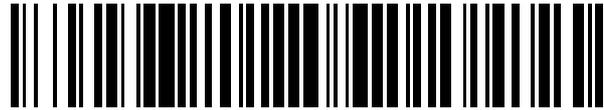


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 879**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12706508 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2675476**

54 Título: **Procedimiento para la producción a escala comercial de PRRSV**

30 Prioridad:

**17.02.2011 US 201161444071 P**

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

**14.12.2015**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH  
(100.0%)  
Binger Strasse 173  
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**BERRY, ELIZABETH JANE;  
HADDADIN, FUAD TAWFIQ;  
KHAZRAEINAZMPOUR, ALI;  
KROLL, JEREMY;  
MALBURG, SONIA REGINA CANTISANO;  
SANDOVAL BASURTO, EDGAR ARNULFO y  
SCHEERER, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 553 879 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

Procedimiento para la producción a escala comercial de PRRSV

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la producción a escala comercial del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (PRRSV - siglas en inglés) vivo atenuado, el cual se puede utilizar en la producción de vacunas basadas en el mismo, y al uso del mismo en el tratamiento de cerdos.

**Antecedentes de la invención**

10 El síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS - siglas en inglés) es considerado por muchos como la enfermedad más importante que afecta actualmente a la industria porcina en todo el mundo. El síndrome fue descubierto primero en 1987 en los Estados Unidos como la "enfermedad misteriosa del cerdo" y se propagó rápidamente por todo el globo. Esta enfermedad provoca pérdidas graves en la reproducción, está asociada con una mortalidad incrementada debido a infecciones secundarias y está ligada a una conversión reducida en la alimentación y a una ganancia en peso media diaria. Desgraciadamente, se ha manifestado difícil el control del virus que provoca el PRRS.

15 El virus del PRRS (PRRSV) es un virus de ARN de una sola cadena con envoltura, clasificado en la familia Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). Causa una enfermedad del cerdo muy extendida que se describió por primera vez como la "enfermedad misteriosa del cerdo" en EE.UU. en 1987 (Hill, 1990). La enfermedad se manifiesta como una enfermedad respiratoria en todos los grupos de edad del cerdo, que conduce a la muerte en algunos cerdos más jóvenes y a problemas reproductivos graves en hembras en edad de reproducción.

20 La transmisión del PRRSV puede, y a menudo ocurre a través del contacto directo entre cerdos infectados y susceptibles. También puede producirse una transmisión a distancias muy cortas por el aire o a través del semen. Una vez infestado, el virus puede permanecer en la sangre de adultos durante aproximadamente dos a cuatro semanas, y en cerdos infestados durante uno o dos meses o más. Verracos infestados pueden esparcir el virus en el semen durante más de 100 días. Este largo periodo de viremia aumenta significativamente la posibilidad de transmisión. Además, el virus del PRRS puede atravesar la placenta durante el último tercio del periodo de gestación para infestar a cochinitos en el útero y provoca partos muertos o cochinitos nacidos débiles.

25 Todos los tipos y tamaños de rebaños, incluidos aquellos con un estado de salud alto u ordinario o de unidades bajo techado o al aire libre pueden ser infestados con virus del PRRS. Los rebaños infestados pueden experimentar pérdidas de reproductividad graves, así como niveles incrementados de neumonía post-destete con un desarrollo deficiente. La fase reproductora dura típicamente de dos a tres meses; sin embargo, a menudo los problemas post-destete se vuelven endémicos. La enfermedad reproductora se caracteriza por un brote de aborto que afecta tanto a las cerdas como a las lechonas en el último tramo de gestación. Se producen lechigadas prematuras en torno a los 109 y 112 días de gestación. Aumenta el número de partos muertos y de cochinitos nacidos débiles, y resulta en un considerable incremento en la mortalidad pre-destete.

35 Tradicionalmente, la fase respiratoria ha sido observada en los neonatales, especialmente en neonatales de flujo continuo. Sin embargo, los problemas respiratorios provocados por el virus del PRRS también pueden observarse en el engorde final como parte de la enfermedad complejo respiratorio porcino (PRDC - siglas en inglés). Pueden producirse una reducción en la tasa de desarrollo, un aumento en el porcentaje de cerdos no comerciables y una elevada mortalidad post-destete. Hallazgos diagnósticos indican elevados niveles de neumonía que se asocian con el virus del PRRS, junto con una amplia diversidad de otros microbios que se observan comúnmente como agentes infecciosos secundarios. Aislados bacterianos pueden incluir *Streptococcus suis*, *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida*, entre otros. Agentes víricos comúnmente implicados incluyen el virus de la influenza porcina y el coronavirus respiratorio porcino. Los cerdos afectados rara vez responden a altos niveles de medicación y han fracasado sistemas de ingreso/salida en el control de la enfermedad.

40 El virus existe en forma de dos genotipos denominados tipo „US" y tipo „EU" que comparten aproximadamente el 50% de homología de secuencia (Dea S y col. (2000). Arch Virol 145:659-88). Estos dos genotipos también se pueden distinguir por sus propiedades inmunológicas. La mayor parte de la información de la secuenciación de diversos materiales aislados se basa en las proteínas estructurales, es decir, la proteína de la envoltura GP5 que justifica sólo el 4% del genoma vírico, mientras que se conoce sólo poco de las proteínas no estructurales (nsp, del inglés " non-structural proteins"). El aislamiento de PRRSV y la preparación de vacunas se han descrito en diversas publicaciones (documentos WO 92/21375 , WO 93/06211, WO 93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930).

45 La vacunación es el método clave para aliviar la carga del PRRS, dado que cerdos que se recuperan de una infección por el PRRS desarrollarán una respuesta inmune, la cual, bajo circunstancias normales, les protegerá de ser infestados de nuevo por la misma cepa de virus. Sin embargo, el virus del PRRS tiene la capacidad de cambiar debido a la alta tasa de mutación que a menudo se produce en virus de ARN positivos, de cadena sencilla; y, por lo

tanto, pueden surgir nuevas cepas de virus. En tales casos, puede no existir una producción cruzada entre cepas, y pueden observarse nuevos brotes en granjas que habían sido infestadas previamente. Así, existe una necesidad continua de vacunas adicionales.

- 5 El método más frecuentemente utilizado para producir vacuna contra el virus vivo atenuada consiste en hacer pasar el virus en serie en un sustrato (habitualmente un cultivo celular con una línea de células que es permisiva al virus) que no sea el hospedante natural (S) hasta que esté lo suficientemente atenuada (es decir, reducida en la virulencia o capacidad productora de enfermedades) a ser utilizado como una vacuna. Para el primer paso, el cultivo celular se infesta con el inóculo seleccionado. Después de obtener clara evidencia de la replicación del virus (p. ej. efectos citopáticos [CPE - siglas en inglés] inducidos por el virus en las células infestadas), se utiliza una parte alícuota del medio de cultivo celular, o de las células infestadas, o ambos, del primer paso para infestar a un segundo cultivo celular. El proceso se repite hasta que una o más mutaciones críticas en el genoma viral provoque una atenuación suficiente, de modo que el virus se pueda utilizar de forma segura como una vacuna. El grado de atenuación se determina, habitualmente, de forma empírica exponiendo al hospedante natural (S) a niveles de paso del virus progresivamente mayores.
- 10
- 15 El proceso anterior es fundamentalmente sólido y ha sido utilizado con éxito para el desarrollo de numerosas vacunas para uso humano y veterinario. Sin embargo, cuando se trata de una producción a escala industrial, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un método para la producción de PRRSV eficaz y económico.

### Breve resumen de la invención

20 La presente invención se refiere a un nuevo método para la producción de virus del PRRS vivo para uso en la fabricación de vacunas de este tipo. Los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar en la producción a gran escala de cualquier virus del PRRS, que incluyen, pero no se limitan a la cepa 94881 de PRRSV, PRRSV 94881, depositada ante la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo los Números de Acceso ECACC 11012501 y ECACC 11012502, cada una depositada el 25 de enero de 2011 de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest, o cualquier descendencia o progenie de una de las cepas antes mencionadas.

25 Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para la producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que comprende:

- a) al mismo tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PRRSV en un biorreactor e infestar las células de mamífero con un PRRSV.
- b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección;
- 30 c) llevar a cabo una primera etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;
- d) reponer el medio en el biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días;
- c) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;
- 35 f) reponer el medio en el biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días; y
- c) llevar a cabo una tercera etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislar del mismo el virus propagado.

40 En determinadas realizaciones, el método puede comprender, además, al menos una etapa de re-alimentación y de recolección subsiguientes a la tercera etapa de recolección, que comprende reponer el medio en el biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días, y realizar una cuarta etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislando del mismo el virus propagado.

45 Preferiblemente, en el método de producción la multiplicidad de infección (MOI - siglas en inglés) diana es 0,01 a 0,30 y las células de mamífero son sembradas a una densidad de aproximadamente  $7 \times 10^8$  a  $1,0 \times 10^9$  por cada biorreactor de 300 L. Más particularmente, la densidad de siembra de las células es de aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  por cada biorreactor de 300 L. En realizaciones específicas, la MOI es de aproximadamente  $7 \times 10^8$  partículas de virus.

El método puede comprender vigilar la concentración de dextrosa del medio, en el que la primera etapa de recolección se realiza el primer día cuando la concentración de dextrosa del medio disminuye a menos de 0,1 g/L.

50 En el método de producción comercial, la segunda recolección se realiza preferiblemente 1 ó 2 días post-re-alimentación con medio, y la tercera recolección se realiza 1 a 4 días después de la segunda re-alimentación con el medio.

En realizaciones específicas, el medio de cultivo se añade al biorreactor el día antes de o el mismo día antes de la

adición de la línea de células de mamífero y el PRRS. Preferiblemente, el medio de cultivo se añade al biorreactor un día antes de la adición de la línea de células de mamífero y el PRRS. La temperatura del biorreactor se establece entre 34°C y 38°C.

En realizaciones específicas, el medio comprende suero de ternero fetal al 5% v/v, irradiado.

- 5 El método se puede utilizar para la producción a escala comercial de cualquier PRRSV, que incluye, pero no se limita a PRRSV seleccionado del grupo que consiste en la cepa 94881 de PRRSV, PRRSV 94881, depositada ante la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo los Números de Acceso ECACC 11012501 y ECACC 11012502, cada una depositada el 25 de enero de 2011 de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest, VR 2332, la cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo
- 10 los Números de Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM N° de Acceso I-1140, CNCM N° de Acceso No I-1387, CNCM N° de Acceso I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 o ECACC V93070108; depósito ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402, o cualquier descendencia o progenie de una de las cepas antes mencionadas.
- 15 También se contempla un método de producción a escala comercial para la preparación de un PRRSV, que comprende:
- a. una siembra simultánea tanto de células de mamífero permisivas a la infestación por el PRRSV como del PRRSV en un biorreactor que contiene un medio adecuado para el crecimiento de las células; y
- b. realizar tres etapas consecutivas de recolección, en donde se recolecta PRRSV, en donde, después de cada una de las primera y segunda recolecciones, se repone el medio, y en donde:
- 20 i. la primera recolección se realiza el primer día en el que la concentración de dextrosa del medio desciende a menos de 0,1 g/L;
- ii. la segunda recolección se realiza 1 ó 2 días después de la adición del medio tras la primera recolección; y
- iii. la tercera recolección se realiza entre 1 y 4 días después de la adición del medio tras la segunda recolección.
- 25 Se contempla también un método alternativo que utiliza al mismo tiempo un proceso de frasco rodante que es equivalente al proceso del biorreactor arriba descrito. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para la producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que comprende:
- a) al mismo tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PRRSV en frascos rodantes e infestar dichas células de mamífero con un PRRSV;
- 30 b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección;
- c) realizar una primera etapa de recolección separando el medio de dicho frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado;
- 35 d) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días;
- e) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio de dicho frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado;
- f) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días y
- 40 g) realizar una tercera etapa de recolección separando del biorreactor el medio y aislando del mismo el virus propagado.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un PRRSV MLV, que comprende un PRRSV producido de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, formulados con un adyuvante o soporte aceptable para su administración a un cerdo.

#### Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

- 45 Figura 1: Proceso simultáneo para la producción a gran escala de PRRSV 94881.
- Figura 2: Definición y secuencias temporales del proceso simultáneo para los Biorreactores de 300 L
- Figura 3: Títulos virales y perfiles de dextrosa para las tres operaciones simultáneas en los Biorreactores de 300 L.
- Figura 4: Títulos virales y perfiles de glutamina para las tres operaciones simultáneas en los Biorreactores de 300 L.

Figura 5: Figura 5: Títulos virales y perfiles de DO para las tres operaciones simultáneas en los Biorreactores de 300 L.

Figura 6: Muestra los resultados de la RT-PCT PCR en el tiempo que representan el % de viremia en animales vacunados con PRRSV 94881.

5 Figura 7: Proceso simultáneo para la producción en frascos rodantes de PRRSV 94881.

Figura 8: Definición y secuencias temporales del proceso simultáneo para el proceso en frascos rodantes.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para la producción a gran escala de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) para uso en la producción de vacunas y otras composiciones. En métodos de producción típicos, el virus se desarrolla en una línea de células que es permisiva a la infección por PRRSV. Sin embargo, en métodos generales de este tipo, la línea de células se desarrolla en o cerca de la confluencia antes de la infestación con el PRRSV. En la presente invención, los autores de la invención han demostrado, de manera inesperada, que la línea de células no necesita ser sembrada ni hecha crecer antes de la infestación con PRRSV, sino que el PRRSV y la línea de células se pueden añadir al proceso del cultivo de células al mismo tiempo. Así, esta invención proporciona la importante ventaja de ahorro de tiempo, coste y materiales cuando el virus se produce en masa a escala comercial. La expresión escala comercial se refiere a volúmenes de cultivo celular superiores a 10 L. Por ejemplo, la escala comercial se refiere a un intervalo de escala de producción de 10 L a 3000 L para PRRSV vivo. En aspectos más específicos, el volumen es de 30 L a aproximadamente 300 L.

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para la producción de cualquier cepa de PRRSV, que incluye pero no se limita a las cepas de PRRSV depositadas como ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 o ECACC V93070108. En aspectos particularmente preferidos, los métodos de la invención se utilizan para producir la cepa 94881 de PRRSV, depositada por Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Alemania, en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, 30 Wiltshire, SP4 0JG, Gran Bretaña, con los Números de Acceso ECACC 11012501 (cepa parental) y ECACC 11012502 (MSV atenuado de elevado paso), cada una depositada el 25 de enero de 2011 de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest, o cualquier descendencia o progenie de una de las cepas antes mencionadas. Los virus desarrollados pueden ser cualquiera de los virus antes mencionados, en su formato atenuado. Alternativamente, los virus pueden estar genéticamente modificados de modo que comprendan uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican determinantes antígenicos adicionales de uno o más enfermedades del cerdo.

