinina y neuraminidasa en el contexto de una cepa maestra sensible a la temperatura atenuada aprobada. Después del cultivo del virus a través de múltiples pases en huevos de gallina, los virus de la gripe son recuperados y opcionalmente inactivados, por ejemplo, mediante el uso de formaldehído y/o β -propiolactona (o como alternativa, usados en vacunas de virus vivos atenuados).

Sin embargo, la producción de una vacuna contra la gripe de esta forma tiene varias consideraciones significativas. Por ejemplo, los contaminantes remanentes de los huevos de gallina pueden ser muy antigénicos y/o pirógenos, y frecuentemente dar como resultado unos efectos secundarios significativos tras su administración. Por lo tanto, otro método implica la sustitución de algún porcentaje de los componentes del huevo con medio exento de animal. Aun más importante es que las cepas de los virus diseñadas para la producción de vacunas deben ser seleccionadas y distribuidas normalmente con unos meses de antelación sobre la siguiente época de gripe, para dejar tiempo para la producción y la inactivación de la vacuna contra la gripe. De nuevo, cualquier mejora en la estabilidad durante el tiempo de almacenamiento y/o del almacenamiento a una temperatura más conveniente (por ejemplo, a la temperatura de una nevera, de aproximadamente 2 - 8 °C), por ejemplo, con objeto de disminuir la pérdida de producto, es por tanto bastante deseable.

Los intentos de producir vacunas recombinantes y reagrupadas en cultivos celulares se han visto obstaculizados por la incapacidad de algunas cepas aprobadas para la producción de vacunas de crecer de forma eficaz en las condiciones de cultivo celular habituales. Por lo tanto, los trabajos previos del inventor y sus colaboradores proporcionaron un sistema de vector, y métodos para la producción de virus recombinantes y reagrupados en cultivo, haciendo por tanto posible producir rápidamente las vacunas correspondientes a una o a varias cepas antigénicas de virus seleccionadas. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 03/091401, mencionadas más arriba. Por supuesto, dichos reagrupamientos son opcionalmente amplificados adicionalmente en huevos de gallina. Normalmente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como una incubadora de cultivos celulares, bajo una

atmósfera controlada de humedad y CO₂, a una temperatura constante mediante el uso de un regulador de temperatura, tal como un termostato, para asegurar que la temperatura no excede los 35 °C. Dicho trabajo pionero, así como otra producción de vacuna, puede ser adicionalmente optimizado a través del uso de la actual invención en su totalidad o en parte.

Los virus de la gripe reagrupados pueden obtenerse fácilmente mediante la introducción de vectores (por ejemplo, virus, plásmidos, etc.) correspondientes a los segmentos genómicos de un virus de la gripe maestro, junto con segmentos complementarios derivados de las cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de interés). Normalmente, las cepas maestras se seleccionan sobre la base de las propiedades deseables pertinentes para la administración de la vacuna. Por ejemplo, para la producción de la vacuna, por ejemplo, para la producción de una vacuna de virus vivos atenuados, la cepa maestra del virus donante puede seleccionarse según un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura.

FluMist®

Como se ha mencionado previamente, existen numerosos ejemplos y tipos de vacunas contra la gripe. Un ejemplo de vacuna contra la gripe es FluMist, que es una vacuna de virus vivos atenuados que protege a niños y a adultos de la enfermedad de la gripe (Belshe et al. (1998), The efficacy of live attenuated, cold adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N. Engl. J. Med. 338: 1405 - 12; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282: 137 - 44). En las formas de realización típicas, los métodos y las composiciones de la actual invención están opcionalmente adaptados para, o se usan en, la producción de la vacuna FluMist. Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán que las etapas / composiciones de este documento también son adaptables a la producción de vacunas víricas similares o incluso diferentes y sus composiciones.

Las vacunas contra la gripe FluMist™ contienen, por ejemplo, segmentos de los genes HA y NA derivados de las cepas naturales a las que está dirigida la vacuna, junto con seis segmentos de genes, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, procedentes de un virus donante maestro común (MDV). El MDV para las cepas de la gripe A de FluMist (MDV-A), fue creado mediante pases sucesivos de la cepa natural A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) en un cultivo tisular renal primario de pollo a unas temperaturas sucesivamente menores (Maassab (1967), Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C, Nature 213: 612 - 4). El MDV-A se replica eficientemente a 25 °C (*ca*, adaptado al frío), pero su crecimiento está restringido a entre 38 y a 39 °C (*ts*, sensible a la temperatura). Adicionalmente, este virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (*att*, atenuación). Se cree que el fenotipo *ts* contribuye a la atenuación de la vacuna en seres humanos restringiendo su replicación en todas las regiones excepto las más frías del tracto respiratorio. La estabilidad de esta propiedad ha sido demostrada en modelos animales y en estudios clínicos. Al contrario que el fenotipo *ts* de las cepas de la gripe creadas mediante mutagénesis química, la propiedad *ts* del MDV-A no se revierte después de pases a través de hámsteres infectados o en cepas clínicas eliminadas de niños (para una revisión reciente, véase Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines, Viral Immunol. 15: 295 - 323).

