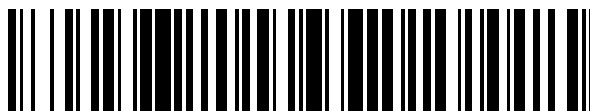


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 959**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2010.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2006 E 06743284 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 1874918**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de vacunas virales en líneas de células madre derivadas de embriones aviares en suspensión**

30 Prioridad:

**11.04.2005 FR 0503583**  
**21.10.2005 US 728807 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.01.2016**

73 Titular/es:

**VALNEVA (100.0%)**  
**70, rue Saint-Jean de Dieu**  
**69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**MEHTALI, MAJID;**  
**CHAMPION-ARNAUD, PATRICK y**  
**LEON, ARNAUD**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 555 959 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 de fabricación de vacunas virales en líneas de células madre derivadas de embriones aviares en suspensión

**Campo de la invención**

5 La presente invención trata del desarrollo y fabricación de vacunas virales. En particular, la invención trata del campo de la producción industrial de vectores y vacunas virales, más en particular del uso de células aviares, preferiblemente de líneas de células madre derivadas de embriones de pollo, para la producción de vectores virales y virus. La invención es particularmente útil para la producción industrial de vacunas virales para prevenir la infección viral de humanos y animales.

**10 Antecedentes de la invención**

La vacunación colectiva sería el enfoque más simple y efectivo para controlar pandemias virales, como brotes de gripe en un periodo pandémico e interpandémico, y también para prevenir una amenaza bioterrorista, como los recientes actos terroristas con ántrax en los EEUU. Sin embargo, para muchas vacunas virales como las vacunas contra la gripe y la viruela que se producen actualmente en sistemas basados en huevos, es más probable que la capacidad de producción actual de los fabricantes de vacunas no sea suficiente para cubrir las necesidades en caso de una pandemia o ataque bioterrorista.

A intervalos imprevisibles, y además de la epidemia de gripe leve estacional causada por una evolución o reagrupación antigénica, surgen cambios antigénicos con subtipos del virus de la gripe completamente nuevos para los cuales no existe inmunidad en la población humana. Causan pandemias globales que se extienden rápidamente por todo el mundo. Tres de estas pandemias tuvieron lugar en el último siglo (1918, 1957, 1968). La más grave en 1918, infectó aproximadamente al 50% de la población mundial, de los que el 25% padeció una enfermedad clínica; el índice de mortalidad total se estimó entre 20 y 40 millones, particularmente afectando a personas en la mejor etapa de su vida. Esta pandemia redujo el crecimiento de la población durante los siguientes diez años. El último brote con un alto índice de mortalidad y potencial de pandemia ocurrió en 1997, cuando un nuevo virus de la gripe (H5N1) emergió en Hong Kong, llevando a la muerte a un tercio de los pacientes afectados, principalmente adultos jóvenes. Afortunadamente, el virus no pudo extenderse de persona a persona y el brote se pudo detener rápidamente. Un virus similar se aisló en 2003 en Hong Kong. En los EEUU, se espera que el impacto de la próxima pandemia sea de 18 a 42 millones de consultas ambulatorias, 314.000 a 734.000 hospitalizaciones y 89.000 a 207.000 muertes, asumiendo que la próxima pandemia será de una magnitud similar a la de la pandemia de 1957 o a la de 1968, y no como la pandemia de 1918 (Meltzer MI, Cox NJ y Fukuda K. The economic impact of pandemic influenza in the United States: priorities for intervention. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5:659–671). Extrapolando este impacto previsto proporcionalmente a la población mundial, la estimación bruta del impacto global de la próxima pandemia puede ser de 1.000 a 2.000 millones de casos de gripe, 5,3 a 12,3 millones de casos de enfermedad grave y 1,5 a 3,5 millones de muertes.

Además de una posible pandemia, la epidemia de gripe anual causada por variantes evolucionadas de los virus A y B de la gripe infectan aproximadamente del 10 al 20% de la población cada estación, y causan enfermedades con fiebre, hospitalizaciones y muertes. Se han utilizado métodos estadísticos indirectos para calcular la carga total de la gripe; entre los cuales se incluyen varios modelos estadísticos que cuantifican el aumento estacional de la morbilidad y mortalidad durante periodos de epidemia de gripe (Simonsen L, Clarke MJ, Williamson GD, Stroup DF, Arden NH, Schonberger LB. The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index. *Am J. Public Health* 1997; 87:1944–1950). Utilizando esta metodología, una estación promedio de gripe en los EEUU se asocia actualmente a 25 a 50 millones de casos de gripe, 150.000 hospitalizaciones y 20.000 a 40.000 muertes. Asumiendo que el riesgo específico de la edad de morbilidad de la gripe es similar al de los EEUU, la carga mundial promedio anual de gripe inter-pandémica puede estar en el orden de aproximadamente 1.000 millones de casos de gripe, aproximadamente 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave y 250.000 a 500.000 muertes (véase el informe de la OMS, Ginebra, abril 2003: State of the art of new vaccines Research & Development - Initiative for Vaccine Research).

Las vacunas contra la gripe actualmente disponibles son eficaces para la prevención de enfermedades relacionadas con la gripe inter-pandémica y son muy eficaces en cuanto a la prevención de hospitalizaciones y muertes. A pesar de estos resultados, en países desarrollados y en vías de desarrollo, no llega a la “población de alto riesgo”, en parte debido al precio relativamente alto de la vacuna y a la necesidad de re-vacunación anual. Sin embargo, muy recientemente, el uso de la vacuna contra la gripe ha comenzado a aumentar en todo el mundo hasta alcanzar aproximadamente 235 millones de dosis en 2003, pero hay todavía una brecha considerable entre la demanda de la vacuna pandémica y la producción de la vacuna actual. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay aproximadamente 1.200 millones de personas en “alto riesgo” de padecer brotes de gripe graves (mayores de 65 años de edad, bebés, niños, adultos con problemas crónicos de salud, trabajadores de asistencia sanitaria, etc.).

55 El sistema actual basado en huevos utilizado para producir las vacunas contra la gripe autorizadas, a pesar de ser fiable durante más de 50 años, tiene sus limitaciones que son:

- un procedimiento de fabricación largo, complicado y que consume recursos que requiere la obtención y control de calidad de grandes cantidades de huevos para cada campaña de producción individual. Este sistema actual de

producción basado en huevos no promueve a otras empresas farmacéuticas a entrar en el negocio de vacunas contra la gripe derivadas de huevos porque el margen de ganancias posibles es demasiado estrecho;