La persona experta comprenderá que existe un cierto número de líneas celulares que son permisivas a la infestación por parte de PRRSV. Células a modo de ejemplo son células de macrófagos alveolares porcinas tales como las derivadas de células MARC-145. Otras células que se pueden infestar con el PRRSV incluyen células MA-104; células de riñón de hámster bebé (BHK - siglas en inglés); células de ovario de hámster chino (CHO); y células de riñón de mono verde africano que no sean células MA-104 ni células MARC-145 tales como células VERO; que son transfectadas. Además, las células pueden ser células primarias procedentes de un cerdo que han sido adaptadas para el crecimiento a largo plazo en cultivo. Células hospedantes particularmente adecuadas son la línea de células de simio MA-104, células Vero, o macrófagos alveolares porcinos. El PRRSV crece preferentemente en macrófagos de pulmón alveolares (Wensvoort et al., 1991). Unas pocas líneas de células tales como CL2621 y otras líneas de células clonadas de la línea de células de riñón de mono MA-104 (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993) son también susceptibles al virus y se pueden utilizar en métodos de producción a gran escala descritos en esta memoria.

En el método a modo de ejemplo de la presente invención mostrado en el Ejemplo 1 que figura más abajo se proporciona un proceso simultáneo para la producción de MLV 94881 de PRRSV. Mientras que este proceso se muestra para MLV 94881 de PRRSV, la persona experta comprenderá que este proceso se puede utilizar fácilmente para cualquier PRRSV para el que se requiera una producción a gran escala.

Los virus producidos mediante el método de producción de la invención se pueden utilizar para aplicaciones para las que se utiliza actualmente el PRRSV. En un aspecto específico, el virus producido de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria se utiliza para preparar un MLV de PRRSV.

Las cepas de virus desarrolladas de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser virus PRRS virulentos, virus PRRS atenuados o, de hecho, virus de PRRS que han sido modificados para impartirles propiedades adicionales deseables. Esto se puede conseguir mediante técnicas convencionales de propagación y selección, tales como la propagación continuada en células hospedadoras adecuadas para extender el fenotipo atenuado. Alternativamente, las cepas pueden ser modificadas genéticamente por mutación dirigida a la secuencia de ácido nucleico del genoma de estas cepas mediante técnicas adecuadas de ingeniería genética. Se secuenció el genoma de PRRSV por completo o parcialmente (Conzelmann et al., 1993; Meulenber et al., 1993a, Murthaugh et al, 1995) y codifica, además de la ARN polimerasa dependiente de ARN (ORFs 1a y 1b), seis proteínas estructurales, de las cuales cuatro son glicoproteínas con cubierta denominadas GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) y GP5 (ORF5),

una proteína de la membrana no glicosilada M (ORF6) y la proteína N de la nucleocápsida (ORF7) (Meulenberg et al. 1995, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). La caracterización inmunológica y la secuenciación de nucleótidos de las cepas europea y de EE.UU. de PRRSV han identificado diferencias antigénicas menores dentro de las cepas de PRRSV localizadas en las proteínas virales estructurales (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995).

De hecho, el virus a modo de ejemplo desarrollado en la invención es el virus PRRSV 94881. Mientras que una cepa atenuada se desarrolla utilizando los métodos descritos en esta memoria, el virus puede fácilmente ser un virus PRRSV 94881 que se transforma en un virus quimérico, en donde la cadena principal del virus PRRSV 94881 bajo el N° de Acceso ECACC 11012502 o, de hecho, la cepa parental depositada bajo el N° de Acceso ECACC 11012501 se modifica para reemplazar la secuencia endógena de uno o más de ORF 1a, ORF 1b, ORF 2, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6 u ORF 7 con el ORF correspondiente de una cepa diferente de virus del PRRS. Por ejemplo, la cepa diferente de del virus PRRS puede ser una cepa europea diferente tal como la cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo los Números de Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, N° de Acceso ante CNCM I-1140, N° de Acceso ante CNCM I-1387, N° de Acceso ante CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o, de hecho, puede ser una cepa de EE.UU. tal como el virus norteamericano del PRRS, pT7P129A; depósito ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

Técnicas recombinantes para preparar secuencias modificadas son bien conocidas por los expertos en la técnica y, habitualmente, emplean la construcción de copias de ADN complementarias de longitud completa (clones infecciosos) del genoma viral que luego pueden modificarse mediante métodos de recombinación y manipulación de ADN (tal como la mutagénesis dirigida al sitio, etc.). De este modo, se pueden modificar, por ejemplo, sitios antigénicos o propiedades enzimáticas de las proteínas víricas. En la bibliografía se han reseñado clones infecciosos de cepas del virus del PRRS de genotipo europeo y norteamericano, y se pueden desarrollar utilizando los métodos de la invención.

Preferentemente, las vacunas de acuerdo con la presente descripción son vacunas vivas modificadas que comprenden una o varias de estas cepas vivas en un vehículo adecuado, pero también se puede utilizar un virus inactivado para preparar vacunas con virus muerto (VM). Las VVM se formulan típicamente para permitir la administración de  $10^1$  a  $10^7$  partículas víricas por dosis, preferentemente  $10^3$  a  $10^5$  partículas por dosis, más preferentemente  $10^4$  a  $10^5$  partículas por dosis ( $4,0-5,0 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>). Los VM se pueden formular basándose en un título de preinactivación de  $10^3$  a  $10^{10}$  partículas víricas por dosis. La vacuna puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina fisiológica. La vacuna puede comprender o no un coadyuvante. Un ejemplo de coadyuvante adecuado es acetato de  $\alpha$ -tocoferol que se puede obtener bajo la marca Diluvac Forte®. Alternativamente, se pueden utilizar, por ejemplo, coadyuvantes a base de alumbre.

Los cerdos pueden ser infestados mediante el PRRSV a través de la vía oronasal. El virus en los pulmones es absorbido por los macrófagos alveolares en los pulmones y en estas células la replicación de PRRSV se completa en el espacio de 9 horas. El PRRSV se traslada desde los pulmones a los nódulos linfáticos de los pulmones en el espacio de 12 horas y a los nódulos linfáticos periféricos, la médula ósea y el bazo en el espacio de 3 días. En estos sitios, sólo unas pocas células se tiñen de forma positiva para el antígeno viral. El virus está presente en la sangre durante al menos 21 días y, a menudo, durante mucho más tiempo. Al cabo de 7 días, se encuentran en la sangre anticuerpos contra el PRRSV. La presencia combinada de virus y anticuerpo en cerdos infectados con el PRRS demuestra que la infección por el virus puede persistir durante largo tiempo, aunque a un bajo nivel, a pesar de la presencia del anticuerpo. Durante al menos 7 semanas, la población de células alveolares en los pulmones es diferente de los pulmones SPF normales.

Una vacuna se puede presentar en forma de una preparación liofilizada del virus vivo, que se va a reconstituir en un disolvente, para dar como resultado una solución para inyección. Así, después de las etapas de recolección de la presente invención, el virus se puede combinar y liofilizar. El disolvente puede ser, p. ej., agua, solución salina fisiológica o tampón, o un disolvente coadyuvante. El disolvente puede contener coadyuvantes, por ejemplo, acetato de  $\alpha$ -tocoferol. La vacuna reconstituida se puede inyectar a continuación en un cerdo, por ejemplo, en forma de inyección intramuscular o intradérmica en el cuello. Para la inyección intramuscular, se puede aplicar un volumen de 2 ml, para una inyección intradérmica es típicamente de 0,2 ml. En un aspecto adicional, la presente descripción es por tanto un producto de vacuna que comprende en recipientes separados, una composición liofilizada del virus y un disolvente para la reconstitución y, opcionalmente, contiene además un folleto o una etiqueta con las instrucciones de uso.

Una vacuna preparada a partir de un virus producido por un método de la invención puede no sólo comprender una o varias de las cepas mencionadas anteriormente, sino también puede incluir otros componentes activos contra el SRRP u otras enfermedades porcinas víricas o bacterianas, tales como el circovirus porcino o el virus de la fiebre porcina clásica. Por consiguiente, la descripción se refiere adicionalmente a una vacuna tal y como se ha descrito, caracterizada porque contiene al menos un antígeno adicional activo contra una enfermedad porcina que no es el SRRP. Además, la vacuna puede comprender determinados adyuvantes aceptables en farmacia o veterinaria. Uno de estos adyuvantes es  $\alpha$ -tocoferol. Así, nuevas composiciones de vacunas, en particular vacunas contra el virus

PRRS que comprenden PRRSV 94881 se pueden mejorar adicionalmente mediante la adición de adyuvantes. Mejoras de este tipo comprenden la preparación de las vacunas en combinación con adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna, de modo que se observa una mejora respuesta/resultado clínico con la administración de la combinación del adyuvante y la vacuna en comparación con la administración de la vacuna sola. Por ejemplo, las composiciones de vacunas de la invención pueden comprender una vacuna contra el virus PRRSV 94881 y un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones de *Haemophilus sonnus*, Carbapol™ y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna del virus que comprende la vacuna contra el virus PRRSV 94881, puede ser una vacuna subunidad recombinante o, alternativamente, puede ser una vacuna contra el virus viva atenuada. Una vacuna viva a modo de ejemplo que existe es Ingelvac®PRRS MLV y el PRRSV 94881 se puede formular de una manera similar a Ingelvac®PRRS MLV.

Además de lo anterior, las composiciones de vacunas pueden contener otros ingredientes en tanto que los otros ingredientes no interfieran con las propiedades del adyuvante del MCP-1, fracciones de *Haemophilus sonnus*, Carbapol™ u otro carbómero o la vacuna contra el virus subyacente. Otros ingredientes de este tipo incluyen, por ejemplo, aglutinantes, colorantes, desecantes, antisépticos, agentes humectantes, estabilizantes, excipientes, adhesivos, plastificantes, agentes de pegajosidad, espesantes, materiales para parches, bases para ungüentos, separadores de queratina, sustancias de carácter básico, promotores de la absorción, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes superiores, tensioactivos, agua y agentes tampón. Otros ingredientes preferidos incluyen agentes tampón, bases para ungüentos, ácidos grasos, antisépticos, sustancias de carácter básico o tensioactivos.

Puede variar el contenido o la cantidad de los adyuvantes utilizados en la descripción y se puede determinar teniendo en consideración, por ejemplo, las propiedades de la vacuna contra el virus del PRRS que se esté utilizando, y la forma de dosificación. El adyuvante puede comprender, por ejemplo, 1 a 100% en peso. Las composiciones de la descripción, basadas en PRRSV 94881, se producen mezclando juntos el componente adyuvante y el componente vacuna contra el virus, ya sea solos o con otros diversos ingredientes. Las composiciones pueden ser tales que la vacuna contra el virus y los adyuvantes se presentan como una formulación o, alternativamente, el adyuvante y la vacuna se presentan en formulaciones distintas que se pueden administrar de forma simultánea o secuencial.

El componente adyuvante se puede administrar por separado de la vacuna contra el virus en la administración a organismos. Alternativamente, el adyuvante de acuerdo con la descripción, junto con la vacuna contra el virus, se puede administrar como una composición de vacuna sencilla. La vacuna contra el virus puede ser cualquier vacuna contra el virus. Aspectos más específicos contemplan el uso de una vacuna contra el virus PRRS que comprende PRRSV 94881. Además, una vacuna de este tipo se puede combinar con otras vacunas tales como Ingelvac® PRRS MLV y/o Porcilis® PRRS. Esta es meramente una vacuna contra el virus PRRS a modo de ejemplo, y otras vacunas de este tipo se pueden suplementar con los adyuvantes descritos en esta memoria.

Las composiciones inmunogénicas descritas en esta memoria son particularmente ventajosas en la inducción de la producción de una respuesta de anticuerpo al virus PRRS. En particular, se demuestra en esta memoria que el uso de estos adyuvantes específicos y, en particular, MCP-1, potencia la respuesta inmune al virus PRRS cuando existe una administración combinada del adyuvante y la vacuna contra el virus PRRS en comparación con la administración de vacuna sola. Se demuestra que una administración de este tipo produce una disminución de la gravedad de los síntomas clínicos tales como lesiones pulmonares, anorexia, decoloraciones de la piel, letargia, síntomas respiratorios, cochinillos momificados, tos, diarrea y combinaciones de los mismos, que están asociados con una infección por PRRSV. De hecho, hay una mayor disminución de la gravedad de los síntomas clínicos asociados con una infección por el virus PRRS, observada con la combinación de la vacuna y adyuvante en comparación con la disminución de este tipo de síntomas producida por la administración de la vacuna sola en ausencia de dicho adyuvante.

Así, las composiciones potencian particularmente el resultado clínico en un animal enfermo en comparación con el resultado de la administración de la vacuna contra el virus PRRS sola. En aspectos específicos, el resultado clínico potenciado es una reducción del porcentaje de lesiones pulmonares cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante. En otros aspectos, el resultado clínico potenciado es una reducción de la viremia en animales cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante.

Así, en un aspecto, la descripción se refiere a una vacuna mejorada, más particularmente a una vacuna contra el virus PRRS mejorada, en donde la mejora comprende mezclar la vacuna contra el virus con un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones de *Haemophilus sonnus*, carbapol y combinaciones de los mismos. La composición de vacunas de la descripción puede comprender, además, un soporte farmacéuticamente aceptable. Además, las vacunas pueden comprender otros ingredientes activos, incluidos HS, ORF 5, INF alfa, Poli ICLC, IL-12 para potenciar adicionalmente la función de la vacuna contra el PRRS. Adyuvantes de este tipo se pueden añadir solos o en combinación con MCP-1.

Las composiciones de vacunas de la descripción se pueden formular por cualquier método conocido en la técnica de la formulación, por ejemplo en preparados líquidos, suspensiones, ungüentos, polvos, lociones, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, emulsiones, cremas, cataplasmas, parches y geles, y se utilizan

preferiblemente como medicamentos. Así, de acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición de vacunas anterior. La composición de vacunas de acuerdo con la presente invención, cuando se administra dermalmente, puede inducir significativamente la producción de anticuerpos. Por consiguiente, en otra realización preferida de la presente invención, la composición de vacunas se puede proporcionar como un preparado transdermal.