Los estudios clínicos en más de 20.000 adultos y niños que implicaban 12 cepas reagrupadas 6:2 por separado han demostrado que estas vacunas son atenuadas, seguras y eficaces (Belshe et al. (1998), The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N. Engl. J. Med. 338: 1405 - 12; Boyce et al. (2000), Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults Vaccine 19: 217 - 26; Edwards et al. (1994) A randomized controller trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease J. Infect. Dis. 169: 68 - 76; Nichol et al. (1999), Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282: 137 - 44). Los reagrupados portadores de los seis genes internos del MDV-A y los dos segmentos de los genes HA y NA de un virus natural (es decir, un reagrupado 6:2) mantienen coherentemente los fenotipos *ca*, *ts* y *att* (Maassab et al. (1982) Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets J. Infect. Dis. 146: 780 - 900). La producción de dichos virus reagrupados mediante el uso de cepas de la gripe B cepas es, sin embargo, más difícil.

Un trabajo reciente, véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 03/091401, mencionadas más arriba, ha mostrado un octavo sistema de plásmido para la generación de un virus de la gripe B totalmente a partir de un ADNc clonado, y métodos para la producción de virus atenuados vivos de la gripe A y B adecuados para formulaciones de vacuna, tales como formulaciones de vacuna de virus vivos útiles para su administración intranasal. La actual invención también presenta métodos mejorados para la producción de la cepa B.

El sistema y los métodos descritos previamente son útiles para la rápida producción de virus de la gripe A y B recombinantes y reagrupados, incluyendo virus adecuados para su uso como vacunas, incluyendo vacunas de virus vivos atenuados, tales como vacunas adecuadas para su administración intranasal, tales como FluMist®. Los métodos de la actual invención de este documento se usan opcionalmente junto con dicho trabajo previo que implica, por ejemplo, virus de la gripe reagrupados para la producción de vacunas para producir virus para las vacunas de una forma más estable, coherente y productiva.

Replicación vírica en cultivo celular

Como se ha establecido previamente, el virus de la gripe puede cultivarse opcionalmente en un cultivo celular. Normalmente, la propagación del virus se realiza en las composiciones del medio en el que habitualmente se cultiva la célula hospedadora. Algunas células hospedadoras adecuadas para la replicación del virus de la gripe incluyen, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7. Habitualmente se emplean cultivos conjuntos que incluyen dos de las anteriores líneas celulares, por ejemplo, se emplean células MDCK y células 293T o COS en una proporción de, por ejemplo, 1:1, para mejorar la eficacia de replicación. Normalmente, las células se cultivan en un medio de cultivo comercial habitual, tal como medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero (por ejemplo, suero bovino fetal al 0,5 - 10 %), o en medio exento de suero (por ejemplo, medio de Iscove, medio ultra CHO (BioWhittaker), EX-CELL (JRH Biosciences)), o medio exento de proteínas animales (por ejemplo, PF-CHO (JRH Biosciences), en una atmósfera de humedad controlada y a una concentración de CO₂ adecuada para el mantenimiento de un pH neutro tamponado (por ejemplo, a un pH de entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomina, etc., y/o nutrientes adicionales tales como L-glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, complementos adicionales para promover unas características de crecimiento favorables, por ejemplo, tripsina, β-mercaptoetanol, y similares.

Los procedimientos para el mantenimiento de las células de mamífero en cultivo han sido ampliamente divulgados y son conocidos por los expertos en la materia. Algunos protocolos generales se proporcionan, por ejemplo, en Freshney (1983), *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Nueva York; Paul (1975), *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edimburgo; Adams (1980), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work y Burdon (eds.) Elsevier, Ámsterdam. Algunos detalles adicionales relativos a los procedimientos de cultivo tisular de particular interés en la producción del virus de la gripe *in vitro* incluyen, por ejemplo, Merten et al. (1996), *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*, en Cohen y Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. Adicionalmente, las variaciones de dichos procedimientos adaptadas a la presente invención se determinan fácilmente mediante una experimentación rutinaria y serán familiares para los expertos en la materia.