- 5 • la necesidad de seleccionar qué cepas de virus estarán en la vacuna al menos 6 meses antes de la estación de la gripe. Esta decisión temprana sobre qué cepas se deben incluir en la vacuna contra la gripe no será siempre la correcta y el largo plazo de producción necesario para producir la vacuna hace que sea imposible la acción correctiva en una etapa intermedia del procedimiento.
- 10 • la necesidad de producir las suficientes vacunas contra la gripe cada año para cumplir con la demanda en continuo crecimiento (aproximadamente 250 millones de dosis en países industrializados en 2004, aproximadamente 100 millones de dosis para los EEUU únicamente). La reciente insuficiencia de vacunas contra la gripe en los EEUU durante el invierno 2004–2005 debido a una contaminación en la planta en el Reino Unido de un fabricante de vacunas contra la gripe derivadas de huevos realza este tema. Además, la capacidad de producción mundial actual de la vacuna contra la gripe no es suficiente para cubrir partes de la población mundial en “alto riesgo”. En realidad, es discutible si la infraestructura mundial puede encargarse de la distribución y entrega oportuna de la vacuna contra la gripe pandémica;
- 15 • los requisitos de cientos de millones de huevos de pollo fertilizados para fabricar la vacuna con los riesgos asociados del suministro insuficiente de huevos en casos de infecciones epidémicas en los grupos de pollo donantes;
- la necesidad en casos de virus contra la gripe vivos atenuados para utilizar costosos huevos de pollo exentos de patógenos específicos (SPF);
- los costes inflacionarios asociados con el uso de suero bovino que procede de países libres de BSE;
- 20 • la alergenicidad de los componentes derivados de huevos en algunos individuos;
- la incapacidad de utilizar huevos para la propagación de virus que son muy virulentos y letales para las aves.

Además, la tecnología actual en vacunas produce vacunas con un reducido espectro de producción y es, por lo tanto, más probable que las vacunas disponibles en reserva protejan contra una cepa pandémica del virus de la gripe completamente nueva.

25 De forma alternativa, la amenaza bioterrorista se ha convertido en una gran preocupación para numerosos gobiernos de países occidentales en estos últimos años, como los recientes actos terroristas con ántrax. El gobierno de los Estados Unidos está tomando medidas apropiadas para un rápido diagnóstico, defensa y reacción frente a los ataques biológicos a través de la implementación de la “Bioterrorism Preparedness and Response Act” (ley de respuesta y preparación sobre el bioterrorismo) en 2002. Las armas biológicas son relativamente accesibles y, para las organizaciones bioterroristas, constituyen una forma económica y eficaz de amenazar y atemorizar a la población y a los gobiernos. En particular, el uso del virus contra la viruela como arma biológica ha aumentado en los últimos años y numerosos países han desarrollado planes de emergencia para enfrentarse a dicho riesgo.

35 Se considera que la viruela tiene el potencial más alto para causar un daño generalizado en caso de una diseminación deliberada, seguida por la peste, ántrax y botulismo. La viruela se declaró erradicada en 1980 y todos los países del mundo han quitado desde entonces los programas de vacunación contra la viruela. Esto ha conducido a una reducción constante de la inmunidad de la población a la infección viral, convirtiendo al virus contra la viruela en un agente aún más peligroso en caso de una emisión bioterrorista. El Centro para el Control de Enfermedades de los EEUU (CDC) ha clasificado a la viruela como un agente bioterrorista de clase A, es decir, entre los microorganismos más peligrosos dada su fácil propagación y alto índice de mortalidad.

40 Una vacunación colectiva rápida sería el enfoque ideal para controlar un brote de viruela. El gobierno de los EEUU ha tomado la iniciativa asegurando una preparación madre adicional de la vacuna, vacunando al personal militar y a los principales trabajadores de asistencia sanitaria y estableciendo un programa para el desarrollo de una vacuna segura que pudiera ser administrada a toda la población sin importar el estado de salud de los habitantes. Otros gobiernos están observando el progreso de los EEUU así como evaluando la preparación de emergencia de sus países.

45 En el pasado, los gobiernos estaban adquiriendo o produciendo sus propias preparaciones madre de primera generación en laboratorios del gobierno o convocando licitaciones comerciales. Las vacunas de primera generación que se recogieron directamente de los animales demostraron ser eficaces; sin embargo, con frecuencia contenían impurezas y bacterias, lo que aumenta enormemente la posibilidad de reacciones adversas y complicaciones especialmente en individuos con inmunidad comprometida. Desde la erradicación de la viruela, una cantidad limitada de empresas farmacéuticas pudo intervenir rápidamente y producir vacunas contra la viruela. De ese grupo aún una menor cantidad pudo producir vacunas de segunda generación utilizando Dryvax<sup>®</sup> y las cepas vaccinia Lister–Elstree en cultivos celulares cualificados según los estándares de buenas prácticas de fabricación. Sin embargo, como ocurrió con la primera generación, estas vacunas tampoco fueron adecuadas para los individuos con inmunidad comprometida. Una vacunación colectiva con vacunas de la primera y segunda generación podría causar 50 complicaciones que llevarían a la muerte a uno de cada millón de individuos y que causarían enfermedades graves en 55 10 veces más casos. Por lo tanto, aún una menor cantidad de empresas farmacéuticas ha desarrollado una vacuna de

tercera generación más segura. Las vacunas de tercera generación se basan en una cepa del virus vaccinia ankara modificado (MVA) utilizada durante la campaña de erradicación de la viruela en Alemania en los años 70. En ensayos clínicos, se administró el MVA sin efectos secundarios significativos a aproximadamente 150.000 individuos, incluyendo muchos considerados en riesgo para la vacunación contra la viruela convencional.

5 Todas estas vacunas contra la viruela se producen en fibroblastos derivados de embriones de pollo primarios aislados de los embriones de pollo. Estos sistemas de producción se relacionan con numerosas limitaciones graves, incluyendo:

- un procedimiento de fabricación largo, complicado y que consume recursos que requiere la obtención y control de calidad de grandes cantidades de huevos o CEF para cada campaña de producción individual;

10 - la necesidad en muchos casos de utilizar costosos embriones de pollo exentos de patógenos específicos (SPF);

- los riesgos del suministro insuficiente de huevos en casos de infecciones epidémicas en los grupos de pollos donantes;

- los costes inflacionarios asociados con el uso de suero bovino que procede de países libres de BSE;

- la alergenicidad de los huevos en algunos individuos;

15 - la incapacidad de utilizar huevos para la propagación de virus que son muy virulentos y letales para las aves.

Aunque el procedimiento de producción basado en huevos y CEF sigue siendo un procedimiento relativamente fiable, un sistema eficaz de producción basado en células representaría una mejora importante en el suministro de un método más rápido, más económico y menos complicado para producir virus. Además, en el caso de una pandemia de gripe, un procedimiento de fabricación basado en un cultivo celular ofrece ventajas adicionales:

20 - la producción de la vacuna contra la gripe puede comenzar inmediatamente después de que se haya identificado, aislado y distribuido la cepa pandémica;

- no hay necesidad de esperar el desarrollo de los llamados agrupadores de alto crecimiento (virus adaptados a un crecimiento de alto rendimiento en huevos de gallinas embrionados) necesarios para la producción de huevos;

25 - la disponibilidad del lote de la primera vacuna sería de aproximadamente 9 semanas después de la recepción de la cepa, en lugar de 6 a 9 meses con el procedimiento derivado de huevos;

- un procedimiento derivado de células permite la producción de cepas que no pueden crecer adecuadamente en huevos (por ejemplo, la gripe aviar de Hong Kong en 1997);

- no hay problema de escasez de huevos durante una pandemia;

30 Además, el uso de líneas de células para la fabricación de vacunas virales, en lugar de huevos o plataformas CEF, tendría las siguientes ventajas adicionales con relación a la seguridad de la vacuna: no hay aditivos antibióticos presentes en la formulación de la vacuna; no se necesitan conservantes tóxicos (como tiomersal); niveles de endotoxinas reducidos, no existe el problema de la alergia a los huevos; crecimiento en medios sin proteínas ni suero (sin agentes adventicios/BSE), gran pureza de la preparación de la vacuna contra el virus.