Además, tal como se describe arriba, el virus y el adyuvante en la presente invención se pueden administrar a un organismo juntos en forma de una composición de vacunas sencilla, o en forma de un preparado adyuvante separado y distinto del componente virus del PRRS antigénico de la vacuna, con lo que el adyuvante actúa de tal manera que la cantidad de un anticuerpo producido en el organismo en respuesta a la vacuna contra el virus PRRS se puede incrementar significativamente en comparación con la administración de la vacuna contra el virus PRRS sola. Así, de acuerdo con todavía otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para aumentar la cantidad de un anticuerpo producido contra el virus del PRRS, comprendiendo el método administrar una cantidad inusualmente eficaz de la vacuna contra el virus del PRRS, y un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones de *Haemophilus sonnus*, carbapol y combinaciones de los mismos, ya sea solos o en combinación con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en HS, ORF 5, INF alfa, Poli ICLC, IL-12 y combinaciones de los mismos, en una cantidad eficaz como un inmunoadyuvante, de forma simultánea o sucesiva en el organismo.

Cuando el adyuvante y la vacuna contra el virus PRRS se administran a un organismo, se potencia el resultado clínico del animal. La cantidad eficaz del adyuvante y la cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna contra el virus del PRRS se puede determinar adecuadamente por una persona con una experiencia normal en la técnica teniendo en consideración, por ejemplo, el tipo y las propiedades de la sustancia antigénica, las especies de organismos, la edad, peso corporal, gravedad de las enfermedades, tipo de las enfermedades, el tiempo de administración y el método de administración, y utilizando, además, la cantidad de un anticuerpo producido contra la sustancia antigénica en el organismo como un índice.

La vacuna contra el virus del PRRS, el adyuvante o combinaciones de los mismos se pueden administrar a organismos por cualquier método adecuado, seleccionado, por ejemplo, dependiendo del estado de los pacientes y las propiedades de las enfermedades. Ejemplos de métodos de este tipo incluyen la administración intraperitoneal, la administración dermal (por ejemplo inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intradérmica y parches), administración nasal, administración oral, administración a través de la mucosa (por ejemplo administración rectal, administración vaginal y administración corneal). Entre ellos se prefiere la administración intramuscular.

Una dosis terapéutica de PRRSV MLV a modo de ejemplo es aproximadamente dos mililitros (2 mL). Los artesanos expertos reconocerán que se puede variar la cantidad de dosificación en base a la raza, estatura y otros factores físicos del sujeto individual, así como la formulación específica de PRRSV MLV y la vía de administración. Preferiblemente, el PRRSV MLV se administra en una dosis única; sin embargo, pueden ser útiles dosis adicionales. De nuevo, el artesano experto reconocerá a través de la presente descripción que la dosificación y el número de dosis se ve influenciado por la edad y el estado físico del cerdo sujeto, así como por otras consideraciones comunes a la industria y las condiciones específicas bajo las cuales se administra el PRRSV MLV.

En otros determinados aspectos, la vacuna puede ser una vacuna multivalente que comprende dos o más virus del PRRS, en que al menos uno de los virus del PRRS es el virus 94881 atenuado, depositado bajo el n° de Acceso ECACC 11012502. Los otros virus PRRS pueden ser uno o más seleccionados del grupo consistente en la cepa PRRSV depositada bajo los Números de Acceso cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo los Números de Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, N° de Acceso ante CNCM I-1140, N° de Acceso ante CNCM I-1387, N° de Acceso ante CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o, de hecho, puede ser una cepa de EE.UU. tal como el virus norteamericano del PRRS, pT7P129A; depósito ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

Las vacunas basadas en virus PRRS se pueden utilizar para vacunar tanto a cochinitos como a cerdas. En un aspecto de la descripción, se selecciona un régimen de dosis particular en base a la edad del cerdo y el antígeno seleccionado para la administración. Esto permitirá a los cerdos de cualquier edad recibir la dosis más eficaz en base al descubrimiento de la presente descripción de que la infección por PRRSV (tanto por exposición de tipo salvaje y de vacunación) se despeja mucho más rápidamente en animales de más edad. Así, en algunos aspectos, se prefiere la vacunación de animales de edad a la vacunación de cerdos más jóvenes, incluidos los de tres semanas de edad y menores ayuda a inducir la inmunidad activa y sigue siendo muy beneficiosa. La edad del animal puede ser un factor importante en el control del PRRS y puede ser un factor que impacta sobre la vacunación y el desarrollo de una respuesta inmune eficaz. Así, la edad, la gestión de la enfermedad, la cría de los animales, la inmunidad innata y activa son importantes y necesitan ser considerados en las estrategias de control.

La vacuna contra PRRSV 94881 se puede administrar de cualquier manera convencional y, en algunos métodos preferidos, la administración es nasal. Se prefiere que la vacuna contra el PRRSV administrada proporcione sus

beneficios de tratar o reducir la gravedad o la incidencia de una infección por PRRSV tras una dosis única, como con Ingelvac®, sin embargo, si se seleccionan otros antígenos o vacunas de combinación o multivalentes, debe entenderse que éstos pueden administrarse de su forma convencional, que puede incluir una o más dosis de refuerzo después de la administración inicial. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar niveles de dosificación apropiados en base a la vacuna contra el PRRSV seleccionada y el intervalo de edades de los animales a los que se administrará el antígeno.

Ejemplo 1:

Ampliación a modo de ejemplo para la producción de PRRSV 94881 MLV

La ampliación del proceso en el biorreactor de 300 L para PRRSV 94881 utilizaba células MA104 que se encontraban entre el paso 64-84. Estas células se expandieron en frascos rodantes de 850 cm<sup>2</sup> (Corning). Las células se cultivaron al mismo tiempo con una infección por virus en Biorreactores air-lift de 300 L. A lo largo del proceso de cultivo, las concentraciones en el medio de dextrosa/lactato se vigilaron en g/L. En la recogida, los fluidos se desecharon y se retuvieron las muestras de virus.

Las composiciones del medio eran como se muestra en la siguiente tabla:

Componente	Cantidad
Suero bovino fetal gamma irradiado	5%
MEM sin polvo rojo fenol	9,6 g/L
Sulfato de neomicina	30 mg/L
Bicarbonato de sodio	1,4 g/L
Ácido clorhídrico	para ajustar el pH

Se prepararon y filtraron el MEM sin medio Rojo Fenol, neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio. El FBS se añadió al medio, colocándose el medio simultáneamente en el biorreactor. La cantidad de neomicina añadida se calcula mediante: vol (L) x 30 mg/L ÷ Potencia (mg/g de base).

El proceso simultáneo para el crecimiento de PRRSV 94881 comprende sembrar células AK MA104 en el biorreactor e infestar simultáneamente las células con la siembra viral de PRRSV 94881. La figura 1 esboza el proceso simultáneo. En la figura 2 se proporcionan secuencias temporales para el proceso simultáneo esbozado en la figura 1.

En el proceso simultáneo un volumen de 270 L de medio se filtró en condiciones estériles en el biorreactor. El medio se añadió al recipiente el mismo día o el día anterior a la adición de células y suero. Si el medio se añade al biorreactor el día anterior a la adición de las células y suero, se recomienda que se active el control de la temperatura de manera que el medio se mantenga a 35°C, el pH en el modo de control con el pH mantenido en 7,25 ± 0,1 y modo de vigilancia de la DO y agitación ajustada a 35 rpm. El día de la adición de las células y suero bovino fetal irradiado (IFBS - siglas en inglés), el control de la temperatura se ajusta a 36°C. El IFBS se añade al biorreactor después de la adición del medio y antes de la siembra de las células. La concentración diana del IFBS es 5% v/v, lo cual, en el volumen de 270 L, es un volumen de 14,0 L de IFBS por biorreactor.

Se realizaron tres rondas en el biorreactor de 300 L. Los parámetros del biorreactor eran: punto de ajuste de la temperatura a 36°C, punto de ajuste del pH a 7,25 en el modo de control, vigilancia de la DO y agitador a 35 rpm. Las Tablas 3, 4 y 5 muestran los datos registrados el % de DO % a partir del OIT, dextrosa y lactato a partir de YSI, y el pH y L-gutamina a partir de NOVA. Los títulos PD son sólo de referencia. Los títulos QC son los títulos oficiales.

días	pH	DO %	Dextrosa g/L	Lactato g/L	Gln mmol/L	Título	Título	Comentarios
						PD	QC	
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7,24	168	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	Sólo Medio

0PI	7,2	92	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
1PI	7,26	168	1	0,073	2,63	3,67	N/E	N/E
2PI	7,25	83	0,95	0,12	2,36	4,9	N/E	N/E
3PI	7,23	74	0,742	0,262	2,14	5,88	N/E	N/E
4PI	7,24	63	0,408	0,58	1,72	6,45	7,0	N/E
5PI	7,06	30	0,044	0,921	1,19	6,50	7,3	DO control
6PI	7,25	30	0,011	0,902	0,74	6,38	6,7	Claro
7PI	7,24	30	0	0,855	0,49	7,40	7,4	turbio

5 La Tabla 3 muestra los resultados del lote 001PD-X durante 7 días de infección. Se tomaron muestras diariamente y la operación se terminó el día 7 PI. El pH se ajustó a 7,25 y se mantuvo constante durante la operación, excepto el día 4 PI cuando cayó por debajo de 7,0. El día 4 PI, la glucosa cayó hasta 0,4 desde 0,74 el día anterior, la glutamina comenzó a ser consumida y el título comenzó a aumentar aproximadamente un log. El título pico se observó el día 5 PI cuando la glucosa se había consumido totalmente ( $\leq 0,1$  g/L). También el día 5 PI, la DO cayó hasta el 30% y se inició el control para evitar la caída a cero de la DO durante una noche. El día 6 PI cayó el título y luego aumentó hasta 7,4 el día 7 PI. La muestra era turbia el día 7 PI.

Tabla 4: Resultados para la operación del lote 002PD-X en el biorreactor de 300 L

días	pH	DO %	Dextrosa g/L	Lactato g/L	Gln mmol/L	Título		Comentarios
						PD	QC	
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7,27	116	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	Medio añadido
0PI	7,2	83	1,04	0	N/E	N/E	N/E	células/suero/siembra añadidos
1PI	7,25	75	1,01	0,073	1,64	3,88	n/a	N/E
2PI	7,25	74	0,954	0,105	1,73	5,5	n/a	N/E
3PI	7,24	70	0,762	0,223	1,41	5,93	6	N/E
4PI	7,19	60	0,409	0,561	1,25	6,62	6,5	N/E
5PI	7,21	30	0,005	0,881	0,9	6,79	7,5	RECOLECCIÓN-I
R0PI (re-alimentado)	7,24	116	0,001	0,858	0,64	N/E	N/E	falló la sonda DO
R1PI	6,99	116	0,247	0,726	1,38	7,13	7,5	N/E
R2PI	7,15	116	0,0	0,894	0,95	7,06	7,0	dextrosa era cero
R3PI	7,13	116	0,0	0,865	0,66	6,69	7,5	Claro
R4PI	7,13	116	0,0	0,819	0,21	7,52	7,5	Claro
R5PI	7,13	116	0,0	N/E	0,1	7	7,3	Cierta turbidez

10 La Tabla 4 muestra resultados del lote 002PD-X (R0P1 es el punto en el que se re-alimenta el cultivo). En base a los resultados del título del lote 001PD-X, el día de recolección se estableció el día 5 PI. Los días 1 PI a 5 PI del lote 002PD-X eran consistentes con el lote 001PD-X. El biorreactor fue recolectado y luego se re-alimentó el día 5 PI. Se estableció la curva de crecimiento para la recolección-II. Se tomaron muestras sobre una base diaria durante 5 días. La dextrosa se había consumido por completo hacia el día R2PI. El título se encontraba en el pico durante 5 días (la variación de 0,5 logs se encuentra dentro del error de ensayo). La glutamina se había consumido totalmente hacia el

15

día R5PI. La sonda de DO falló después de la re-alimentación. El nivel de DO no se podía medir (lo más probablemente próximo a cero). El día R4PI las células seguían estando fijadas, ya que la muestra en el frasco era clara. El día R5PI se observó una cierta turbidez en el frasco de la muestra, lo que indicaba que las células podían haber comenzado a desprenderse de descendencia.

<b>Tabla 5:</b> Resultados para la operación del lote 003PD-X en el biorreactor de 300 L								
días	pH	DO %	Dextrosa g/L	Lactato g/L	Glutamina mmol/L	Título PD	Título QC	Comentarios
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
0PI	7,49	78	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
1PI	7,25	69	0,987	0,078	2,05	4,38	4,7	vigilar la DO/controlar el pH
2PI	7,23	66	0,935	0,107	1,9	5,13	5,7	N/E
3PI	7,22	60	0,783	0,221	1,71	6,2	6,5	N/E
4PI	7,29	53	0,453	0,519	1,45	6,36	6,6	N/E
5PI	7,1	30	0,049	0,899	1,17	6,36	7,0	RECOLECCIÓN-I
0PI (re-alimentación)	7,19	71	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	Vigilar la DO
R1PI	6,98	18	0,305	0,702	2,69	7,26	7,3	N/E
R2PI	7,23	7	0,0	0,917	1,82	6,85	7,5	RECOLECCIÓN-II
0PI 2ª re-alimentación	7,21	74	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
2R1PI	6,91	13	0,097	0,853	1,69	7,0	7,5	control de la DO a 10%
2R2PI	7,19	3	0,0	0,883	0,82	7,2	7,3	Vigilar la DO
2R3PI	7,17	2	N/E	N/E	0,42	7,46	7,5	turbio
2R4PI	7,24	18	N/E	N/E	0,22	7,0	7,5	la DO está subiendo
2R5PI	7,24	47	N/E	N/E	0,13	6,68	7,0	turbio
2R6PI	7,22	62	N/E	N/E	0,06	6,5	7,0	turbio
2R7PI	7,24	68	N/E	N/E	0,04	6,36	6,2	turbio

5

La Tabla 5 muestra los resultados del lote 003PD-X. En base a los resultados del título del lote 002PD-X, el día de recolección-II se estableció el día 1 PI o 2PI. Se decidió recolectar fluidos el día 2 PI para proporcionar una flexibilidad para la producción. Se estableció una curva de crecimiento para la Recolección-III durante 7 días. Se tomaron muestras sobre una base diaria. La dextrosa se había consumido por completo hacia el día 2 R2PI. El título se encontraba en el pico durante 4 días y luego cayó hasta 7,0 durante 2 días (la variación de 0,5 logs se encontraba dentro del error de ensayo), después cayó hasta 6,2 el día 7 PI. La glutamina se había consumido totalmente hacia el día 2 R5PI. La DO se tomó fuera de control el día 2R2PI para vigilar la muerte de las células.