Las células para la producción del virus de la gripe pueden cultivarse en un medio que contenga suero o en un medio exento de suero o en un medio exento de proteínas animales. En algunos casos, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, normalmente es deseable cultivar las células hospedadoras en unas condiciones exentas de suero o exentas de proteínas animales. Las células pueden cultivarse como células adherentes sobre un sustrato (por ejemplo, un microportador) o en forma de una suspensión celular sin estar adheridas a ningún sustrato. Las células pueden cultivarse a pequeña escala, por ejemplo, en menos de 25 ml de medio, en tubos o en matraces de cultivo o en grandes matraces con agitación, en frascos rotatorios o en microesferas microportadoras (por ejemplo, microesferas microportadoras de DEAE-Dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; microesferas de copolímero de estireno-trimetilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor) en matraces, frascos o reactores de cultivo. Las microesferas microportadoras son pequeñas esferas (en el intervalo de 100 - 200 micrómetros de diámetro) que proporcionan una gran área superficial para el crecimiento de células adherentes por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un único litro de medio puede incluir más de 20 millones de microesferas microportadoras que proporcionan más de 8.000 centímetros cuadrado de superficie de crecimiento. Para la producción comercial de virus, por ejemplo, para la producción de vacunas, a menudo es deseable cultivar las células en un biorreactor o fermentador. Los biorreactores están disponibles en unos volúmenes desde menos de 1 litro hasta más de 100 litros, por ejemplo, el biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); los biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, N. J.); biorreactores a escala de laboratorio y comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen de cultivo, en muchos aspectos deseados es importante que los cultivos se mantengan a una temperatura apropiada, para asegurar la replicación vírica y/o la eficiente recuperación del virus recombinante y/o reagrupado de la gripe, mediante el uso de sistemas de multiplásmido dependientes de la temperatura (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 03/091401, mencionadas anteriormente), el calentamiento de las soluciones de virus para su filtración, etc. Normalmente, se emplea un regulador, por ejemplo, un termostato u otro dispositivo, para detectar y mantener la temperatura del sistema de cultivo celular y/u otra solución, para asegurarse que la temperatura está el nivel correcto durante el periodo apropiado (por ejemplo, la replicación del virus, etc.).

En algunos métodos (por ejemplo, en los que van a producirse virus reagrupados a partir de segmentos en vectores) se introducen vectores que comprenden segmentos genómicos de la gripe (por ejemplo, transfectados) en células hospedadoras de acuerdo con los métodos bien conocidos en la materia para la introducción de ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas, incluyendo, por ejemplo, una coprecipitación en fosfato de calcio, una electroporación, una microinyección, una lipofección y una transfección, empleando reactivos de transfección de poliamina. Por ejemplo, pueden transfectarse vectores, por ejemplo, plásmidos, en células hospedadoras, tales como células COS, células 293T o combinaciones de células COS o 293T y células MDCK, mediante el uso del reactivo de transfección de poliamina TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con objeto de producir virus reagrupados, etc. Aproximadamente 1 µg de cada vector que se va a introducir en la

población de células hospedadoras con aproximadamente 2 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de medio, preferiblemente medio exento de suero, en un volumen total de 200 µl. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección se incuban a la temperatura ambiente durante 45 minutos, seguido de la adición de 800 µl de medio. La mezcla de transfección se añade a las células hospedadoras, y las células se cultivan como se ha descrito anteriormente o mediante otros métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Consecuentemente, para la producción de virus recombinantes o reagrupados en un cultivo celular, se mezclan los vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos genómicos (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 µl de TransIT-LT1 y se transfecan en células hospedadoras. Opcionalmente, el medio que contiene suero es sustituido antes de la transfección por medio exento de suero, por ejemplo, Opti-MEM I, e incubado durante 4 - 6 horas.

Alternativamente, puede emplearse una electroporación para la introducción de dichos vectores que incorporan los segmentos genómicos de la gripe en las células hospedadoras. Véase la Publicación PCT WO 05/062820. Por ejemplo, los vectores de plásmido que incorporan un virus de la gripe A o B son favorablemente introducidos en células Vero mediante el uso de una electroporación de acuerdo con el siguiente procedimiento. En resumen, se resuspenden aproximadamente 5×10^6 células Vero, por ejemplo, cultivadas en medio de Eagle modificado (MEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % en 0,4 ml de OptiMEM y se colocan en una cubeta de electroporación. Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 µl a las células de la cubeta, que a continuación se mezclan suavemente con golpecitos. La electroporación se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, BioRad Gene Pulser II con un Capacitance Extender Plus conectado) a 300 v, 950 microF con un tiempo constante de entre 28 - 33 ms. Las células se mezclan de nuevo golpeando suavemente y, aproximadamente 1 - 2 minutos después de la electroporación, se añaden directamente 0,7 ml de MEM con un 10 % de FBS a la cubeta. Después las células se transfieren a dos pocillos de una placa de cultivo tisular estándar de 6 pocillos que contiene 2 ml de MEM, un 10 % de FBS. La cubeta se lava para recuperar cualquier resto de células y la suspensión de lavado se divide entre los dos pocillos. El volumen final es de 3,5 ml. Después, las células se incuban en unas condiciones permisivas para el crecimiento vírico, por ejemplo, aproximadamente a 33 °C para las cepas adaptadas al frío.