35 Existe, por lo tanto, una necesidad urgente de mejorar las actuales tecnologías de producción de vacunas virales basadas en huevos o fibroblastos derivados de embriones de pollo. El desarrollo de plataformas de cultivos celulares como alternativa a los sistemas de producción de huevos y CEF para la fabricación de vacunas virales es probablemente la solución más rápida y prometedora para superar los actuales problemas en la producción de la vacuna y restricciones de tiempo. Además, las tecnologías de producción de cultivos celulares mejorarían las posibilidades de aumentar de escala las capacidades de producción de la vacuna ante un ataque pandémico o terrorista.

40 Tomando como base estos requisitos específicos, el inventor ha aprovechado su experiencia en la biología aviar y en las células madre embrionarias (ES) aviares para emprender el desarrollo de nuevas líneas de células aviares estables que permiten la replicación eficiente de vacunas para uso veterinario y humano y candidatos de vacunas, y que cumplen con las especificaciones industriales, reguladoras y médicas. Utilizando un procedimiento patentado (véase WO 03/076601 y WO 05/007840), el inventor ha generado de esta manera una serie de líneas de células bien caracterizadas y documentadas (las células EBx®) que se obtienen a partir de células ES de pollo sin etapas de inmortalización genética, química o viral. Las células EBx® se han generado utilizando un procedimiento en 2 etapas completamente documentado, y teniendo en cuenta los requisitos reguladores:

Etapa 1: Aislamiento, cultivo in vitro y expansión de las células ES de pollo:

50 Las células madre embrionarias son únicas porque: (i) se pueden auto-renovar indefinidamente *in vitro* como células indiferenciadas, (ii) tienen capacidad regenerativa ilimitada, (iii) mantienen un contenido cromosómico estable; (iv) expresan altos niveles de telomerasa y marcadores de superficie celular específicos. A pesar de los numerosos

esfuerzos en todo el mundo, las células ES se han aislado con éxito sólo de un número muy limitado de especies (ratón, ser humano, monos). El inventor ha dedicado recursos significativos durante los últimos años a aislar y establecer células ES de varias especies aviares. Dichos esfuerzos de investigación condujeron al aislamiento y caracterización con éxito de las células ES de pollo [Pain et al. 1999. Cell Tissues Organs 165: 212–219]. El inventor desarrolló entonces procedimientos patentados que permiten el cultivo eficiente *in vitro* y la expansión a gran escala de células ES de pollo sin inducción de diferenciación.

Paso 2: Derivación de células EBx®:

Después, el inventor estableció un procedimiento patentado para derivar líneas de células estables adherentes y en suspensión a partir de células ES de pollo. El procedimiento incluye la retirada progresiva del suero, células alimentadoras y factores de crecimiento del medio de cultivo celular y la adaptación de las células a un cultivo en suspensión. Estas líneas de células de pollo derivadas de embriones mantuvieron la mayoría de las características deseables de las células ES (es decir, proliferación indefinida, expresión de marcadores específicos de ES tales como la telomerasa, estabilidad del cariotipo) pero además mostraron nuevas características “que favorecen a la industria” (crecimiento en suspensión en medios sin suero).

Tomando como base sus propiedades biológicas atractivas, el inventor seleccionó algunas líneas de células EBx® de pollo para un mayor desarrollo, como las líneas de células adherentes EB45 (también llamadas S86N45 en WO 03/076601 y WO 05/007840), a partir de las cuales se ha originado la línea de células en suspensión EB14. Más preferiblemente, las células aviares EBx® de la invención se seleccionan entre las líneas de células EB45 y EB14. En una realización más preferida, la línea de células de pollo EBx® es la EB14 o su subclón EB14–074. Para hacerlo más sencillo, la EB14 y la EB14–074 se llamarán en la presente memoria EB14. Las células EB45 y EB14 muestran un fenotipo de células madre embrionarias (es decir, una alta proporción núcleo–citoplasma) en un cultivo a largo plazo (>150 subcultivos). Las células EB45 y EB14 son células pequeñas con un gran núcleo y nucleolo, y presentan pequeños pseudópodos que se extienden desde la membrana plasmática (Figura 1). Las células EB45 y EB14 son muy activas metabólicamente, y presentan un citoplasma rico en mitocondrias y ribosomas. Un análisis genético de células EB45 y EB14 mostró que son masculinas, diploides y genéticamente estables a lo largo de las generaciones (Figura 2). Las células EB45 y EB14 expresan fosfatasa alcalina, marcadores de superficie celular específicos de células madre, tales como EMEA–1 y SSEA–1 (Figura 5) y el gen ENS1 específico de células ES (Figura 4). De particular importancia, las células EB45 y EB14 también expresan altos niveles de actividad enzimática de telomerasa, que se mantienen estables a lo largo de los subcultivos (Figura 3). La telomerasa es una enzima clave porque promueve el continuo crecimiento celular y estabilidad cromosómica. Un análisis de tumorigenicidad de tres semanas y 2,5 meses realizado en el modelo de rata recién nacida inmunosuprimida mostró que las células EB14 no son tumorigénicas *in vivo*. Las células EB45 y EB14 se caracterizan por un tiempo muy corto de generación de aproximadamente 16 horas a 39°C (la temperatura corporal del pollo) y aproximadamente 20h a 37°C. Estas líneas de células presentan, por lo tanto, propiedades únicas que las hacen sustratos celulares más eficientes, seguros y rentables para la producción industrial de vacunas virales tales como las vacunas contra la gripe y la viruela.

Las células EBx®, y más específicamente las células EB14 de la invención tendrían un gran valor para la fabricación de vacunas contra la gripe y viruela así como también otras importantes vacunas virales para seres humanos y animales (Tabla 1) actualmente producidas en huevos embrionados o en fibroblastos primarios de pollo, tales como sarampión, paperas, vacunas contra la fiebre amarilla o poxvirus en investigación contra enfermedades infecciosas como VIH o cánceres. Los datos actuales ya han demostrado la capacidad de la línea de células EBx®, y más específicamente para replicar varios virus recombinantes y de tipo salvaje. Por ejemplo, experimentos preliminares han establecido que las células EBx® soportan la replicación del virus de la gripe (véase la solicitud de patente del documento de prioridad francés FR 05 03583 presentado el 11 de abril de 2005, Ejemplo 3, páginas 30 a 41) y virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) (véase WO 05/007840).