10

Fase de recolección-I para la propagación del virus en la escala de 300 L: La curva de crecimiento para la Recolección-I (lote 001PD-X) mostró que las partículas virales continuaban creciendo hasta el día 7 PI a pesar de

5 haberse consumido por completo la dextrosa ( $\leq 0,1$  g/l) hacia el día 5 PI. El consumo de glutamina se inició cuando la dextrosa se encontraba aproximadamente la mitad de la concentración inicial de 1 g/L (día 4 PI), y luego, después de haberse consumido la dextrosa, la glutamina pareció ser la fuente de energía primaria. La inconsistencia en las lecturas de glutamina durante los primeros 2-3 días pudieran atribuirse a fluctuaciones en el instrumento NOVA, ya que el medio sólo contiene 2 mmol/L. Los niveles de la DO descendían de forma consistente durante el metabolismo de dextrosa/glutamina y la propagación del virus.

10 La cinética de propagación del virus sugirió recolectar el virus 5-7 días PI. La variación en los títulos de QC entre el día 4 PI y 7 PI se encontraba dentro de la variación del ensayo ( $\pm 0,71$  logs/ml). El criterio de Recolección-I era el instante en el que la dextrosa se había consumido por completo ( $\leq 0,1$  g/l) que era consistente con los datos de 30 L (Nº de estudio 6127-1310-09K-198). Por lo tanto, las mediciones fuera de línea de la dextrosa, partiendo del día 4 PI serían necesarias para seguir la pista de los niveles de dextrosa. La Tabla 3 demostró que el virus PRRSV 94881 era estable durante 3 días (5-7 días PI) en el biorreactor de 300 L después de haberse agotado la dextrosa. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, en base a los resultados de las tablas 4 y 5, se recomienda que la Recolección-I se realice el primer día en el que la concentración de la dextrosa es  $< 0,1$  g/L (utilizando la medición YSI) para asegurar la adherencia de las células a los descendientes (soportes) en el biorreactor.

20 Fase de recolección-II para la propagación del virus en la escala de 300 L: Para los lotes 002PD-X y 003PD-X, después de haberse realizado la Recolección-I el día 5 PI, se añadieron medio reciente y suero al 5% para generar la segunda recolección de fluidos virales (Tablas 4 y 5). El medio MEM (270-280 L) con IFBS (al 5% v/v) se añadió al biorreactor siguiendo los mismos procesos que los establecidos para ajustar el primer material de recolección. Se realizó una curva de crecimiento para la recolección-II durante 5 días en el lote 002PD-X y el título del pico se consiguió el día 1 post re-alimentación (véase la Tabla 4). El título era estable durante 4 días. El título del virus el día 1 post-re-alimentación era equiparable al título de la primera recolección (Tabla 2). El nivel de dextrosa se había consumido por completo el día 2 PI. Se podía utilizar un intervalo de cuatro días post-re-alimentación para el segundo criterio de recolección. Sin embargo, la realización de la segunda recolección el día 4 PI podría tener un efecto sobre la tercera recolección, ya que se observó una cierta turbidez en las muestras de fluido que se tomaron el día 4 PI, indicando la muerte de las células o el desprendimiento de la descendencia. Así, para el lote 003PD-X la recolección-II se realizó el día 2 PI. En base a los datos del lote 003PD-X se recomienda que los días diana de la Recolección II sean 1-2 PI si se han de realizar una segunda re-alimentación y una tercera recolección.

30 Fase de recolección-III para la propagación del virus en la escala de 300 L: Para el lote 003PD-X (Tabla 5), después de haber realizado la Recolección II el día 2 PI, se añadió al recipiente medio y suero adicionales para la generación de fluidos virales de tercera recolección (Tabla 5). El medio MEM (270-280 L) con IFBS (al 5% v/v) se añadió al biorreactor siguiendo los mismos procesos que los establecidos para ajustar el primer material de recolección. Se realizó una curva de crecimiento para la recolección-III durante 7 días y el título del pico se consiguió el día 1 post re-alimentación (véase la Tabla 5). El título era estable durante 4 días. El título del virus el día 1 post-re-alimentación era equiparable al título de la segunda recolección (Tablas 4 y 5). La dextrosa se había consumido por completo el día 1 PI. Se podía utilizar un intervalo de cuatro días post-re-alimentación para el tercer criterio de recolección.

Las tres gráficas que figuran más abajo representan los perfiles de dextrosa, glutamina y DO y los títulos para las tres operaciones realizadas en el biorreactor de 300 L. El propósito de la gráficas es mostrar la consistencia de las tres operaciones.

40 La figura 3 muestra un sumario de las tres operaciones realizadas en la escala de 300 L para el consumo de dextrosa y los títulos de virus. Los perfiles de la Recolección-I para las tres operaciones eran muy consistentes, la dextrosa se había consumido totalmente ( $\leq 0,1$  g/l) hacia el día 5 PI y coincidió con el título pico en las tres operaciones realizadas. Después de la primera re-alimentación, la dextrosa se encontraba por debajo de 0,3 g/l para los lotes 002PD y 003PD el día 1 PI y el título ya se encontraba en el pico. El día 2 PI, la dextrosa se había consumido por completo y el título del virus permanecía en el pico. Para la recolección III en el lote 003PD, cuando la segunda re-alimentación se realizó el día R2PI, la dextrosa había descendido a menos de 0,1 g/L hacia el día 2R1PI y el título se encontraba en el pico.

50 La figura 4 muestra un sumario de las tres operaciones realizadas en la escala de 300 L para el consumo de glutamina y los títulos de virus. Como se puede ver, los perfiles de la recolección-I para las tres operaciones eran muy consistentes. La glutamina cayó a la mitad de su concentración inicial de 2 mmol/L hacia el día 5 PI y coincidió con el título pico en las tres operaciones realizadas. Después de la primera re-alimentación, la glutamina cayó hasta la mitad de su concentración inicial hacia el día 2 PI para los lotes 002PD y 003PD y el título ya se encontraba en el pico desde el día 1 PI. Para la recolección III en el lote 003PD, la segunda re-alimentación se realizó el día R2PI. La glutamina se estaba consumiendo lentamente hasta 0 hacia el día 5 PI y el título del virus era consistente y luego las células comenzaron a morir y el título cayó hacia el día 7 PI.

60 Como se puede observar para el perfil de Recolección-I, las tres operaciones eran muy consistentes, la DO había caído hasta el 30 % hacia el día 5 PI y coincidió con los títulos pico en las tres operaciones realizadas. Después de la primera re-alimentación, la sonda de DO fracasó para el lote 002PD-X, de modo que no hay datos disponibles, en el lote 003PD-X DO cayó el día 1 PI, coincidiendo con el título pico. Para la recolección-III en el lote 003PD, cuando la segunda re-alimentación se realizó el día R2PI, la DO disminuyó rápidamente hasta el día 3 PI cuando las células

comenzaron a morir y la O se consumió hasta 0 hacia el día 5 PI y el título del virus era consistente, entonces las células comenzaron a morir y el título cayó hacia el día 7 PI.

**Tabla 6:** Sumario de las condiciones y resultados del proceso simultáneo en operaciones en biorreactores de 300 L\*.

Lote	PCD	MOI	TOH1	Título H1	TOH2	Título H2	TOH3	Título H3
001PD-X	$7,0 \times 10^9$	0,1	5	7,3	N/E	N/E	N/E	N/E
002PD-X	$7,0 \times 10^9$	0,1	5	7,5	1-4	7,5	N/E	N/E
003PD-X	$7,0 \times 10^9$	0,1	5	7,0	2	7,5	1-4	7,5

5 \*Condiciones diana (0,1 MOI,  $7,0 \times 10^9$  células totales por biorreactor de 300 L, pH 7,25 y 36°C)

(H1): Indica las primeras recolecciones en días post-infección.

(H2): Indica las segundas recolecciones en días post-infección.

(H3): Indica las terceras recolecciones en días post-infección.

10 Los fluidos virales procedentes del Lote 001PD-X se blanquearon y desecharon. Se mantuvo un litro de la recolección-I del lote 002PD-X y se añadió SGS (al 25% v/v) para fines de búsqueda, el resto de los fluidos fueron blanqueados y desechados. Dos litros de la Recolección II del lote 003PD-X se mantuvieron congelados para fines de concentración y el resto de los fluidos se blanquearon y desecharon.

15 **Intervalo de la densidad de células de siembra (PCD) para la escala de 300 L:** La densidad de células de siembra (PCD) es  $7,0 \times 10^9$  células totales por cada biorreactor de 300 L con un volumen de trabajo de 270-280 L. Basado en los datos del Proceso de Transferencia del Proceso Final de 30 L (6127-1310-09K-198), el intervalo de siembra de células totales oscila entre  $7,0 \times 10^8$  -  $1,0 \times 10^9$  por cada biorreactor de 30-L. Debido a restricciones en el tiempo, sólo se evaluó la densidad de siembra de células diana.

20 **Intervalo de la multiplicidad de infección (MOI) para la escala de 300 L:** La MOI diana de 0,1 es ideal para la propagación de PRRSV 94881 dentro de este sistema de crecimiento. Los niveles bajo y alto de la MOI de 0,01 y 0,3, respectivamente, se examinaron en los biorreactores de 30 L.

**Análisis de riesgo:** Los parámetros recomendados del procesos simultáneo en el biorreactor de 300 L se esbozan en la Tabla 11. Solamente se testaron parámetros diana y se consideraron por si eran críticos o no críticos para el proceso. Los intervalos se evaluaron en la escala de 30 L. Las definiciones son como sigue:

Parámetros críticos son aquellos parámetros que son críticos para los atributos de calidad del producto final;

25 Parámetros no críticos son aquellos parámetros que pueden ser controlados directamente dentro del intervalo definido o que tienen un amplio intervalo operacional, de modo que una desviación del punto establecido no es crítica. Parámetros no críticos ayudan a controlar los parámetros críticos dentro del intervalo definido.

Parámetros "Para Información Solamente" son parámetros que son vigilados para obtener información adicional sobre el proceso, pero que no tienen correlación directa con los atributos del producto final.

30 **Tabla 7:** Sumario de los parámetros del proceso simultáneo en un biorreactor de 300 L para PRRSV 94881 MLV

Parámetro	*Límite Inferior Ensayado	*Límite Superior Ensayado	*Intervalo Aceptado	Diana Aceptada	Crítico/No Crítico
MOI	0,01	n/a	0.01-0.30	0,10	NC*
Densidad de Siembra de Células	$7,0 \times 10^9$ células	$1,0 \times 10^{10}$ células n°	$7,0 \times 10^8$ células a $10 \times 10^9$ células	$7,0 \times 10^9$ células	NC*
Tiempo de la 1ª Recolección (Días post- infección)	Día 4	Día 7	Día 5 – Día 7 PI	Día 5 – 7 PI	Crítico **
Temperatura	35 °C	38 °C	$36 \pm 1^\circ\text{C}$	36 °C	NC*
pH	6,5	7,9	6.9 – 7.9	7,2	NC*

Tiempo de 2ª Recolección (Días post re-alimentación)	Día 1	Día 5	Día 1 – Día 4 PI	1-2	Crítico***
Tiempo de 3ª Recolección (Días post re-alimentación)	Día 1	Día 7	Día 1 – Día 4 PI	1-4	Crítico

No crítico dentro del intervalo examinado en la escala de 30 L.

5 \*\* El criterio de primera-Recolección se decide por el tiempo del consumo completo de dextrosa en el periodo de 5-7 días PI. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, la Recolección-I debería ser el primer día en el que la dextrosa es 0,1 g/L

\*\*\* Los fluidos son estables durante 5 días. Sin embargo, si se ha de realizar una recolección, la recolección debería hacerse entre los días 1 y 2

Nº basado en datos de 30 L para el scale-up

10 Conclusiones y Recomendaciones del Proceso: El proceso simultáneo de ampliación del biorreactor de 30 L al de 300 L se consiguió con éxito. La Recolección-I se encontraba dentro del intervalo del biorreactor de 30 L para los días de recolección y el título. La Recolección-II también tenía éxito con títulos equiparables a la Recolección-I. El título de la 2ª recolección era estable durante 4 días. Se consiguió una recolección adicional (tercera) con títulos equiparables a las recolecciones I y II. El título de la tercera recolección era estable durante al menos 4 días.

15 Las recomendaciones para un proceso simultáneo en un biorreactor de 300 L preferido para PRRSV 94881 MLV son como sigue:

20 Propagación del virus, RECOLECCIÓN-I: La composición del medio era MEM sin Rojo Fenol, 30 mg/L de neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio. Células MA104 se sembraron a una densidad de  $7 \times 10^9$  / biorreactor para descendencia de 300 L en 270 - 280 L de medio suplementado con 14,0 L de suero de bovino fetal al 5% v/v (intervalo:  $7 \times 10^9$  -  $1 \times 10^{10}$  / biorreactor para descendencia de 300 L). La temperatura del biorreactor se controló en  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . La DO se ajusta en el "Modo de Vigilancia". Activar el control de la DO en el punto establecido de 10% una vez que el nivel de DO caiga a 10 - 30%. el pH 7,2 se establece en el Modo Control. Los parámetros PID utilizados para el valor elevado de pH (adición de CO<sub>2</sub>) eran:

Ganancia	300,00
Reajustar mins por cada repetición	2,20
Tasa, minuto	0,50
Unidades de pH de la valve fina	0,03
Límite CV de la válvula fine	5%

25 El caudal de aire se ajusta a 2,0 SLPM; el caudal de CO<sub>2</sub> a 2,0 SLPM; el caudal de O<sub>2</sub> a 2,0 SLPM; el caudal de N<sub>2</sub> se ajusta a 2,0 SLPM y la tasa de purgado de gas total debería estar en 2,0 SLPM.

La MOI diana es 0,1 (intervalo  $7 \times 10^8$  -  $1 \times 10^9$  partículas de virus / biorreactor para descendencia de 300 L).

30 Para el criterio de recolección-I, el muestreo fuera de línea de las mediciones de dextrosa se toman comenzando el día 4 PI. La tendencia de la DO debería utilizarse como indicador. La Recolección-I debería realizarse cuando la dextros aes  $\leq 0,1$  g/L (intervalo 2 días +/-), lo cual ocurre habitualmente entre los 5-7 días PI. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, la Recolección-I se recomienda el primer día en el que la concentración de dextrosa es  $\leq 0,1$  g/L.

35 Primera Re-Alimentación- RECOLECCIÓN-II: Después de la primera Recolección, re-alimentar el biorreactor con 270 - 280 L de composición de medio MEM sin Rojo Fenol, neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 14,0 L de suero bovino fetal (al 5% v/v). La re-alimentación se realiza bajo las mismas condiciones que el ajuste del medio de la primera recolección (véanse los parámetros de la Primera Recolección anteriores). el control del pH se ha de mantener en un punto establecido de 7,2. Los parámetros PID utilizados para el valor elevado de pH (adición de CO<sub>2</sub>) eran:

Ganancia	300,00
Reajustar mins por cada repetición	2,20
Tasa, minuto	0,50
Unidades de pH de la valve fina	0,03
Límite CV de la válvula fine	5%

El control de la temperatura permanece en un punto establecido de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . El control de la DO se ajusta en el "Modo de Vigilancia".