En algunos métodos (por ejemplo, en los que se usan células hospedadoras para la producción de virus para la producción de una vacuna), las células hospedadoras se cultivan y se infectan con el virus de acuerdo con métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la infección de las células cultivadas se lleva a cabo preferiblemente cuando las células han conseguido una densidad celular óptima (por ejemplo, entre aproximadamente 5×10^5 y 20×10^6 células/ml, dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas). Las células hospedadoras se infectan a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 10 (opcionalmente, a una m.o.i. de desde aproximadamente 0,002 hasta aproximadamente 0,5). Generalmente, una replicación eficiente de virus en células animales requiere la adición de una proteasa (por ejemplo, una proteasa de serina, tal como tripsina), opcionalmente la proteasa puede añadirse al cultivo poco antes, simultáneamente o poco después de la infección. De acuerdo con la presente invención, después de la infección vírica, las células infectadas se cultivan adicionalmente para replicar los virus a unas temperaturas de menos de 33 °C, por ejemplo, a 31 °C (u opcionalmente a entre aproximadamente 29 °C y aproximadamente 32 °C), generalmente hasta que se detecta un efecto citopático máximo o una cantidad máxima de virus (por ejemplo, el ensayo de la TCID₅₀ y el ensayo de la Q RT-PCR). Opcionalmente, el cultivo de las células infectadas se realiza durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 días. Algunos métodos específicos útiles para la producción de sobrenadantes celulares que contienen virus son conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 4.500513, 6.656.720, 6.455.298 y 6.146.873). Se apreciará que opcionalmente se usan otras etapas (tanto similares como diferentes) con los métodos de la invención.

Kits

Para facilitar el uso de los métodos y las composiciones de la invención, cualquiera de los componentes y/o de las composiciones de la vacuna, por ejemplo, virus en diversas formulaciones, etc., y los componentes adicionales, tales como tampón, células, medio de cultivo, los útiles para el envasado y la infección de los virus de la gripe con fines de vacunas experimentales o terapéuticas pueden ser envasados en forma de un kit. Normalmente, el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para la realización de los métodos de la invención, material de envasado y un recipiente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar el rendimiento de partículas de virus reagrupados de la gripe B adaptados al frío, método que comprende:
- 5 (a) la introducción de una pluralidad de virus reagrupados de la gripe B adaptados al frío en huevos de gallina embrionados SPF;
- (b) la incubación de los huevos hospedadores a una temperatura de $31 \pm 0,5$ °C; y,
- 10 (c) la recuperación de las partículas de virus de la gripe a partir de los huevos hospedadores, mediante lo cual el rendimiento, cuantificado mediante la determinación de un título logarítmico medio del cultivo tisular infeccioso por mililitro de dosis (\log_{10} de la TCID₅₀/ml) del líquido alantoideo de los huevos hospedadores es de al menos 1,01 veces el rendimiento obtenible mediante el cultivo de los huevos a 33 °C.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el virus reagrupado de la gripe B adaptado al frío comprende un genoma parcial del virus de la gripe B B/USSR/60/69.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que los huevos hospedadores se incuban a 31 °C.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el virus reagrupado de la gripe B adaptado al frío es un reagrupado 6:2.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el virus reagrupado de la gripe B adaptado al frío comprende un genoma parcial del virus de la gripe B/Ann Arbor/1/66.

ES 2 536 745 T3

Cepas ca	Título (log ₁₀ de la TCID ₅₀ /ml)							
	Temperatura (± 0,5 °C)							
	28 °C	29 °C	30 °C	31 °C	32 °C	33 °C	34 °C	35 °C
B/Ann Arbor/1/66 (MDV)	NT	ND ¹	NT	7,3	NT	7,4	NT	NT
B/Victoria/504/2000	7,2	NT	NT	8,4	NT	7,7	6,7	NT
B/Johannesburg/5/99	NT	6,9	NT	8,6	NT	8,3	NT	7,3
B/Brisbane/32/2002	NT	7,3	NT	8,9	NT	8,6	NT	7,6
B/Ann Arbor/1/94	NT	8,3	NT	8,6	NT	8,4	NT	NT
B/Beijing/243/97	NT	8,9	NT	9,1	NT	8,9	NT	NT
B/Hong Kong 330/01	NT	9,0	NT	9,1	NT	8,7	NT	NT
B/Yanamashi/166/98	NT	8,6	NT	8,8	NT	8,4	NT	NT
B/Jilin/20/03 (16Apr04)	NT	7,2	NT	8,4	NT	7,7	6,7	NT
B/Jilin/20/03 (06May04)	NT	NT	8,3	8,6	8,1	8,2	NT	NT
B/Jilin/20/03 (28May04)	NT	7,7	8,3	8,4	8,2	NT	NT	NT