**Tabla 1:**

	AVIAR	PORCINO	EQUINO	HUMANO	RECOMBINANTE
	virus de la gripe	virus de la gripe	virus de la gripe	Viruela	Viruela del canario
5	reovirus		Encefalomiелitis equina del este	virus de la gripe	Viruela aviar
	virus de la viruela aviar		Encefalomiелitis equina del oeste	virus del sarampión	Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA)
	viruela del canario			Virus de las paperas	Alfavirus-Virus sinbis
	viruela del pollo			Rabia	Alfavirus-Virus del Bosque de Semliki
	virus herpes de la psitacinos			Virus de la fiebre amarilla	Alfavirus-EEV de Venezuela
10	Virus de la Enfermedad de Newcastle			Encefalitis transmitida por garrapatas	Adenovirus Aviar-CELO
	virus herpes del halcón				
	virus herpes de la paloma				
	virus de la bursitis infecciosa				
15	virus de bronquitis infecciosa				
	Virus de la enfermedad de Marek				
	virus herpes del pavo				
	virus de la anemia del pollo				
20	virus de la encefalomiелitis aviar				
	poliomavirus tipo I y II				
	Adenovirus tipo I, II y III				

25 Las propiedades únicas enumeradas anteriormente de las células EBx®, y más específicamente las células EB14, implican el desarrollo de un procedimiento específico para la fabricación de vacunas virales en las células EBx®. De hecho, sin vinculación a una teoría, el alto nivel metabólico de las células EBx® requiere que el medio de cultivo celular proporcione la energía suficiente a las células con el fin de asegurar el crecimiento celular y la replicación viral. El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento de fabricación innovador y eficiente basado en las células madre derivadas de embriones aviares EBx®, más específicamente las células EB14, para la producción industrial de vacunas virales que actualmente se producen en huevos y en CEF.

**Descripción**

La presente invención proporciona un procedimiento de replicación de un virus en células madre derivadas de embriones aviares EBx®, más preferiblemente en células EB14, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 35 - infección de un cultivo celular de EBx con un virus de interés; cultivándose preferiblemente dichas células EBx en medio sin suero animal;
- cultivo de células EBx infectadas con el fin de replicar dicho virus;
- recogida del virus en el sobrenadante del cultivo celular y/o en el interior de dichas células.

Según una realización preferida, dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 40 a) proliferación de dichas EBx®, más preferiblemente las células EB14, en un recipiente de cultivo, en suspensión, en un medio sin suero N°1, en el que se deja que dichas células se agreguen entre sí para formar agrupaciones celulares

durante al menos dicha etapa de proliferación, y en el que dichas agrupaciones celulares no se rompen por centrifugación y dichas células se subcultivan por dilución en un recipiente de cultivo mayor;

b) infección de dichas células con el virus seleccionado cuando la densidad celular es de al menos 1,5 millones de células/ml;

5 c) poco antes de la infección, simultáneamente a la infección, o poco después de la infección adición al cultivo celular de medio sin suero N°2; y

d) cultivo adicional de dichas células infectadas con el fin de permitir la replicación del virus; y

e) opcionalmente, recogida de dicho virus.

10 El término "virus" como se utiliza en el presente documento incluye no sólo a los virus naturales sino también a los virus atenuados, virus agrupadores, cepas de vacunas así como también virus recombinantes y vectores virales, etc. Los virus de la invención se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en adenovirus, hepadnavirus, virus herpes, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, picornavirus, poxvirus, reovirus y retrovirus.

15 En una realización preferida, los virus, vectores virales relacionados, partículas virales y vacunas virales pertenecen a la familia de poxvirus, y más preferiblemente a la de cordopoxviridae. En una realización, el virus o los vectores virales relacionados, las partículas virales y las vacunas virales son un avipoxvirus seleccionado entre el virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario (es decir, ALVAC), virus de la viruela del junco, virus de la viruela de los mainates, virus de la viruela de las palomas, virus de la viruela de los psitacinos, virus de la viruela de las codornices, virus de la viruela de los gorriones, virus de la viruela de los estorninos pintos, virus de la viruela de los pavos. Según otra realización preferida, el virus es un virus vaccinia seleccionado entre la cepa del virus vaccinia Lister–Elstree, virus vaccinia modificado como el virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) que se pueden obtener de la ATCC (ATCC Número VR-1508), NYVAC (Tartaglia et al., 1992 Virology 188: 217–232), LC16m8 (Sugimoto y Yamanouchi 1994 Vaccine 12:675–681), CVI78 (Kempe et al., 1968 Pediatrics 42: 980–985) y otros virus vaccinia recombinantes y no recombinantes.

25 En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y las vacunas virales pertenecen a la familia de ortomixovirus, en particular a la del virus de la gripe. El virus de la gripe se selecciona del grupo que consiste en el virus de la gripe humana, virus de la gripe aviar, virus de la gripe equina, virus de la gripe porcina, virus de la gripe felina. El virus de la gripe se selecciona preferiblemente entre las cepas A, B y C. Entre las cepas A, se pueden enumerar virus con diferentes subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa, tal como sin limitación H1N1, H2N2, H3N2, H4N2, H4N6, H5N1, H5N2, H7N7 y H9N2. Entre las cepas H1N1, se pueden enumerar A/Porto Rico/8/34, A/New Caledonia/20/99, A/Beijing/262/95, A/Johannesburg/282/96, A/Texas/36/91, A/Singapore. Entre las cepas H3N2, se pueden enumerar A/Panama/2007/99, A/Moscow/10/99, A/Johannesburg/33/94. Entre las cepas B, se pueden enumerar sin limitación B/Porto Rico/8/34, B/Johannesburg/5/99, B/Vienna/1/99, B/Ann Arbor/1/86, B/Memphis/1/93, B/Harbin/7/94, N/Shandong/7/97, B/Hong Kong/330/01, B/Yamanashi/166/98. El virus de la gripe de la invención se selecciona entre los virus de tipo salvaje, aislado viral primario obtenido de un individuo infectado, virus recombinante, virus atenuado, virus sensible a la temperatura, virus adaptado a las bajas temperaturas, virus agrupador, retrovirus modificado con ingeniería genética.

40 Cuando el virus de la invención es el virus de la gripe, el procedimiento de la invención comprende la etapa adicional de añadir la enzima proteolítica en el medio de cultivo en condiciones que permiten la propagación del virus. La enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en tripsina, quimotripsina, termolisina, pepsina, pancreatina, papaína, pronasa, subtilisina A, elastasa, furina y carboxipeptidasa. Según una realización preferida, la enzima es la tripsina. La concentración final de tripsina en el medio de cultivo celular está comprendida entre aproximadamente 0,5 a 1 mg/ml hasta 25 mg/ml. Más preferiblemente, la concentración final de tripsina en el medio de cultivo celular está comprendida entre 0,01 a 10 usp/ml (usp: unidad farmacopea de EEUU), preferiblemente aproximadamente entre 0,05 a 2 usp/ml, más preferiblemente aproximadamente entre 0,3 a 1 usp/ml. Preferiblemente, la enzima proteolítica es una proteína recombinante producida en un huésped procariota.