- 5 Segunda Re-Alimentación - RECOLECCIÓN-III: Inmediatamente después de la segunda recolección, re-alimentar el biorreactor con 270 - 280 L de composición de medio MEM sin Rojo Fenol, neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 14,0 L de suero bovino fetal irradiado (al 5% v/v). La re-alimentación se realiza bajo las mismas condiciones que el ajuste del medio de la primera recolección (véanse los parámetros de la segunda recolección anteriores). el control del pH se ha de mantener en un punto establecido de 7,2. Los parámetros PID utilizados para el valor elevado de pH (adición de CO<sub>2</sub>) eran:

Ganancia	300,00
Reajustar mins por cada repetición	2,20
Tasa, minuto	0,50
Unidades de pH de la válvula fina	0,03
Límite CV de la válvula fina	5%

- 10 El control de la temperatura ha de permanecer en un punto establecido de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . La DO se ajusta en el Modo de Vigilancia. Los resultados actuales del ensayo demuestran que el tiempo óptimo oscila entre los días 1 - 4 post re-alimentación para los fluidos virales de la tercera Recolección.

- 15 Debe entenderse que el proceso anterior es a modo de ejemplo y se puede modificar adicionalmente para aumentar el rendimiento y/o reducir los costes de poner en funcionamiento el bioprocesador. Por ejemplo, cambios en los parámetros pueden incluir, pero no se limitan a: reducir la concentración de suero para segunda y terceras recolecciones, reducir la densidad de siembra de células, añadir las células y la siembra al mismo frasco y agitarlo, de manera que se pueda acortar la propagación del virus para la recolección I. También, se puede mejorar adicionalmente el rendimiento del virus mediante una re-alimentación más para una posible Recolección IV.
- 20 Componentes de medio agotado de alimentación son, pero no se limitan a glucosa y glutamina

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)

- 25 En un ejemplo específico, el PRRSV 94881 producido de acuerdo con el método arriba descrito se utilizó para determinar la eficacia del PRRSV 94881 en la vacunación de cerdos. En este estudio, cochinitos de 4 a 13 días de edad fueron vacunados intramuscularmente con una composición que comprendía  $10^{7,6}$  TCID<sub>50</sub> en 2 ml (día 0 de estudio). El día 13, se destetó a los cochinitos y se les vigiló en cuanto a diversos parámetros de la enfermedad hasta el día 90. Los parámetros del estudio incluían vigilar la viremia, la presencia de virus en los tejidos y las secreciones, observaciones clínicas, lesiones pulmonares y ganancia de peso.

- 30 Cada uno de los grupos de estudio: los vacunados, los centinelas y los controles se pesaron los días de estudio 0, 14, 28, 56 y 90. Se tomaron muestras de sangre cada día alterno entre los días 0 y 14 y una vez a la semana hasta el día 90 tanto para el grupo vacunado como para los centinelas y una vez a la semana a lo largo de los periodos de estudio para los controles hasta el día 90.

Se tomaron frotis nasales, orales y faciales cada día alterno entre los días 0 y 14 y una vez a la semana hasta el día 56 tanto para el grupo vacunado como para los centinelas y una vez a la semana a lo largo de los periodos de estudio para los controles hasta el día 56.

- 35 La necropsia se confirmó en el grupo vacunado en dos cerdos cada día alterno de los días 0 a 14 y una semana desde el día 14 al día 90 con el resto de los cerdos el día 90. En el grupo centinela 5 cerdos el día 56 permanecían el día 90. Grupo control 2 cerdos cada día alterno entre el día 0 y el día 14, una vez a la semana entre el día 14 y el día 56 y los cerdos restantes el día 90.

Cada día se realizaron observaciones clínicas.

La RT- PCR cuantitativa se realizó utilizando cebadores específicos de PRRSV europeo para muestras de frotis de la sangre, oral, fecal y nasal, así como lavados de los pulmones.

5 A partir de estos estudios los datos demostraron que los cochinitos mostraban una salud normal, excepto unos pocos cerdos que cojeaban. Post-mortem no había aspectos anormales en la necropsia, excepto que 1-2 animales mostraban signos de nódulos linfáticos inguinales suavemente ampliados. De manera importante, se observó que no existían lesiones pulmonares en el grupo vacunado.

10 La figura 6 muestra el porcentaje de animales virémicos en el grupo centinela en comparación con el grupo vacunado con una composición que contiene la cepa de virus del PRRS atenuada depositada con el N° de Acceso 11012502 en la ECACC, mostrando eficacia del virus del PRRS producido de acuerdo con los métodos de la invención en proporcionar inmunidad protectora a cerdos.

Ejemplo 3

El siguiente equipo y reactivos (Tabla 8) se utilizaron en el desarrollo del proceso en frasco rodante simultáneo para EU PRRS 94881:

15 Tabla 8: Equipo

Etapa del Proceso	Procedimiento	Equipo
Mantenimiento de células MA104 (pasos 58-78) y AK- MA104 (pasos 64-84) . Misma línea de células, diferentes pasos	Mantenimiento y ampliación, de acuerdo con los registros del proceso BPF-777 y BPF-778	Frascos rodantes de 850 cm <sup>2</sup> (CORNING)
Recuento de células	Recuento automático	Célula Vi
Cultivo celular	Crecimiento de células	Frascos rodantes de 850 cm <sup>2</sup> (CORNING)
Producción de Virus	Infección	Sacudidor rodante e incubadora
	Conc. de Dextrosa/Lactato g/L(± 5% de variación del ensayo)	YSI 2700
	Muestreo	pipetas

Medio MEM con Rojo Fenol y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio se obtuvo de SAFC. La Tabla 9 describe la composición del Medio, más concentración del suero. este medio se utilizó para porpagar el virus, incluidas todas las re-alimentaciones de frascos rodantes.

20 **Tabla 9:** Composición del Medio MEM.

Catálogo/Artículo nº	Componente	Número de lote	Cantidad por frasco rodante
700754	Suero bovino fetal gamma irradiado, US	10D837	20 mL (5% v/v)
62892-1000M3056	MEM con Rojo Fenol	10L259	400 mL

Proceso simultáneo con tres recolecciones:

25 El proceso simultáneo añadía medio con suero, células AK- MA104 y siembra de virus EU PRRS 94881 en un recipiente. Luego, se mezcló el contenido del recipiente y se dispensó a a los frascos rodantes (TOI igual a cero los días PP). La figura 7 ilustra el método del proceso simultáneo y la figura 8 ilustra la definición del proceso y las secuencias temporales.

Frasco Rodante y Preparación del Medio:

El experimento presentado aquí era una tanda de 5 frascos rodantes. El tamaño real de la tanda puede variar.

5 Bajo condiciones asépticas se añadieron a un recipiente 2000 mL de medio MEM y 100 mL de suero bovino fetal irradiado. Luego se añadieron  $5 \times 10^7$  células AK-MA104 y siembra de virus EU PRRS a una MOI de 0,1. Estos materiales se mezclaron y, bajo condiciones asépticas se dispensaron aproximadamente 400 mL por cada frasco rodante de 850 cm<sup>2</sup> Corning. Los frascos rodantes se incubaron luego a 37°C en un sacudidor rodante a una velocidad de 0,5 rpm. Se realizaron hasta tres recolecciones con dos re-alimentaciones de medio.

Criterio para la Recolección y Potencia Aceptable:

10 Los criterios para recolectar los frascos rodantes se basaron en el punto establecido/ objetivo para los parámetros críticos del proceso en el biorreactor de 300 L validado de los Ejemplos 1 y 2, tal como se muestra en la Tabla 10 que figura más abajo.

La recolección-I se realizó los días 5 -7 PI y el nivel de dextrosa era  $\leq 0,1$  g/L. La recolección II tuvo lugar el día 2 PI después de la re-alimentación y la recolección III el día 2 PI después de la segunda re-alimentación.

La potencia de las tres recolecciones de los frascos rodantes debería ser  $\geq 10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

15 **Tabla 10:** Criterios de recolección/potencia aceptable para EU PRRS 94881 MLV

Parámetro	Diana Aceptable
Tiempo de la 1ª Recolección (Días post- infección)	Día 5 – 7 PI
Nivel de dextrosa a la 1ª recolección	0,1 g/L
Tiempo de 2ª Recolección (Días post re-alimentación)	2
Tiempo de 3a Recolección (Días post re-alimentación)	2
Potencia	$\geq 10^{5,5}$ TCID <sub>50</sub> /mL

\*Parámetros críticos son aquellos parámetros que son críticos para los atributos de calidad del producto final

Operaciones con frascos rodantes

20 **Tabla 11:** Experimento inicial para el desarrollo del EU PRRS 94881 del proceso simultáneo de frascos rodantes y resultados de los títulos

Frasco rodante código	Densidad de siembra de células por cada FR	MOI	H- I + re-alimentación	Dextrosa g/L	TCID <sub>50</sub> por mL	H-II + re-alimentación	TCID <sub>50</sub> por mL	H-III Final	TCID <sub>50</sub> por mL
A	$3,5 \times 10^6$	0,1	5PI	0,304	$\leq 5,5$	7PI	6,5	9PI	$\leq 6,0$
B	$3,5 \times 10^6$	0,1	6PI	0,048	6,5	8PI	6,6	10PI	$\leq 5,7$
C	$3,5 \times 10^6$	0,1	7PI	0,006	$\leq 5,5$	9PI	$\leq 6,3$	11PI	6,7
D	$3,5 \times 10^6$	0,005	5PI	N/E	$\leq 5,6$	7PI	6,5	9PI	$\leq 5,5$
E	$3,5 \times 10^6$	0,005	6PI	0,057	$\leq 5,5$	8PI	$\leq 5,5$	10PI	7,4
F	$3,5 \times 10^6$	0,005	7PI	0,0	$\leq 5,5$	9PI	$\leq 5,5$	11PI	$\leq 5,5$
G	$7 \times 10^6$	0,1	5PI	0,066	6,6	7PI	6,9	9PI	$\leq 6,3$

H	7 x 10 <sup>6</sup>	0,1	6PI	0,009	6,5	8PI	7,3	10PI	6,7
I	7 x 10 <sup>6</sup>	0,1	7PI	0	≤ 6,2	9PI	7,0	11PI	6,6
J	1 x 10 <sup>7</sup>	0,1	5 PI	0,095	6,9	7 PI	6,6	9 PI/10 PI	≤ 6,3/6,7
K	1 x 10 <sup>7</sup>	0,1	6 PI	0	7,3	8 PI	7,5	10 PI/11 PI	6,5/6,6
L	1 x 10 <sup>7</sup>	0,1	7 PI	0	7,7	9 PI	≤ 5,5	11 PI/12 PI	7,2/6,6
M	1 x 10 <sup>7</sup>	0,005	5PI	0,118	≤ 5,6	7PI	7,5	9PI	≤ 6,0
N	1 x 10 <sup>7</sup>	0,005	6PI	0,014	7,0	8PI	6,7	10PI	6,7
O	1 x 10 <sup>7</sup>	0,005	7PI	0	6,7	9PI	7,3	11PI	6,7
<b>Experimento control: Proceso convencional de frasco rodante para EU PRRS 94881</b>									
Frasco rodante código	Densidad de Siembra de Células	TOI	MOI	Recolección I + re-alimentación	TCID <sub>50</sub> por mL	Recolección II + re-alimentación	TCID <sub>50</sub> por mL	Recolección III Final	TCID <sub>50</sub> por mL
P	2 x 10 <sup>7</sup>	3 días	0,005	3PI	6,7	6PI	7,4	9PI	6,9
Q	2 x 10 <sup>7</sup>	3 días	0,005	4PI	6,7	7PI	7,7	10PI	6,7
R	2 x 10 <sup>7</sup>	3 días	0,005	5PI	7,0	8PI	7,2	11PI	6,6
S	2 x 10 <sup>7</sup>	Al cabo de 3 días, se hizo un recuento de las células para el cálculo de MOI para los FRs P, Q y R							

La Tabla 11 muestra el experimento inicial diseñado para definir el proceso simultáneo en frasco rodante basado en los siguientes parámetros a partir del proceso descrito en los Ejemplos 1 y 2 y los informes del virus de siembra de trabajo mostrados en la Tabla 12a.

5 **Tabla 12a:** Parámetros evaluados para definir el proceso simultáneo en frasco rodante

parámetros	intervalo	información
Densidad de siembra de células por cada FR de 850cm <sup>2</sup>	3,5 x 10 <sup>6</sup>	bajo intervalo de siembra de células
	7,0 x 10 <sup>6</sup>	Intervalo medio de siembra de células
	1,0 x 10 <sup>7</sup>	Equivalente a FR de 300 L basado en células/mL
MOI	0,005	Proceso convencional en FR
	0,1	MOI diana para proceso en FR de 300 L

Quince frascos rodantes fueron sembrados con células MA-104 a densidades de siembra de células que oscilan entre  $3,5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  (véase la Tabla 11 columna 2). Los frascos rodantes fueron marcados por orden alfabético. Conjuntos de tres frascos rodantes tenían la misma densidad de siembra de células y el mismo MOI que oscilaba entre 0,005 y 0,1 (Tabla 11, tercera columna).

5 Se evaluaron tres densidades de siembra de células y dos MOIs (Tabla 12). Conjuntos de tres frascos rodantes tenían la misma densidad de siembra de células y el mismo MOI (Tabla 4, columna 1). Los frascos rodantes se ajustaron de acuerdo con la preparación del frasco rodante y del medio arriba descrita y se incubaron en un sacudidor rodante a una velocidad de 0,5 RPM a 37°C en incubadora.

10 La recolección I de los frascos rodantes A, D, G, J y M se produjo el día 5 PI, y luego se re-alimentaron y se incubaron durante dos días. Luego se realizó la R-II, los frascos rodantes se re-alimentaron e incubaron y se realizó una tercera recolección y final dos días más tarde.

La R-I de los frascos rodantes B, E, H, K y N se produjo el día 6 PI, y luego se re-alimentaron y se incubaron durante dos días. Luego se realizó la R-II; los frascos rodantes se re-alimentaron una vez más y se re-incubaron. Una tercera recolección y final dos días más tarde.

15 Finalmente, la R-I de los frascos rodantes C, F, I, L y O se produjo el día 7 PI, y luego se re-alimentaron y se incubaron durante dos días. Luego se realizó la R-II, los frascos rodantes se re-alimentaron y re-incubaron y se realizó una tercera recolección y final dos días más tarde.