NT, No ensayada,¹ Título < 6,7 Log₁₀ de la TCID₅₀/ml

Fig. 1

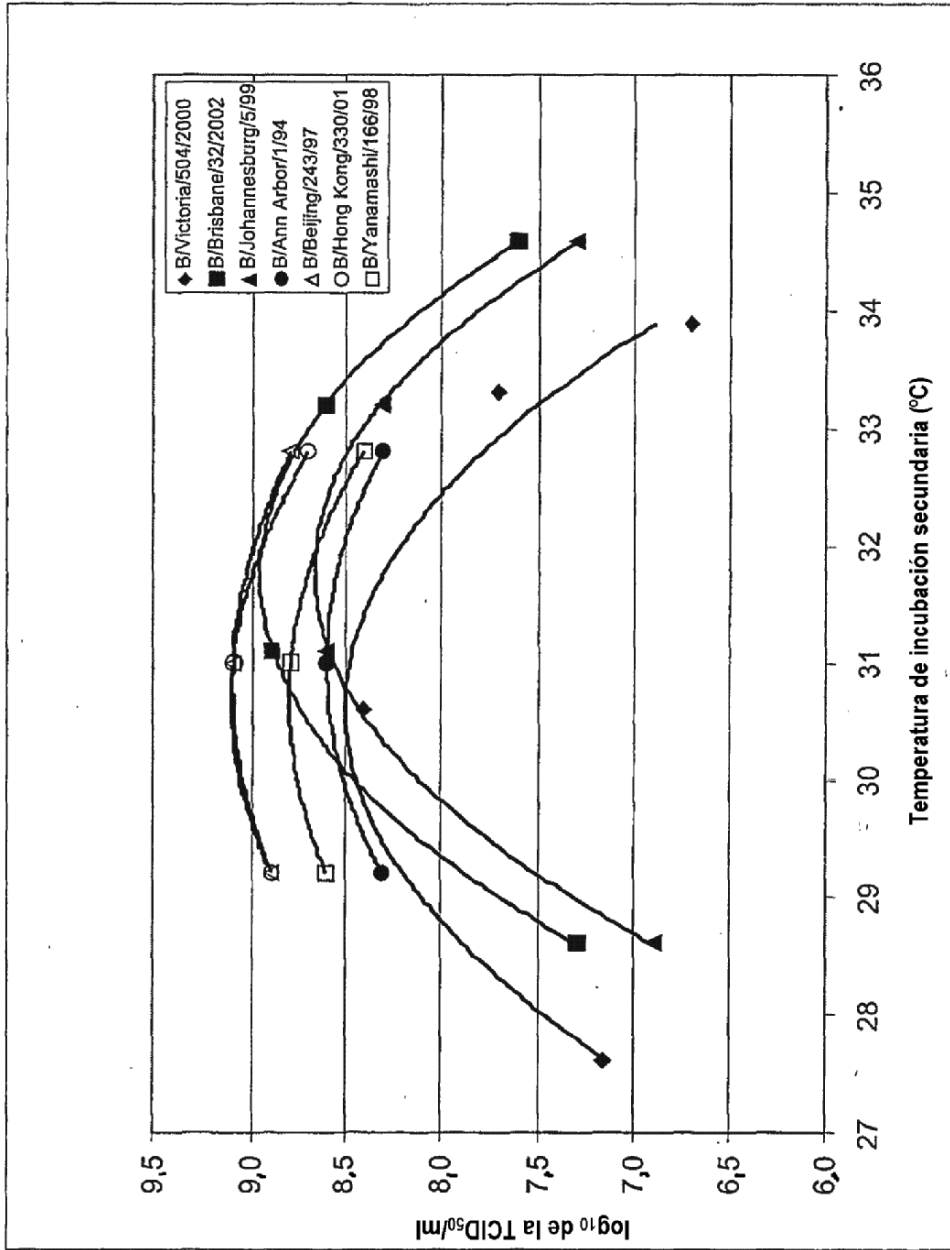


Fig. 2

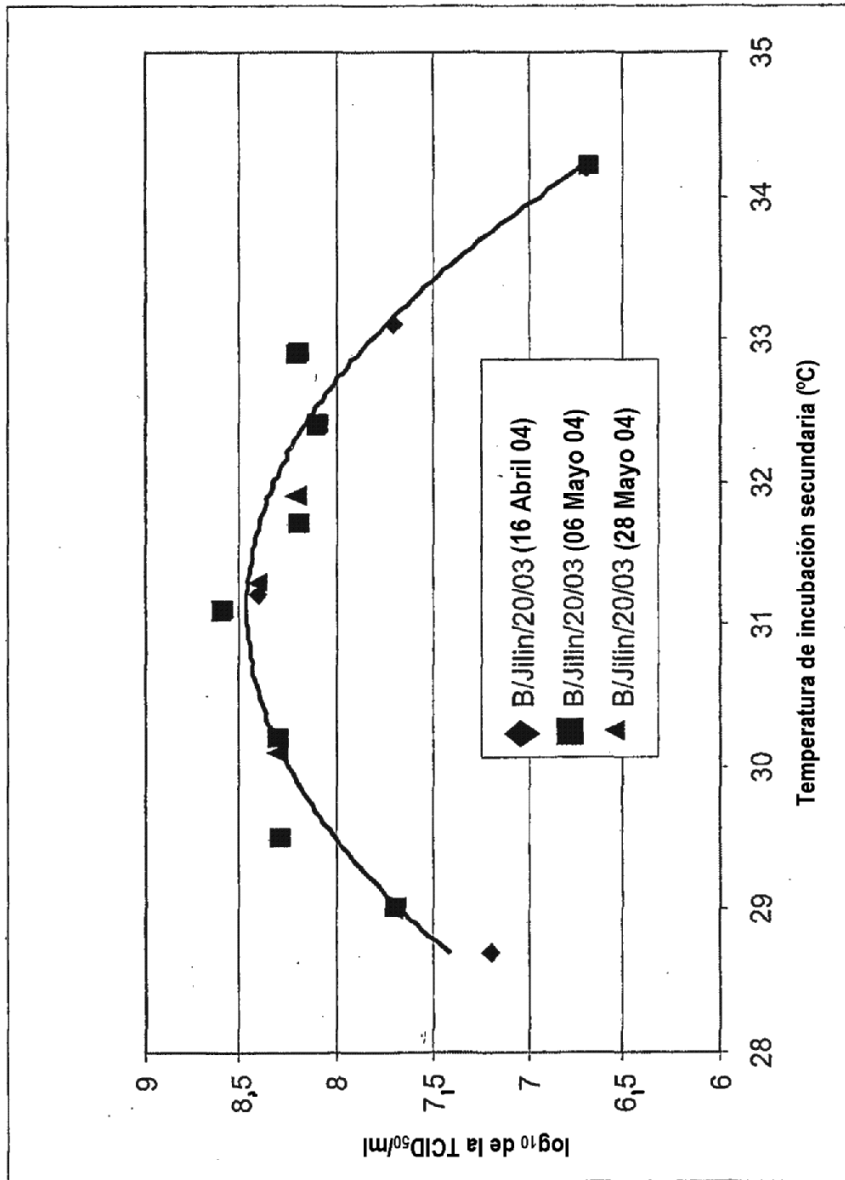


Fig. 3

ES 2 536 745 T3

Virus de vacuna	Título a 25 °C	Título a 33 °C	Título a 37 °C	Log ₁₀ diferencial 25 / 33	Log ₁₀ diferencial 37 / 33
B/Ann Arbor/01/94 ca cultivada a 29 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	7,6 ± 0,1	7,3 ± 0,1	3,7 ± 0,0	0,3	3,6
B/Ann Arbor/01/94 ca cultivada a 31 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,0	4,2 ± 0,0	0,4	3,5
B/Ann Arbor/01/94 ca cultivada a 33 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,1	4,2 ± 0,0	0,1	3,3
B/Beijing/243/97 ca cultivada a 29 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,6 ± 0,1	8,3 ± 0,1	4,2 ± 0,0	0,3	4,1
B/Beijing/243/97 ca cultivada a 31 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,8 ± 0,1	8,9 v 0,0	4,7 ± 0,0	0,1	4,2
B/Beijing/243/97 ca cultivada a 33 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,4 ± 0,0	8,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	0,2	4,0
B/HongKong/330/01 ca cultivada a 29 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,7 ± 0,0	8,4 ± 0,0	4,2 ± 0,0	0,3	4,2
B/HongKong/330/01 ca cultivada a 31 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,9 ± 0,2	8,1 ± 0,1	4,3 ± 0,1	0,8	3,8
B/HongKong/330/01 ca cultivada a 33 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,5 ± 0,1	7,8 ± 0,1	4,2 ± 0,0	0,7	3,6