45 En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y las vacunas pertenecen a la familia de paramixovirus, en particular el virus del sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las papeas y virus de la rubéola.

50 En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y las vacunas virales pertenecen a la familia de birnavirus, en particular el virus de la bursitis infecciosa.

Los virus recombinantes incluyen, pero no se limitan a, los vectores virales que comprenden un gen heterólogo. En algunas realizaciones, la célula huésped EBx®, un virus auxiliar o un plásmido auxiliar proporcionan una función o funciones auxiliares para la replicación de los virus. Los vectores representativos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que infectarán las células aviares o de mamíferos.

55 El término «aviar» como se utiliza en el presente pretende referirse a toda especie, subespecie o raza de organismos de la clase taxonómica «*ava*», tal como, pero no limitado a, organismos tales como pollos, pavos, patos, gansos,

5 codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos, avestruces, emúes y casuaris. El término incluye las diferentes cepas de *Gallus gallus* (gallo rojo) o pollos (por ejemplo, Leghorn blanco, Leghorn marrón, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Minorca, Amrox, gris de California, Italian Partridge-colored) así como también cepas de pavos, faisanes, codornices, patos, avestruces y demás aves de corral que se crían habitualmente. En una realización preferida, la célula aviar de la presente invención es una célula de pollo.

10 El recipiente de cultivo de la invención se selecciona más preferiblemente entre un biorreactor tipo tanque con agitación continua, biorreactor Wave™, biorreactor Bello™, matraz centrifugador, matraz y una fábrica celular. Típicamente, las células se aumentan de escala desde un vial del banco de células de principal o de trabajo a través de varios tamaños de matraces T o frascos rotativos y, preferiblemente, finalmente en biorreactores. La suspensión celular resultante se alimenta luego generalmente en un biorreactor de producción de siembras (típicamente 20 a 30 L de volumen) para un cultivo adicional y, en algunas realizaciones, en un biorreactor de mayor producción (típicamente 150 a 180L de volumen). La proporción del volumen del segundo biorreactor (más grande) con respecto al biorreactor de siembra depende del grado al que se propagó la línea de células en el primer biorreactor, pero es típicamente de 3:1 a 10:1, por ejemplo, en el intervalo de (6 a 8): 1. Según una realización preferida, el recipiente de cultivo es un  
15 biorreactor tipo tanque con agitación continua que permite el control de la temperatura, aireación, pH y otras condiciones controladas y que está equipado con:

- entradas apropiadas para introducir las células, oxígeno estéril, varios medios de cultivo, etc.
- salidas para quitar las células y medios; y
- medios para agitar el medio de cultivo en el biorreactor.

20 Según la presente invención, un "medio sin suero" (SFM) se refiere a un medio de cultivo celular listo para su uso, es decir, que no requiere la adición de suero permitiendo la supervivencia de las células y crecimiento de las células. Este medio está necesariamente definido químicamente y puede contener hidrolizados de varios orígenes, por ejemplo de plantas. Preferiblemente, dichos SFM están cualificados como "no de origen animal", es decir que no contienen componentes de origen animal o humano (estado FAO: "sin origen animal"). En los SFM, las proteínas de suero  
25 nativas se sustituyen por proteínas recombinantes. Alternativamente, un medio SFM según la invención no contiene proteínas (medio PF: "medio sin proteínas") y/o están químicamente definidos (medio CDM: "medio definido químicamente"). Los medios SFM tienen numerosas ventajas: (i) la primera de todas es el cumplimiento regulador de dichos medios (de hecho, no hay riesgo alguno de contaminación por agentes adventicios como BSE, virus); (ii) la optimización del procedimiento de purificación; (iii) la mejor reproducibilidad en el procedimiento debido al medio mejor definido. Los ejemplos de medios SFM disponibles en el mercado son: VP SFM (InVitrogen Ref 11681-020, catálogo 2003), Opti Pro (InVitrogen Ref 12309-019, catálogo 2003), Episerf (InVitrogen Ref 10732-022, catálogo 2003), Pro 293 S-CDM (Cambrex ref 12765Q, catálogo 2003), LC17 (Cambrex Ref BESP302Q), Pro CHO 5-CDM (Cambrex ref 12-766Q, catálogo 2003), HyQ SFM4CHO (Hyclone Ref SH30515-02), HyQ SFM4CHO-Utility (Hyclone Ref SH30516.02), HyQ PF293 (Hyclone ref SH30356.02), HyQ PF Vero (Hyclone Ref SH30352.02), medio Ex cell 293  
30 (JRH Biosciences ref 14570-1000M), medio sin proteínas Ex cell 325 PF CHO (JRH Biosciences ref 14335-1000M), medio Ex cell VPRO (JRH Biosciences ref 14560-1000M), medio sin suero Ex cell 302 (JRH Biosciences ref 14312-1000M), Ex cell 65319 (JRH Biosciences), Ex cell 65421 (JRH Biosciences), Ex cell 65625 (JRH Biosciences), Ex cell 65626 (JRH Biosciences), Ex cell 65627 (JRH Biosciences), Ex cell 65628 (JRH Biosciences), Ex cell 65629 (JRH Biosciences), medio para terapia génica 3 (sin componentes animales) (SIGMA-Aldrich, ref. G-9916) (de ahora en adelante llamado medio G9916).  
40

Según la primera realización preferida, el medio sin suero N°1 y el medio sin suero N°2 son el mismo medio.

Según una segunda realización preferida, el medio sin suero N°1 y el medio sin suero N°2 tienen una composición diferente. Por ejemplo, el medio sin suero N°1 es Excell 65319 (SAFC Biosciences) y el medio Opti Pro (InVitrogen Ref 12309-019, catálogo 2003) puede ser el medio sin suero N°2.

45 Según una realización preferida, el medio sin suero N°1 es Ex cell 65319 (JRH Biosciences). Según una segunda realización preferida, el medio sin suero N°1 es Ex cell 65421 (JRH Biosciences).

Según una realización preferida, el medio sin suero N°2 es Ex cell 65319 (JRH Biosciences). Según una segunda realización preferida, el medio sin suero N°2 es G9916 (SIGMA-Aldrich).

50 El procedimiento de la invención engloba la retirada de todo o de una parte del medio sin suero 1, seguido por su sustitución por el medio sin suero N°2. Sin embargo, es más conveniente retirar una fracción sustancial (por ejemplo, hasta aproximadamente el 50%) del medio sin suero 1 y luego reponerla con el medio sin suero N°2 mientras se está aún retirando el medio 1, por ejemplo, a través del filtro rotatorio. Según una realización preferida, el medio sin suero N°2 se añade directamente al medio sin suero N°1 sin retirar una parte del medio sin suero N°1. Se añaden entre 0,25 a 10 volúmenes de medio sin suero N°2 a 1 volumen del medio sin suero N°1. En una realización preferida, se añaden  
55 aproximadamente entre 0,5 a 8 volúmenes de medio sin suero N°2 a 1 volumen de medio sin suero N°1. En una realización más preferida, se añaden aproximadamente entre 3 a 6 volúmenes de medio sin suero N°2 a 1 volumen de medio sin suero N°1.