20 El proceso convencional en frascos rodantes (frascos rodantes P, Q, R y S) se utilizó como un control para este experimento. Este proceso se desarrolló con dos recolecciones. La tercera recolección se añadió al proceso en estos experimentos, así como el intervalo de recolección-I de hasta 5 días PI.

25 Células MA104 se sembraron en frascos rodantes de 850cm<sup>2</sup> a razón de  $2 \times 10^7$  y se incubaron durante 3 días (frascos rodantes P, Q, R y S). Al cabo de tres días, el frasco rodante S se tripsinizó y las células se recontaron mediante Vi-cell. El recuento de células se utilizó para el cálculo del MOI del virus para los FRs P, Q y R. La cantidad calculada de virus se añadió a los frascos rodantes que se incuban a 37°C en un sacudidor rodante. Al cabo de 3 días, se realiza la recolección-I en el frasco rodante P, que luego fue re-alimentado e incubado a 37°C. Después de 3 días, se obtuvo una segunda recolección, y se re-alimentó una segunda vez y se incubó durante 3 días adicionales para una recolección tercera y final.

Los frascos rodantes Q y R siguieron el mismo proceso después de la R-I, el día 4 PI para el FR Q y 5 PI para el FR R.

30 El proceso convencional en frascos rodantes es más largo que el proceso simultáneo descrito en los Ejemplos 1 y 2 y requiere más trabajo, ya que las células necesitan crecer durante 3 días antes de ser infestadas con el virus. También, requiere el doble de la densidad de siembra de las células cuando se compara con el proceso simultáneo, pero una MOI más baja. Este proceso proporcionó altos títulos consistentes para las tres recolecciones.

35 Se decidió que el tiempo de recolección R-I (TOH) para el proceso simultáneo se basara sólo en los días diana, independientemente del consumo de dextrosa. Se tomaron muestras para medir la dextrosa y el título los días de recolección.

En base a los criterios para el título aceptable de potencia (Tabla 10), los frascos rodantes A, B, C, D, E y F mostraron títulos inconsistentes para las recolecciones I, II y III.

40 Los frascos rodantes G, H e I con una densidad de siembra de las células de  $7 \times 10^6$  y una MOI diana de 0,1 tenían un nivel de dextrosa en la primera recolección dentro del objetivo de  $\leq 0,1$  g/L. Los resultados de los títulos para los frascos rodantes G y H eran aceptables. Para la recolección-II, todos los frascos rodantes G, H e I tenían títulos de logs alto 6 y bajo 7. Para la recolección-III, los frascos rodantes G y H eran aceptables con títulos de 6,6 y 6,5, respectivamente. Para la mayoría del conjunto de recolecciones G, H e I eran aceptables.

45 El siguiente experimento J, K y L era el más prometedor en términos de títulos. La dextrosa se consumió en la R-I para todos los FRs y el título dentro de criterios aceptables en base a la Tabla 10. En las segunda y tercera recolecciones los títulos también cumplían los criterios en la Tabla 3, excepto para dos frascos rodantes. La R-III para los FRs J, K y L se extendió durante un día más, demostrando que los títulos seguían siendo aceptables. (Tabla 11)

Los últimos frascos rodantes M, N y O tenían una elevada densidad de siembra de células y una MOI baja mostraba resultados de títulos consistentes para los frascos rodantes N y O.

50

**Tabla 12b:** Comparación de parámetros entre el proceso simultáneo en frascos rodantes y el proceso en biorreactor

Parámetro	biorreactor de 300 L	Conjunto de frascos rodantes J, K y L
Volumen de trabajo de medio más suero en mL	283500	400
Densidad de siembra de células/mL	$2,53 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
MOI	0,1	0,1

5 En base a la Tabla 10, los resultados de los frascos rodantes J, K y L TCID<sub>50</sub>/mL mostrados en la Tabla 11, cumplieron todos los criterios para las recolecciones I, II y III. La relación de la densidad de siembra de células por mL en los frascos rodantes J, K y L son equivalentes a la densidad de siembra de células en el biorreactor por mL (Tabla 6) para el de 300 L. En base a estos datos, los parámetros para los frascos rodantes J, K y L eran los elegidos para una operación de confirmación (Tabla 13).

**Tabla 13:** Establecimiento de la operación de confirmación en el proceso simultáneo en frascos rodantes y concentración de dextrosa en la recolección-I

Frasco rodante código	Densidad de siembra de células/FR	de de MOI	Recolección I + re-alimentación	dextrosa g/L a TOH	H II + re-alimentación	H III Final
J1	$1 \times 10^7$	0,1	5PI	0,080	7PI	9PI
J2	$1 \times 10^7$	0,1	5PI	0,128	7PI	9PI
J3	$1 \times 10^7$	0,1	5PI	0,066	7PI	9PI
J4	$1 \times 10^7$	0,1	5PI	0,076	7PI	9PI
J5	$1 \times 10^7$	0,1	5PI	0,128	7PI	9PI
K1	$1 \times 10^7$	0,1	6PI	0,137	8PI	10PI
K2	$1 \times 10^7$	0,1	6PI	0,058	8PI	10PI
K3	$1 \times 10^7$	0,1	6PI	0,100	8PI	10PI
K4	$1 \times 10^7$	0,1	6PI	0,088	8PI	10PI
K5	$1 \times 10^7$	0,1	6PI	0,087	8PI	10PI
L1	$1 \times 10^7$	0,1	7PI	0,005	9PI	11PI
L2	$1 \times 10^7$	0,1	7PI	0,006	9PI	11PI
L3	$1 \times 10^7$	0,1	7PI	0,0	9PI	11PI
L4	$1 \times 10^7$	0,1	7PI	0,013	9PI	11PI
L5	$1 \times 10^7$	0,1	7PI	0,004	9PI	11PI

10

La Tabla 13 muestra la tanda de confirmación para el proceso simultáneo elegido evaluado en la Tabla 10.

Se ajustó un total de 15 frascos rodantes a una densidad de siembra de células de  $1 \times 10^7$  cada una en 400 mL de medio con suero y siembra de EU PRRS 94881 MSV+4 a una MOI de 0,1. Los frascos rodantes se dividieron en 3 grupos de 5. La recolección-I se realizó el día 5 PI para los FRs J1 a J5, el día 6 PI para K1 a K5 y el día 7 PI para

L1 a L5. La dextrosa se midió para cada uno de los frascos rodantes. Después, las recolecciones se agruparon y se tomaron muestras para cada uno de los títulos. Subsiguientemente, se realizaron re-alimentaciones y recolecciones II y III final.

- 5 En la recolección-I, por término medio, todos los quince frascos rodantes tenían dextrosa dentro de criterios de recolección de  $\leq 0,1\text{g/L}$  para el proceso de biorreactor (Tabla 3), que confirmó que el proceso es consistente en frascos rodantes.

**Tabla 14:** Sumario de las condiciones y resultados TCID<sub>50</sub> del proceso simultáneo en frasco rodante

Lote (agrupación de 5 frascos rodantes)	PCD	MOI	TOH1	Dextrosa	TCID <sub>50</sub> /mL	TOH2	TCID <sub>50</sub> /mL	TOH3	TCID <sub>50</sub> /mL
				g/L a TOH1	H1		H2d		H3
J	$1,0 \times 10^7$	0,1	5PI	0.092	6,5	7PI	7,3	9PI	6,5
K	$1,0 \times 10^7$	0,1	6PI	0,084	6,7	8PI	7,6	10PI	6,7
L	$1,0 \times 10^7$	0,1	7PI	0,000	6,5	9PI	7,7	11PI	7,4

- 10 La Tabla 14 muestra un sumario de las condiciones y los títulos de virus en TCID<sub>50</sub> /mL para la agrupación de frascos rodantes J, K y L para R-I, R-II y R-III para el proceso simultáneo en frascos rodantes de la presente invención.

Para imitar el proceso en frascos rodantes, se agruparon muestras de cada uno de los frascos rodantes individuales para el conjunto J (Tabla 13) y la muestra agrupada para el título. El mismo proceso se aplicó a los frascos rodantes K y L para R-I, R-II y R-III.

- 15 La dextrosa para las muestras de la agrupación R-1 eran 0,0 g/L para J, K y L. Los títulos para R-I, R-II y R-III oscilan de 6,5 a 7,7 que es equiparable al proceso en el biorreactor de 300 L. (Tabla 15)

**Tabla 15:** Sumario de las condiciones y resultados de TCID<sub>50</sub>/mL del proceso simultáneo validado en FR de 300 L\*

Lote	PCD	MOI	TOH1	Dextrosa	TCID <sub>50</sub> /mL	TOH2	TCID <sub>50</sub> /mL	TOH3	TCID <sub>50</sub> /mL
				g/L a TOH1	H1		H2d		H3
021610PD	$7,2 \times 10^9$	0,1	5PI	0,0	7,5	7PI	7,5	9PI	6,7
030110PD	$7,2 \times 10^9$	0,1	6PI	0,0	7,3	8PI	7,4	10PI	7,4
031510PD	$7,2 \times 10^9$	0,1	7PI	0,0	7,5	9PI	6,7	11PI	7,4

\*muestras contienen SGS como estabilizador

- 20 La Tabla 15 muestra los parámetros y los títulos en TCID<sub>50</sub>/mL para las tres tandas de validación realizadas bajo condiciones de cGMP. Los tres lotes tenían la misma densidad de células de siembra y la misma MOI. La dextrosa era 0,0 g/L en la recolección I para los tres lotes. Todas las recolecciones tenían resultados dentro de criterios de aceptación.

**Intervalo de densidad de células de siembra (PCD) para frasco rodante:**

- 25 La densidad de células de siembra (PCD) es  $1,0 \times 10^7$  células totales por cada frasco rodante con un volumen de trabajo de 400 mL. Para el intervalo bajo  $7 \times 10^6$  se evaluó (Tabla 4) asimismo con títulos aceptables. El intervalo alto fue evaluado en el proceso convencional (Tabla 11).

**Intervalo de la multiplicidad de infección (MOI) para frascos rodantes:**

La MOI diana de 0,1 es ideal para la propagación de EU PRRS 94881 dentro de este sistema de crecimiento. Los niveles bajo y alto de la MOI de 0,01 y 0,3, respectivamente, se examinaron en los biorreactores de 30 L. En el frasco rodante, debido a limitaciones en el tiempo, sólo se evaluaron las dianas 0,1 MOI y 0,005 MOI (Tabla 10).

**5 Análisis**

Los parámetros recomendados del procesos simultáneo en los frascos rodantes se esbozan en la Tabla 16. Solamente se testaron parámetros diana y se consideraron por si eran críticos o no críticos para el proceso. Las definiciones son como sigue: Parámetros críticos son aquellos parámetros que son críticos para los atributos de calidad del producto final y parámetros no críticos son aquellos parámetros que se pueden controlar directamente dentro del intervalo definido o que tienen un amplio intervalo operativo, de modo que una desviación desde el punto establecido no es crítica. Parámetros no críticos ayudan a controlar los parámetros críticos dentro del intervalo definido.

**Tabla 16:** Sumario de los parámetros del proceso simultáneo en frascos rodantes para EU PRRS 94881 MLV.

Parámetro	Límite Inferior Testado	Límite Superior Testado	Intervalo aceptable	Diana	Crítico/No Crítico
MOI	0,005	0,1@	0,005 -0,3y	0,10	NC
Densidad de siembra de células por cada frasco rodante	7 x 10 <sup>6</sup> células	2,0 x 10 <sup>7</sup> células n°	7,0 x 10 <sup>6</sup> células a 2,0 x 10 <sup>7</sup> células	1,0 x 10 <sup>7</sup> células	NC
Tiempo de la 1 <sup>a</sup> Recolección (Días post-infección)	Día 5	Día 7	Día 5 – Día 7 PI	Día 5 – 7 PI	Crítico **
Temperatura	NE	37°C	36 + 1°C	36 °C	NC
Tiempo de 2 <sup>a</sup> Recolección (Días post re-alimentación)	Día 2	Día 2	NE	2	Crítico
Tiempo de 3 <sup>a</sup> Recolección (Días post re-alimentación)	Día 2	Día 2	2-3	2	Crítico

15 \*\* El criterio de primera-Recolección se decide por el tiempo del consumo completo de dextrosa en el periodo de 5-7 días PI.

# basado en el proceso convencional en frascos rodantes

@ testado en la escala del biorreactor de 30 L, 300 L y frasco rodante

& testado en la escala del biorreactor de 30 L

**20 Conclusiones**

El desarrollo del proceso simultáneo en frasco rodante se consiguió con éxito y es equivalente al proceso en biorreactor descrito anteriormente en términos de potencia medida como TCID50/mL. Los parámetros críticos para R-I, R-II y R-III en el objetivo se reprodujeron con éxito en el proceso simultáneo en frascos rodantes.

25 Las realizaciones preferidas para el proceso simultáneo en frascos rodantes para EU PRRS 94881 MLV son como sigue para la propagación del virus, RECOLECCIÓN-I: La composición del medio MEM con 1,4 g/L de bicarbonato de sodio; Células de siembra a 1 x 10<sup>7</sup> / frasco rodante de 850 cm<sup>2</sup> Corning con 400 mL de medio suplementado con 20 mL de suero bovino fetal al 5% v/v (intervalo: 7 x10<sup>6</sup> - 2 x10<sup>7</sup> /frasco rodante); Temperatura controlada a 36 ± 1°C; la velocidad de sacudidor del frasco rodante es 0,5 RPM; y la MOI diana es 0,1.

30 Para el criterio de recolección-I, comenzar el muestreo para las mediciones de dextrosa fuera de línea el día 5 PI. La Recolección-I debería realizarse cuando la dextrosa es ≤ 0,1 g/L, lo cual ocurre habitualmente entre los 5-7 días PI. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, re-alimentar primero RECOLECCIÓN II.

**II. Primera Re-Alimentación- RECOLECCIÓN-II**

5 Re-alimentar con 400 mL de composición de medio MEM, y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 20 mL de suero de bovino fetal (al 5% v/v). Realizar la re-alimentación bajo las mismas condiciones que el primer ajuste del medio de recolección (véanse los parámetros de primera recolección anteriores). El control de la temperatura ha de permanecer en un punto establecido de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . La velocidad de sacudidor del frasco rodante es 0,5 RPM. La segunda recolección de fluidos virales se produce el día 2 post-re-alimentación.