B/Yamanashi/166/98 ca cultivada a 29 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,3 ± 0,1	8,3 ± 0,1	3,9 ± 0,0	0,0	4,4
B/Yamanashi/166/98 ca cultivada a 31 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1	4,5 ± 0,0	0,0	4,3
B/Yamanashi/166/98 ca cultivada a 33 °C Z0015 PD, 72 h, 11Jun04,	8,4 ± 0,2	7,9 ± 0,2	4,2 ± 0,0	0,5	3,7
B/Jilin/20/03 cultivada a 31 °C Dev, Lote: Z0015 PD 16Apr04, DQ NB773	8,1 ± 0,1	7,5 ± 0,1	4,1 ± 0,1	0,6	3,4
B/Jilin/20/03 cultivada a 31 °C 600050-A — 31 °C lote (elaboración a granel)	7,4	6,3	< 2,7	1,1	> 3,6
B/Jilin/20/03 cultivada a 33 °C Dev Lote: Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773	7,6 ± 0,2	7,2 ± 0,2	3,2 ± 0,0	0,4	4,0
B/Jilin/20/03 cultivada a 31 °C 600054-B — 31 °C lote (elaboración a granel)	7,5	6,9	< 3,7	0,6	> 3,2

Fig. 4

ES 2 536 745 T3

Cepas ca	Título de HA (HAU)							
	Temperatura (± 0,5 °C)							
	28 °C	29 °C	30 °C	31 °C	32 °C	33 °C	34 °C	35 °C
B/Ann Arbor/1/66 (MDV)	NT	< 2	NT	32	NT	16	NT	NT
B/Victoria/504/2000	0	NT	NT	256	NT	64	32	NT
B/Johannesburg/5/99	NT	0	NT	64	NT	32	NT	0
B/Brisbane/32/2002	NT	0	NT	128	NT	64	NT	0
B/Ann Arbor/1/94	NT	4	NT	32	NT	16	NT	NT
B/Beijing/243/97	NT	32	NT	64	NT	32	NT	NT
B/Hong Kong 330/01	NT	32	NT	64	NT	32	NT	NT
B/Yanamashi/166/98	NT	64	NT	128	NT	64	NT	NT
B/Jilin/20/03 (16Abgr04)	NT	0	NT	32	NT	8	NT	NT
B/Jilin/20/03 (06May04)	NT	NT	8	64	8	16	NT	NT
B/Jilin/20/03 (28May04)	NT	8	128	256	128	NT	NT	NT