El medio sin suero N<sup>o</sup>1 y/o el medio sin suero N<sup>o</sup>2 se complementa(n) con al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, colesterol, carbohidratos, hidrolizados proteicos de origen no animal y una mezcla de ellos.

5 Alternativamente, el procedimiento de la invención es un procedimiento de alimentación discontinua que comprende la etapa adicional de alimentar las células con al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, lípidos, carbohidratos, hidrolizados proteicos de origen no animal, tensioactivo y una mezcla de ellos. Según una primera realización preferida, la alimentación se realiza durante las etapas a) a d), alternativamente sólo durante las etapas b) a d), o alternativamente sólo durante las etapas d). La alimentación puede realizarse bien diariamente o continuamente. Cuando la alimentación es discontinua, la alimentación puede realizarse una vez al día, más de una vez al día, o menos de una vez al día.

Los medios SFM de la invención comprenden varios ingredientes, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, fuentes de carbohidratos, estando presente cada ingrediente en una cantidad que soporta el cultivo de una célula *in vitro*. Sin embargo, con el fin de mejorar el crecimiento celular o productividad viral, se añaden ingredientes adicionales a los medios SFM.

15 La elección del o de los aminoácidos que se añadirán al cultivo celular se puede determinar mediante un análisis del consumo de aminoácidos por parte de las células del cultivo. Según una realización preferida, los aminoácidos añadidos al medio se seleccionan del grupo que consiste en asparagina y glutamina o una mezcla de ellas. En una realización más preferida, se añade glutamina y la alimentación de glutamina se realiza durante la etapa a) a d) para mantener la concentración de glutamina en el medio entre aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM y lo más preferiblemente aproximadamente 2 mM. En una realización preferida, la alimentación de glutamina se realiza en forma continua.

20 Según una realización preferida, los carbohidratos añadidos al medio se seleccionan del grupo que consiste en D-glucosa, D-sacarosa y D-galactosa o una mezcla de ellas. Según una realización más preferida, el carbohidrato añadido es la D-glucosa. La alimentación de D-glucosa se realiza durante la etapa a) a d), más preferiblemente entre b) a d) para mantener la concentración de D-glucosa en el medio entre aproximadamente 0,5g/l a 25g/l de D-glucosa, preferiblemente entre aproximadamente 1 g/l a 10 g/l de D-glucosa, preferiblemente aproximadamente 2 a 3 g/l de D-glucosa. En una realización preferida, la alimentación de la D-glucosa se realiza en forma continua.

25 Según una realización preferida, los lípidos se seleccionan del grupo que consiste en colesterol, esteroides y ácidos grasos como ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y sus derivados o una mezcla de ellos. Más preferiblemente, los ácidos grasos son de SIGMA-ALDRICH (Ref. F7050) y se añade aproximadamente 0.35 ul/ml de disolución de ácidos grasos al medio de cultivo.

Según una realización preferida, los hidrolizados proteicos de origen no animal se seleccionan del grupo que consiste en triptona de bacterias, triptona de levadura, hidrolizados de plantas, como hidrolizados de soja o una mezcla de ellos. En una realización preferida, los hidrolizados proteicos de origen no animal es el hidrolizado de levadura.

35 El término "hidrolizado" incluye una digestión enzimática de peptona de soja o extracto de levadura. El hidrolizado se puede obtener de una variedad de preparaciones de peptona de soja o extracto de levadura, respectivamente, que se pueden digerir de forma enzimática adicionalmente (por ejemplo, con papaína) y/o formar mediante autólisis, termólisis y/o plasmólisis. Los hidrolizados también pueden obtenerse en el mercado, como Yeastolate, Hy-Soy, Hy-Yeast 412 y Hi-Yeast 444, de fuentes como JRH BioSciences (Lenaxa, KA), Quest International (Norwich, N.Y.), OrganoTechnie S.A. (Francia) o Deutsche Hefewerke GmbH (Alemania). Las fuentes de extractos de levadura también se describen en WO 98/15614. Las fuentes de extractos de levadura e hidrolizados de soja también se describen en WO 00/03000. Los hidrolizados utilizados en medios de la invención se purifican preferiblemente a partir de una fracción cruda, porque las impurezas que pudieran interferir con un cultivo eficiente se eliminan preferiblemente durante esta purificación, mejorando así la consistencia del hidrolizado. La purificación se puede realizar por ultrafiltración o cromatografía Sephadex (por ejemplo, con Sephadex G25, Sephadex G10 o materiales equivalentes), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía "de fase inversa". Preferiblemente, la purificación se realiza mediante ultrafiltración utilizando un filtro con un punto de corte de 10kDa. Estos procedimientos son conocidos en el campo. Utilizando estos métodos, se pueden seleccionar fracciones que contengan hidrolizados de soja o levadura de peso molecular definido. Preferiblemente, los pesos moleculares promedio de los hidrolizados de soja y levadura están preferiblemente entre aproximadamente 220 y 375 daltons.

40 Preferiblemente, el hidrolizado de levadura está presente en el medio de cultivo celular. El hidrolizado de levadura 50X (aproximadamente 200 g/l) obtenido por ejemplo de JRH-BIOSCIENCES (Ref 58902) está presente en el medio de cultivo celular en una concentración final comprendida entre aproximadamente 0,1X a 2X, preferiblemente aproximadamente 0,5X a aproximadamente 1X en el medio de cultivo. También se puede añadir el hidrolizado de soja al medio de cultivo celular. El hidrolizado de soja 50X obtenido por ejemplo de JRH-BIOSCIENCES (Ref 58903100M) se añade a una concentración final comprendida entre aproximadamente 0,1X a 2X, preferiblemente aproximadamente 1X en el medio de cultivo. Alternativamente, se puede añadir una mezcla de hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura al medio de cultivo celular como se describe en US 2004/0077086.

El medio puede contener sustancias auxiliares, como sustancias reguladoras de pH como bicarbonato de sodio, estabilizantes de oxidación, estabilizantes para contrarrestar tensión mecánica o inhibidores de proteasa. En caso de ser necesario, un tensioactivo no iónico, como polipropilenglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108) se puede añadir al medio como un antiespumante. Estos agentes se utilizan generalmente para proteger a las células de los efectos negativos de la aireación ya que, sin añadir un agente tensioactivo, las burbujas de aire que ascienden y estallan pueden producir daños en aquellas células que se encuentran en la superficie de dichas burbujas de aire ("burbujeo"). La cantidad de agente tensioactivo no iónico está preferiblemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 10 g/L, típicamente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 g/L. Según otra realización de la invención, la concentración de agente tensioactivo en el medio de cultivo celular puede disminuir para aumentar el tamaño de los paquetes celulares.