**III. Segunda Re-Alimentación - RECOLECCIÓN-III:**

10 Re-alimentar con 400 mL de composición de medio MEM, neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 20 mL de suero de bovino fetal irradiado (al 5% v/v). Realizar la re-alimentación bajo las mismas condiciones que el ajuste del medio de la primera recolección (véanse los parámetros de la segunda recolección anteriores). El control de la temperatura ha de permanecer en un punto establecido de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . La velocidad de sacudidor del frasco rodante es 0,5 RPM. La tercera recolección de fluidos virales se produce el día 2 post-re-alimentación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que comprende:
  - 5 a) al mismo tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PRRSV en un biorreactor e infestar dichas células de mamífero con un PRRSV;
  - b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección;
  - c) llevar a cabo una primera etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;
  - d) reponer el medio en dicho biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días;
  - 10 e) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;
  - f) reponer el medio en dicho biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días; y
  - g) llevar a cabo una tercera etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado.
- 15 2. El método de la reivindicación 1 que comprende, además, al menos una etapa de re-alimentación y de recolección subsiguientes a la tercera etapa de recolección, que comprende reponer el medio en dicho biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días, y realizar una cuarta etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislando del mismo el virus propagado.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la multiplicidad de infección (MOI) diana es 0,01 a 0,30.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células de mamífero se siembran a una densidad de aproximadamente  $7 \times 10^8$  a  $1,0 \times 10^9$  por biorreactor de 300 L.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha densidad de siembra de células es aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  por biorreactor de 300 L.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha infección es con aproximadamente  $7 \times 10^8$  partículas de virus por biorreactor de 300 L.
7. El método de la reivindicación 1, que comprende vigilar la concentración de dextrosa de dicho medio, en el que dicha primera etapa de recolección se realiza el primer día cuando la concentración de dextrosa del medio disminuye a menos de 0,1 g/L.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha segunda recolección se realiza 1 ó 2 días post-re-alimentación con medio.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha tercera recolección se realiza 1 a 4 días post la segunda re-alimentación con medio.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo se añade al biorreactor el día antes o el mismo día antes de la adición de dicha línea de células de mamífero y dicho PRRS.
- 35 11. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo se añade al biorreactor un día antes de la adición de dicha línea de células de mamífero y dicho PRRS.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la temperatura de dicho biorreactor se ajusta entre 34°C y 38°C.
13. El método de la reivindicación 1, en el que dicho medio comprende suero de ternero fetal irradiado al 5% v/v.
- 40 14. El método de la reivindicación 1, en el que dicho PRRS se selecciona del grupo consistente en la cepa de PRRSV ECACC 11012501, ECACC 11012502, VR 2332, la cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo los Números de Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, N° de Acceso ante CNCM I-1140, N° de Acceso ante CNCM I-1387, N° de Acceso ante CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 o ECACC V93070108; depósito ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495;
- 45 ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.
15. Un método de producción a escala comercial para la preparación de un PRRSV, que comprende:
  - a. una siembra simultánea tanto de células de mamífero permisivas a la infestación por dicho PRRSV como de

dicho PRRSV en un biorreactor que contiene un medio adecuado para el crecimiento de dichas células; y

b. realizar tres etapas consecutivas de recolección, en donde se recolecta PRRSV, en donde, después de cada una de las primera y segunda recolecciones, se repone el medio, y en donde:

- 5
- i. la primera recolección se realiza el primer día en el que la concentración de dextrosa del medio desciende a menos de 0,1 g/L;
  - ii. la segunda recolección se realiza 1 ó 2 días después de la adición del medio tras la primera recolección; y
  - iii. la tercera recolección se realiza entre 1 y 4 días después de la adición del medio tras la segunda recolección.

10 16. Un método para la producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que comprende:

a) al mismo tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PRRSV en frascos rodantes e infestar dichas células de mamífero con un PRRSV;

b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección;

15 c) llevar a cabo una primera etapa de recolección separando el medio de dicho frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado;

d) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días;

e) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio de dicho frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado;

20 f) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días; y

g) llevar a cabo una tercera etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado.