NT, No ensayada

Fig. 5

ES 2 536 745 T3

Cepas ca	Número de copias del segmento génico (HA) (\log_{10}/ml)							
	Temperatura ($\pm 0,5$ °C)							
	28 °C	29 °C	30 °C	31 °C	32 °C	33 °C	34 °C	35 °C
B/Ann Arbor/1/66 (MDV)	NT	NT	NT	9,0	NT	8,7	NT	NT
B/Victoria/504/2000	8	NT	NT	10,1	NT	9,5	9,1	NT
B/Johannesburg/5/99	NT	7,7	NT	9,7	NT	9,6	NT	8,7
B/Brisbane/32/2002	NT	8,1	NT	9,8	NT	9,7	NT	8,7
B/Ann Arbor/1/94	NT	9,0	NT	9,6	NT	9,4	NT	NT
B/Beijing/243/97	NT	9,6	NT	10,0	NT	9,7	NT	NT
B/Hong Kong 330/01	NT	9,6	NT	10,0	NT	9,6	NT	NT
B/Yanamashi/166/98	NT	9,6	NT	9,8	NT	9,7	NT	NT
B/Jilin/20/03 (16Apr04)	NT	8,4	NT	9,8	NT	9,1	8,1	NT
B/Jilin/20/03 (06Mav04)	NT	NT	NT	9,8	NT	9,6	NT	NT
B/Jilin/20/03 (28May04)	NT	9,2	9,8	9,9	9,8	NT	NT	NT

NT, No ensayada

Fig. 6

ES 2 536 745 T3

Cepas ca	Número de copias del gen HA (log ₁₀):proporción de potencia (log ₁₀) (número de copias log ₁₀ /ml - log ₁₀ de la TCID ₅₀ /ml)	
	Temperatura (± 0,5 °C)	
	33 °C	31 °C
B/Ann Arbor/1/66 (MDV)	1,3	1,1
B/Victoria/504/2000	1,8	1,7
B/Johannesburg/5/99	1,3	1,1
B/Brisbane/32/2002	1,1	0,9
B/Ann Arbor/1/94	1,1	1,0
B/Beijing/243/97	0,9	0,9
B/Hong Kong 330/01	0,9	0,9
B/Yanamashi/166/98	1,3	1,0
B/Jilin/20/03 (16Apr04)	1,4	1,4
B/Jilin/20/03 (06May04)	1,4	1,2
B/Jilin/20/03 (28May04)	1,4	1,4

Fig. 7

Virus	Temperatura de crecimiento (°C)	Título (log ₁₀ de la TCID ₅₀ /ml)	Partículas totales (log ₁₀)/ml	% de partículas
B/Jilin/20/03 <i>ca</i>	31	8,4	9,9	3,3
	33	7,7	9,3	2,3
B/AnnArbor/01/94 (de tipo B/Harbin) <i>ca</i>	31	8,6	9,9	4,5
	33	8,3	9,7	4,2

Fig. 8

ES 2 536 745 T3

B/Jilin/20/03 Ca			
	Cultivo a 33 °C	Cultivo a 31 °C	
Secuencia de referencia, (MVS Lote N° 0141900073)	Lote de desarrollo Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773	Lote de desarrollo Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773	Lote de elaboración a granel N° 600054C
PB1	Idéntico	Idéntico	Idéntico
PB2	Idéntico	Idéntico	Idéntico
PA	Idéntico	Idéntico	Idéntico
HA	Idéntico	Idéntico	Idéntico
NP	Idéntico	Idéntico	Idéntico
NA	Idéntico	Idéntico	Idéntico
M	Idéntico	Idéntico	Idéntico
NS	Idéntico	Idéntico	Idéntico

Fig. 9

	log ₂ del título de HAI GMT ± DT (n = 2)
B/Jilin/20/03 ca cultivada a 31 °C Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773	7,0 ± 0,0
B/Jilin/20/03 ca cultivada a 33 °C Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773	7,0 ± 0,0