Según una realización de la invención, la adición del medio sin suero N° 2 al cultivo celular se realiza después de la etapa de infección b), preferiblemente entre aproximadamente 0,5 a 4 horas después de la etapa b) y más preferiblemente aproximadamente 1 hora después de la etapa b). Según otra realización de la invención, la adición del medio sin suero N° 2 al cultivo celular se realiza antes de la etapa de infección b), preferiblemente entre aproximadamente 0,5 a 4 horas después de la etapa b), y más preferiblemente aproximadamente 1 hora antes de la etapa b). Según otra realización de la invención, la adición del medio sin suero N° 2 al cultivo celular se realiza simultáneamente a la etapa b de la infección.

La infección viral de la etapa b) se realiza a una m.o.i (multiplicidad de infección) de aproximadamente  $10^{-6}$ , preferiblemente aproximadamente  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  y más preferiblemente aproximadamente  $10^{-4}$ . El experto en la materia determinará la m.o.i óptima según el tipo de virus.

En la etapa c), las células infectadas son preferiblemente cultivadas durante al menos 24h, al menos 48h, al menos 72h, al menos 96h, al menos 120h, al menos 144h. Cuando el virus es un poxvirus, las células infectadas se cultivan al menos 144 h.

En el procedimiento de la invención, el cultivo celular de la etapa a) se lleva a cabo mediante un cultivo discontinuo, cultivo discontinuo repetido, cultivo por alimentación discontinua o cultivo de perfusión. Más preferiblemente, el cultivo celular de la etapa a) se realiza mediante cultivo por alimentación discontinua. La infección en la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es al menos aproximadamente 4 millones, preferiblemente 6 millones de células/ml, más preferiblemente 8 millones de células/ml en el procedimiento discontinuo o por alimentación discontinua. Cuando se usa un procedimiento de perfusión, la infección en la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es de al menos 8 millones de células/ml, preferiblemente aproximadamente 9 a 10 millones de células/ml o incluso más.

El pH del medio de cultivo sin suero de las etapas a), b), c) y d) se controla preferiblemente con el biorreactor. El pH estará en un intervalo de 6,5 a 7,8, preferiblemente aproximadamente 6,8 a 7,5 y más preferiblemente aproximadamente 7,2.

En el procedimiento de la invención, la etapa d) tiene una duración de 2 a 10 días antes de la recogida. Según una realización preferida, la etapa d) tiene una duración de 3 a 7 días antes de la recogida.

El cultivo celular se realiza a una temperatura comprendida entre 32°C a 39°C dependiendo del tipo de virus. Para la producción del virus de la gripe, la infección del cultivo celular se realiza preferiblemente a 33°C.

Las células EBx® tienen la capacidad de crecer en un cultivo en suspensión con células agrupadas en agregados sueltos de pocas células, hasta más de cientos de células. Sin estar vinculado a ninguna teoría, el tamaño de las agrupaciones puede variar según la composición del medio de cultivo celular. Por ejemplo, la presencia de un agente tensioactivo como el polipropilén glicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108) y la agitación pueden tener un efecto sobre el tamaño de las agrupaciones. El inventor ha descubierto ahora que el rendimiento viral puede incrementarse permitiendo que las células EBx® de la invención se agreguen entre sí para formar agrupaciones durante al menos la etapa a) del procedimiento. Durante el aumento de escala desde el vial del banco de células principal o de trabajo a través de varios tamaños de matraces T o frascos rotativos a los biorreactores, las células en suspensión se subcultivan generalmente a un recipiente más grande, ya sea por dilución en medio fresco o por centrifugación seguida de resuspensión del sedimento celular en un medio fresco. El inventor ha descubierto que durante los subcultivos celulares, se recomienda tener grandes agrupaciones celulares en el cultivo. Para esto, es mejor no fragmentar las agrupaciones celulares con el fin de mejorar la replicación del virus en células EBx®. Por ejemplo, durante las fases iniciales del cultivo de la etapa a) en matraces T o frascos rotativos, se recomienda diluir el cultivo celular para subcultivar las células en un recipiente o recipientes más grandes y no se recomienda centrifugar ni fragmentar las agrupaciones celulares mediante pipeteo o agitación. Sin embargo, los grupos demasiado grandes pueden ser subóptimos para una gran producción viral. Según una realización preferida, los poxvirus, y preferiblemente los virus MVA, ALVAC y de la viruela aviar se obtienen a partir de un procedimiento de la invención que incluye la etapa a) de la proliferación de EBx® en agrupaciones en agregados sueltos de pocas células, hasta más de al menos cien células, al menos doscientas células, al menos quinientas células, al menos mil o miles de células.

La presente invención también es apropiada para otros tipos de células utilizadas para propagar virus como, pero sin limitarse a, fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), células VERO, PerC6, MDCK y que son capaces de crecer en suspensión como agrupaciones celulares.

La invención posibilita la obtención de un virus por un procedimiento de la invención.

5 La presente invención posibilita la obtención de una vacuna que contiene el virus. El procedimiento de fabricación de una vacuna viral comprende el procedimiento de replicación de un virus según la invención donde la etapa e) de la recogida del virus está comprendida por al menos una etapa seleccionada entre el filtrado, concentración, congelación y estabilización, añadiendo un agente estabilizador. La recogida del virus se realiza según las tecnologías conocidas por el experto en la materia. Según una realización preferida, la etapa de recogida de dicho virus comprende  
10 la recogida del sobrenadante del cultivo celular obtenido a partir de la centrifugación del cultivo celular, luego filtración, concentración, congelación y estabilización de la preparación del virus, añadiendo el agente estabilizador. Por ejemplo, para el virus de la gripe, véase Furminger, En Nicholson, Webster y Hay (Eds) Textbook of influenza, capítulo 24 pág. 324–332.

15 El procedimiento de fabricación de una vacuna viral según la invención también puede comprender la etapa adicional de la inactivación del virus recogido. La inactivación se realiza preferiblemente mediante tratamiento con formaldehído, beta-propiolactona, éter, éter y detergente (es decir, como Tween 80™), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y Tritón N102, desoxicolato sódico y tri(N–butil)fosfato.

Según otra realización, la invención posibilita la realización de procedimiento de preparación de proteínas antigénicas virales del virus, dicho procedimiento comprende las etapas adicionales de:

20 a) opcionalmente, la incubación del sobrenadante del cultivo celular que comprende el virus completo con una enzima de restricción de ácido desoxirribonucleico, preferiblemente ADNasas (véase la clasificación EC3.1.21 y EC3.1.22) y nucleasas (véase la clasificación EC3.1.30 y EC3.1.31). Preferiblemente, la enzima de digestión de ADN es la benzonasa (nucleasa Benzon) o ADNasa I;

25 b) adición de detergente catiónico. Los ejemplos de detergentes catiónicos son, sin limitarse a: sal de cetiltrimetilamonio como CTAB, sal de miristil–trimetil amonio, lipofectina, DOTMA y Tween™;

c) aislamiento de proteínas antigénicas. Esta última etapa puede realizarse mediante centrifugación o ultrafiltración.

30 El virus en la vacuna puede estar presente ya sea como partículas del virus intactas o como partículas del virus desintegradas. Según una realización, la vacuna es una vacuna muerta o inactiva. Según otra realización, la vacuna es una vacuna viva atenuada en la que dicha vacuna principalmente comprende el sobrenadante del cultivo celular EBx que se obtiene a partir del procedimiento de la invención, preferiblemente sin suero, opcionalmente filtrado y/o concentrado y comprendiendo dicho virus. Según una tercera realización, la vacuna está compuesta por proteínas antigénicas virales que se obtienen a partir de un virus.