FIG 1

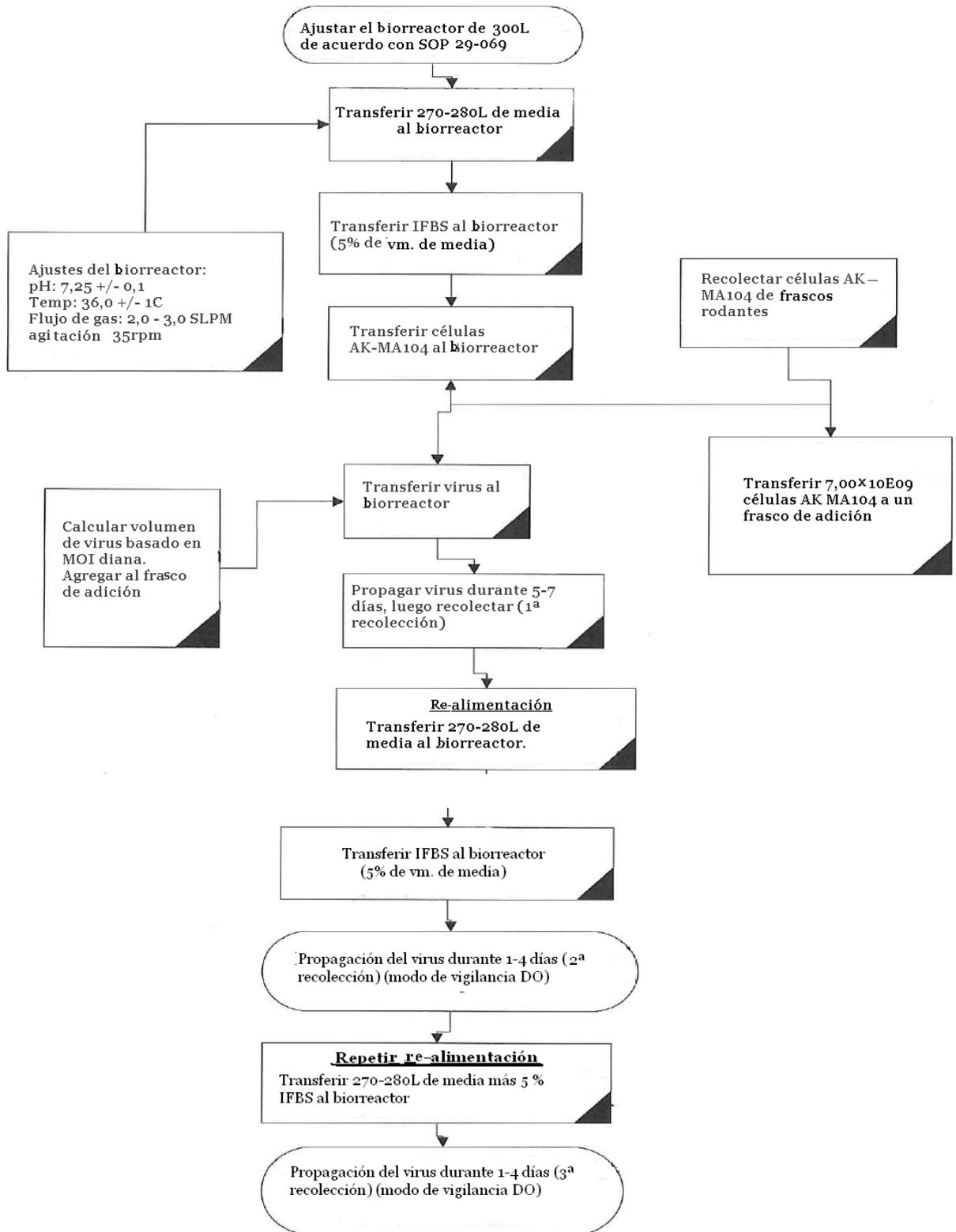


FIG 2

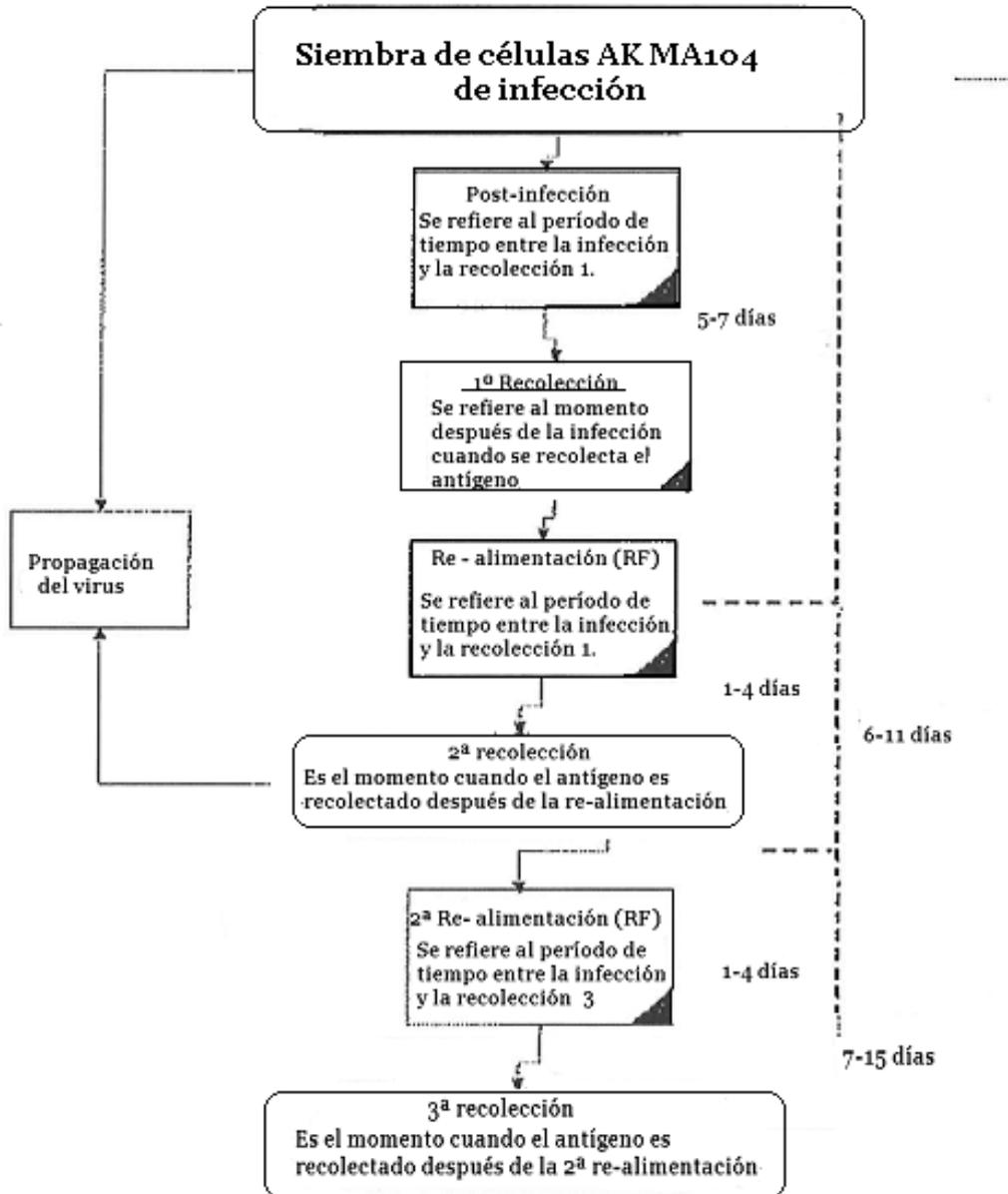


FIG 3

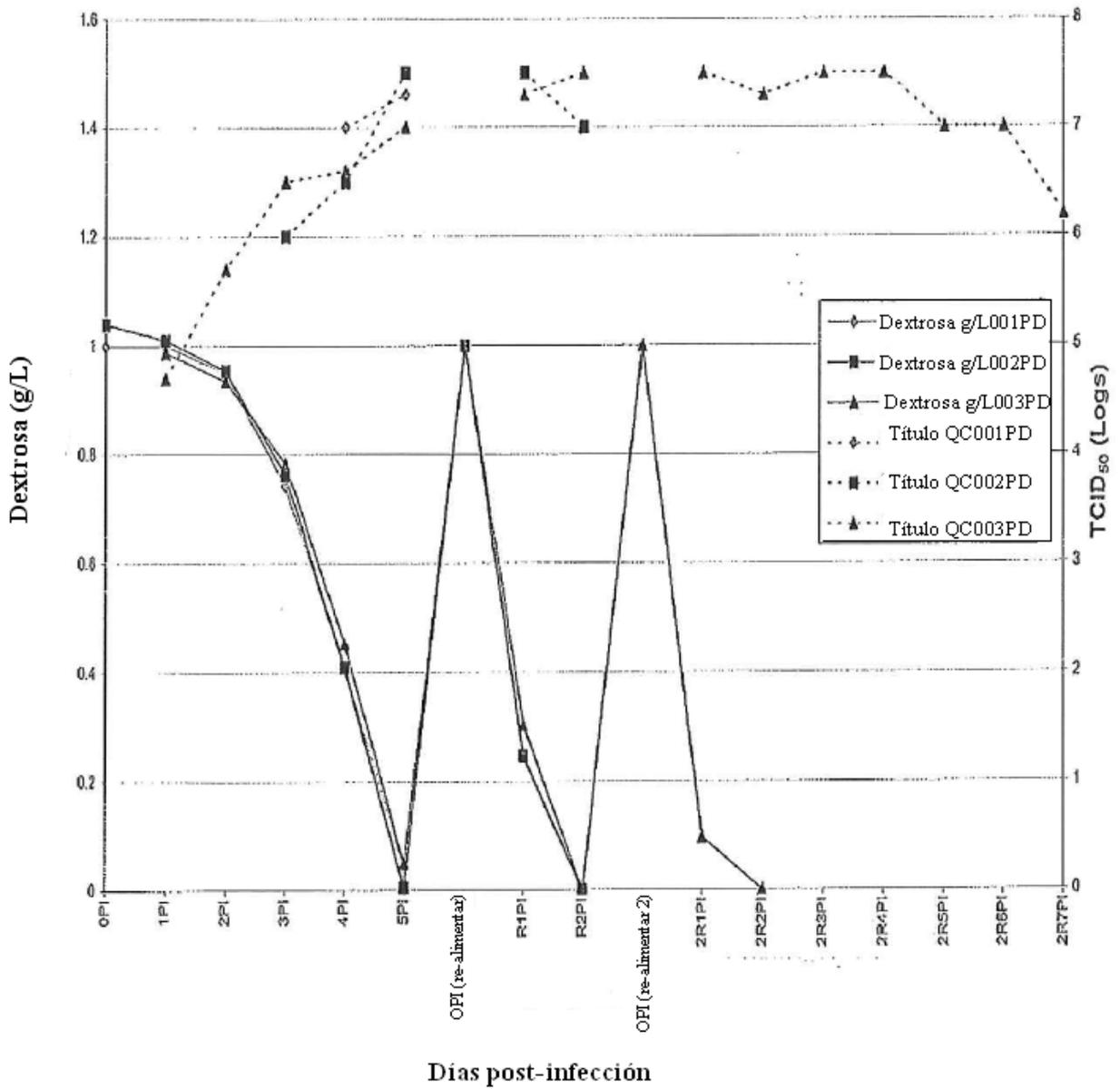


FIG 4

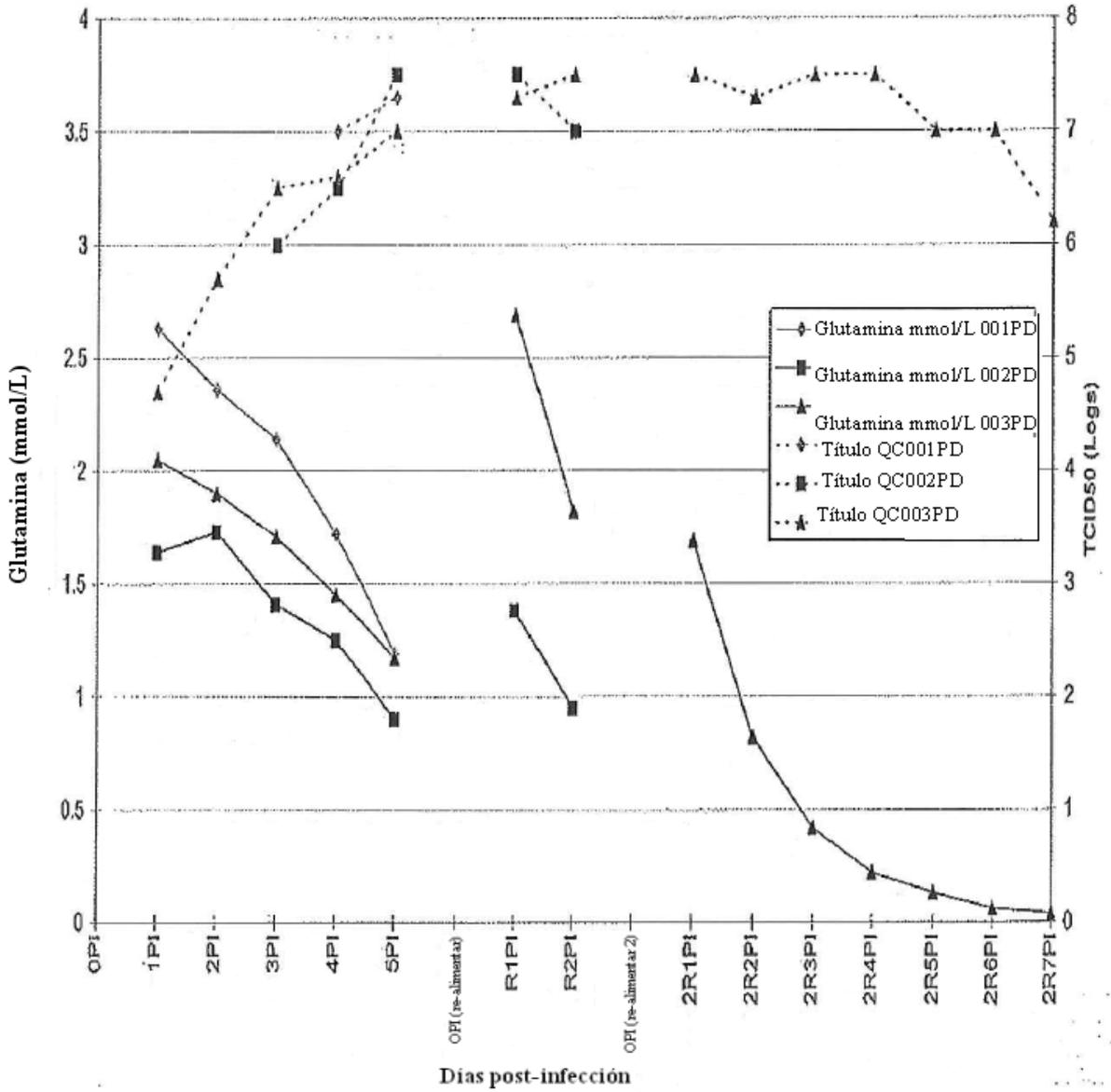


FIG 5

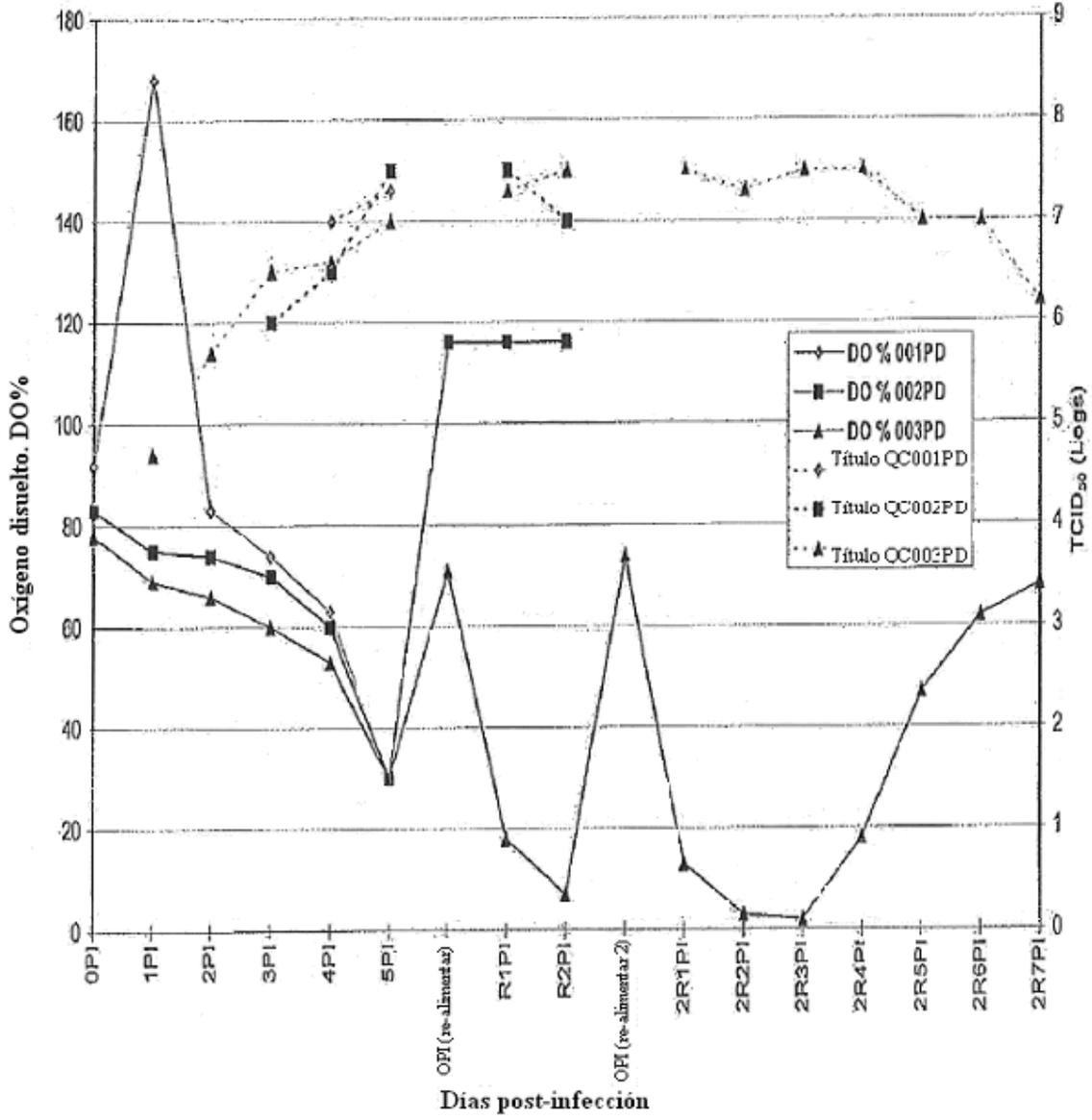


FIG 6

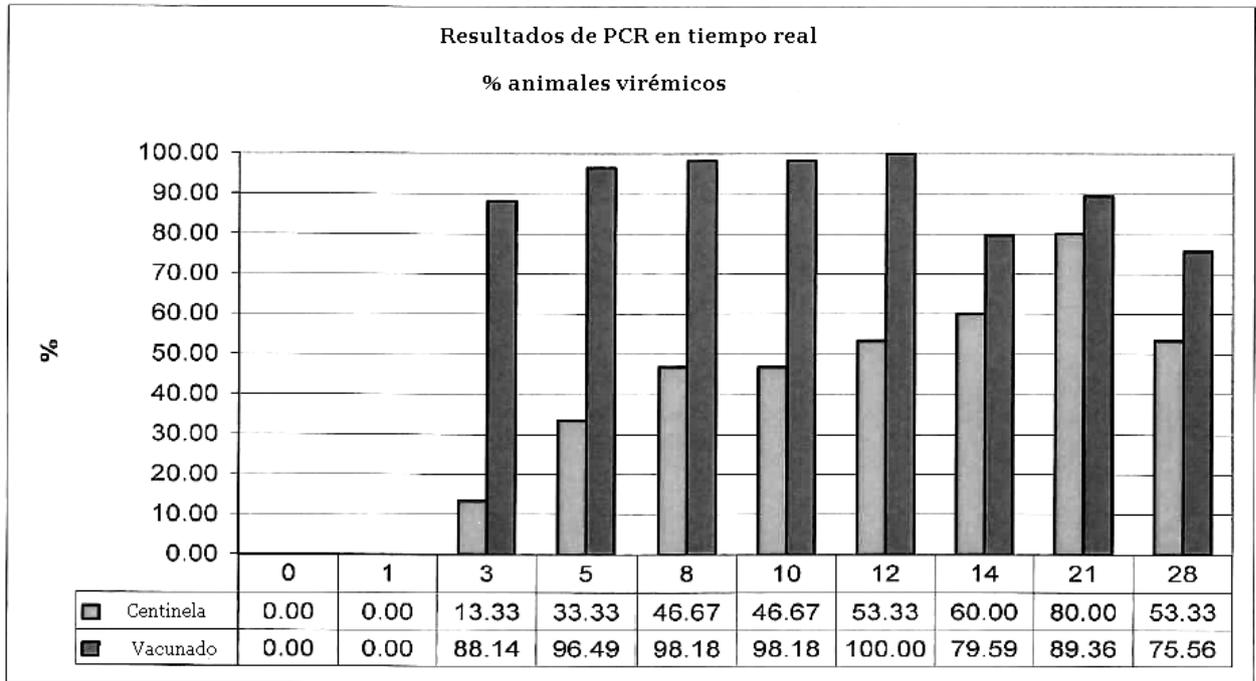


FIG 7

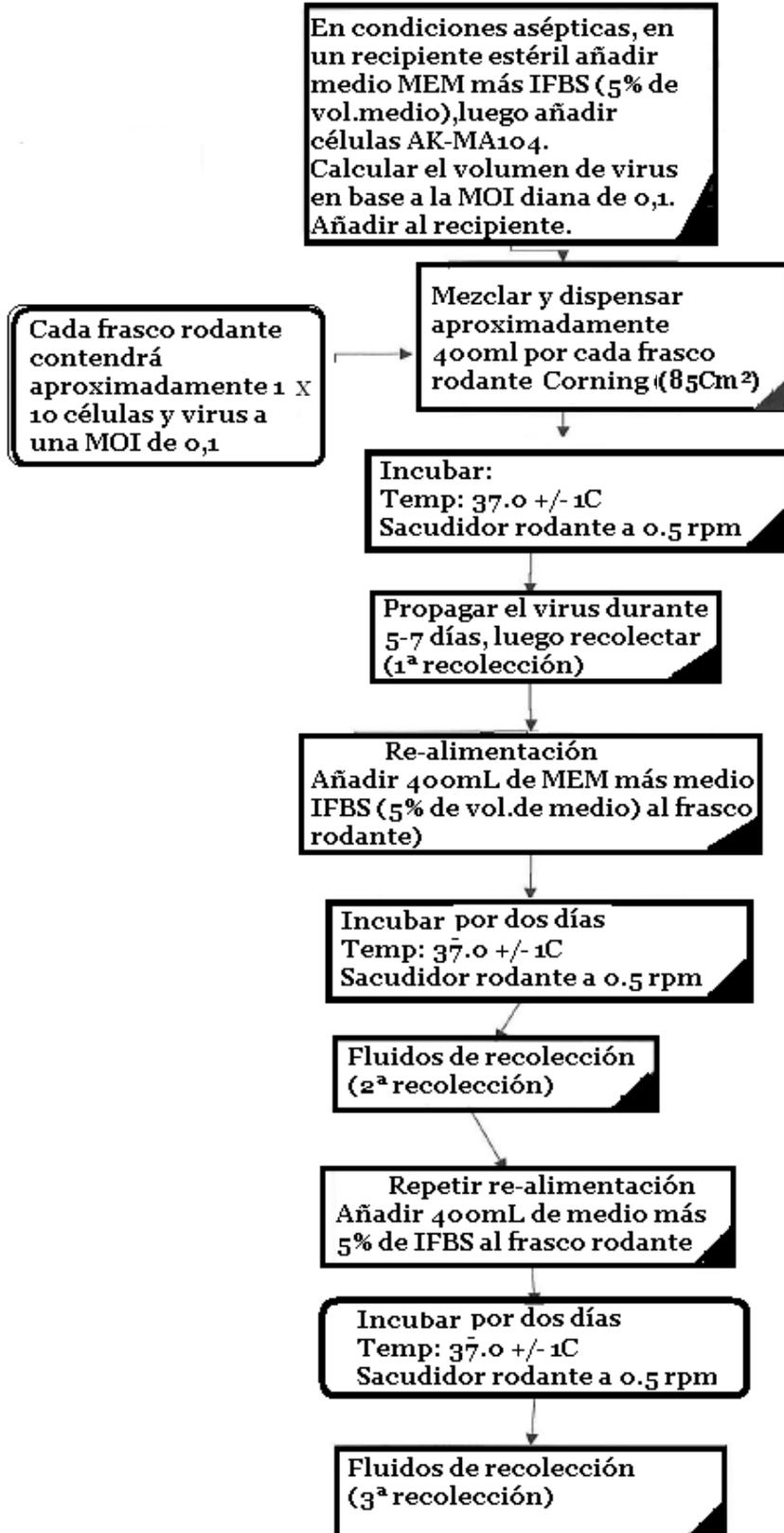


FIG 8