Fig. 10

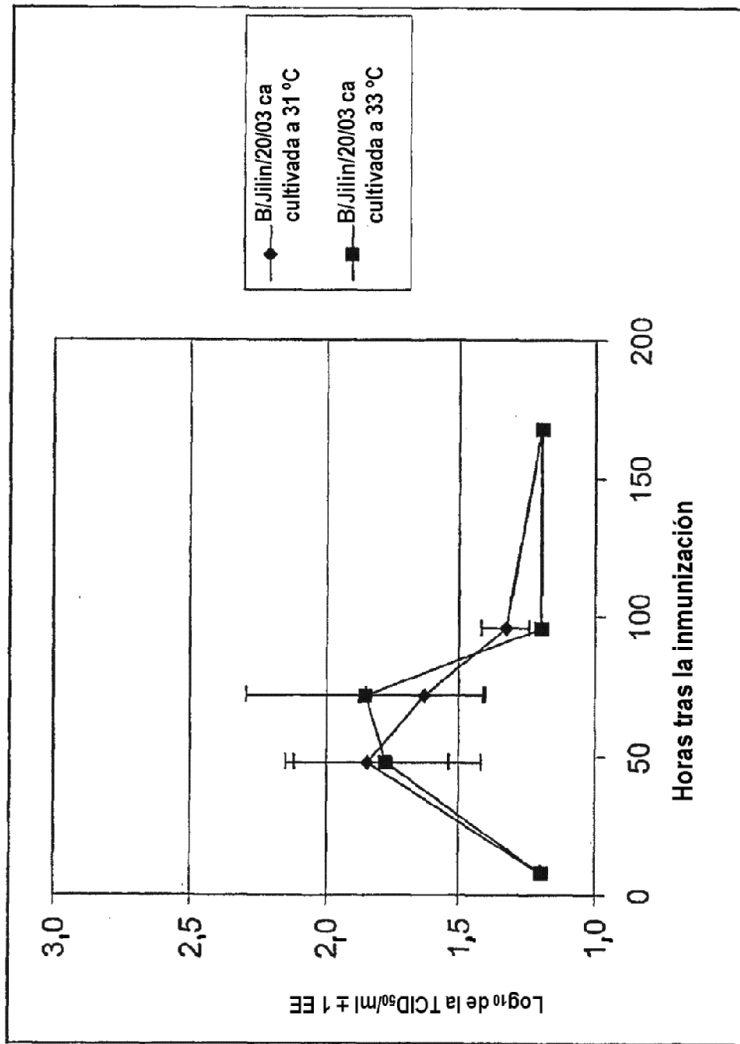


Fig. 11

ES 2 536 745 T3

Inóculo	Dosis (log ₁₀ de la TCID ₅₀)	N	log ₂ del título de HAI GMT ± DT
B/ Jilin /20/03 ca cultivada a 31 °C	7,0	5	5,2 ± 0,4
B/Jilin/20/03 ca cultivada a 33 °C Z0015 PD 16Apr04, DQ NB 773	7,0	5	5,2 ± 0,4

Fig. 12

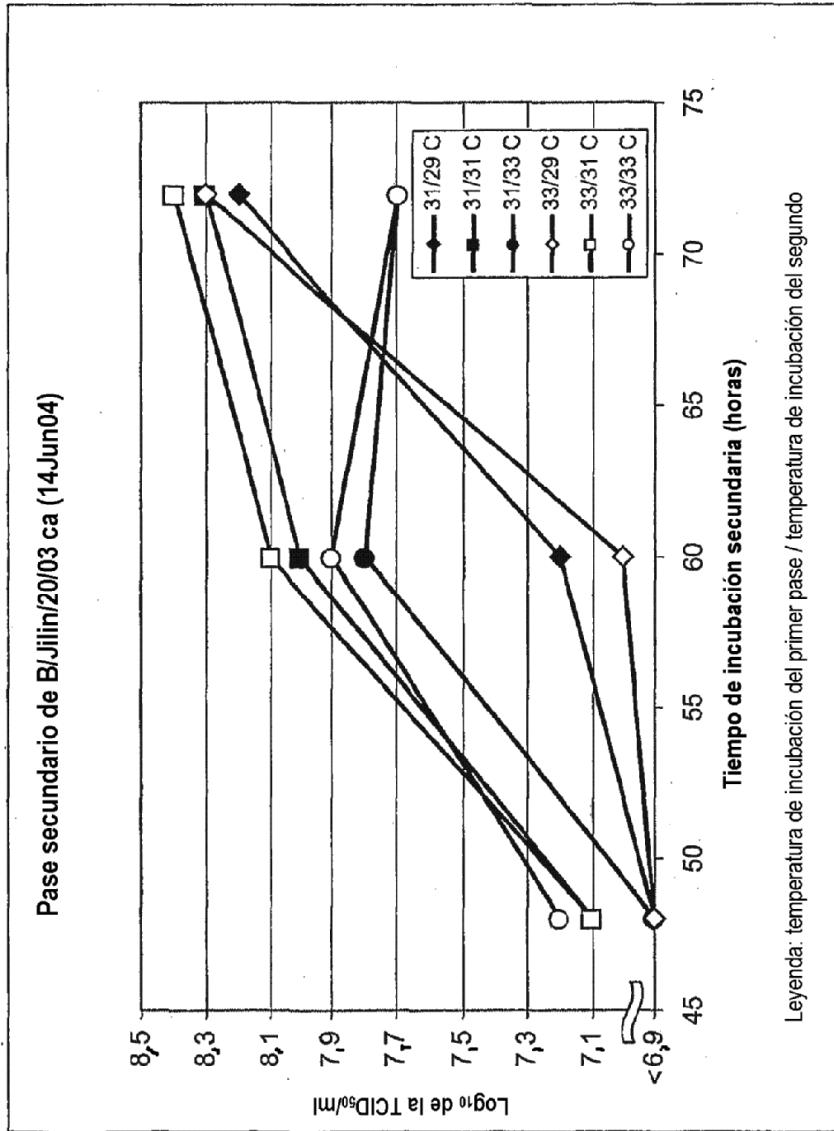


Fig. 13