La invención también posibilita proporcionar una vacuna que comprende una línea de células infectadas EBx®, preferiblemente EB14, y donde las línea de células infectadas EBx®, preferiblemente EB14, se recogen en la etapa d).

35 La vacuna de la invención puede estar comprendida por el virus en combinación con sustancias farmacéuticamente aceptables que aumentan la respuesta inmune. Los ejemplos sin limitaciones de sustancias que aumentan la respuesta inmune comprenden adyuvante de Freund incompleto, saponina, sales de hidróxido de aluminio, lisolecitina, polioles plutónicos, polianiones, péptidos, bacilo Calmette–Guerin (BCG) y *corynebacterium parvum*. Un ejemplo de un adyuvante sintético es el QS–21. Además, pueden usarse proteínas inmuno-estimulantes (interleuquinas II1, II2, IL3, IL4, IL12, IL13, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos,...) para incrementar la respuesta  
40 inmune de la vacuna.

La vacuna es preferiblemente una formulación líquida, una preparación congelada, una preparación deshidratada y congelada, opcionalmente adaptada a una vía de administración intranasal.

45 La vacuna se utiliza preferiblemente para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un ser humano infectado con un virus seleccionado de los virus de la viruela y gripe, sarampión, paperas y rubéola. La vacuna viral recombinante también puede utilizarse para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades crónicas como el cáncer o de enfermedades infecciosas como el SIDA.

50 Las líneas de células EBx® son útiles para generar y producir el virus reagrupado. Se puede reagrupar el virus con un genoma segmentado, como el virus de la gripe. Al infectar simultáneamente las células EBx® de la invención con al menos dos cepas diferentes del virus de la gripe, una mezcla de genoma segmentado de dos cepas diferentes está presente en la misma célula huésped. Durante el ensamblaje del virus, teóricamente se pueden generar todas las combinaciones de segmentos genómicos. De esta manera, se pueden aislar virus reagrupados específicos mediante la selección o eliminación, con un anticuerpo por ejemplo, de un virus con un rasgo deseado (véase Kilbourne E.D en Plotkin SA y Mortimer E.A. Eds, Vaccines 1994).

Las líneas de células EBx® también son útiles para generar y producir el virus de la gripe mediante genética de reversión (véase Enami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3802–3805 (1990); Enami y Palese, J. Virol. 65:2511–2513 (1991); Luytjes, Cell 59:1107–1113 (1989)).

La invención también describe la composición de diagnóstico que contiene virus o constituyentes del mismo.

- 5 Los ejemplos a continuación explican la invención con más detalle. Las siguientes preparaciones y ejemplos se presentan para que los expertos en la materia entiendan más claramente y pongan en práctica la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones ejemplificadas, que tienen como objetivo ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención únicamente, y los métodos que son funcionalmente equivalentes o varias modificaciones de la invención además de las descritas en la presente memoria
- 10 serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y de los dibujos adjuntos. Para el resto de la descripción, se hará referencia a las leyendas de las figuras siguientes.

## **FIGURAS**

### **FIGURA 1: Análisis mediante microscopio electrónico de transmisión de células EB14**

- 15 Las células EB14 presentan una morfología típica de células madre embrionarias (es decir, un alto índice núcleo–citoplasma) que se asemeja al fenotipo de las células madre embrionarias murinas (mES). Las células EB14 son células pequeñas y redondeadas con un gran núcleo y nucleolo con un pequeño pseudópodo que se extiende desde la membrana plasmática. Son muy activas metabólicamente con un citoplasma rico en mitocondrias y ribosomas. La morfología celular de las células EB14 es diferente a la de los fibroblastos embrionarios de pollo (CEF).

### **FIGURA 2: Análisis del cariotipo de las células EB14 en los subcultivos 105 y 118**

- 20 El análisis de células EB14 cultivadas en un medio sin suero hasta los subcultivos 105 y 118 confirmó la naturaleza diploide de las células, con la presencia de 18 macrocromosomas y 30 microcromosomas (panel superior). Este resultado concuerda con los números de cromosomas esperados para células de pollo (panel inferior).

### **FIGURA 3: Expresión de telomerasa en células EB14**

- 25 Se investigó la expresión de telomerasa en células EB14 cultivadas en un medio sin suero en diferentes subcultivos utilizando el kit de detección de telomerasa de Roche (Telomerase OCR ELISA). Se encontró que la telomerasa estaba altamente expresada en las células EB14. El alto nivel de expresión de telomerasa se mantiene a lo largo de los subcultivos, como se muestra en el subcultivo 89, en el subcultivo 160 (que corresponde al banco de células principal de células EB14) y en el subcultivo 179 (que corresponde al final de los subcultivos de producción). Las líneas de células MDCK caninas se utilizan como control negativo y no expresan telomerasa. Se encontró una ausencia similar
- 30 de expresión de telomerasa para las células CEF (datos no presentados).

### **FIGURA 4: El gen ENS1 se expresa en las células EB14**

- 35 Se describió que el gen ENS1 se expresaba específicamente en las células ES de pollo (Adoque et al., Mech Dev. 103, p79–91, 2001). Su expresión en las células EB14 se evaluó mediante RT–PCR. Se encontró que las células madre embrionarias aviares (células ES), las células embrionarias aviares recogidas en la oviposición y las células EB14 en varios subcultivos (P21, P159, P160) expresan fuertemente el gen ENS1 mientras que la línea de células aviares DF1 (US 5.672.485) y los fibroblastos embrionarios aviares (CEF) no expresan este gen. El análisis del gen GAPDH de mantenimiento se realiza en paralelo en las mismas muestras para controlar la presencia de ARN (panel inferior).

### **FIGURA 5: Expresión de los marcadores específicos de las células ES en la línea de células EB14 (panel izquierdo) y la línea de células DF1 (panel derecho)**

- 40 Las células EB14 expresan los genes EMEA1 y SSEA1 mientras que las células DF1 no lo hacen. El gen de la paxilina es un gen ubicuo utilizado como control. Las células EB14 no expresan los marcadores celulares TROMA–1, MeIM, TRA–1–60 y SSEA3.

### **FIGURA 6: Expresión en la superficie celular de los receptores SA 2–3 y SAa2–6 en líneas de células EB14 y MDCK**

- 45 Las células se incuban con lectinas etiquetadas con digoxigenina: la lectina aglutinina de Sambuca nigra se une específicamente a Sia2–6Gal, mientras que la lectina aglutinina de Maackia amurensis se une específicamente a Sia2–3Gal. Las lectinas que se unen a células se revelan con el anticuerpo anti-digoxigenina etiquetado con FITC según técnicas muy conocidas para el experto en la materia. Las células etiquetadas con FITC se enumeran con un separador de células fluorescente (FACS). Las moléculas SAα2–3 y SAa2–6 se describen como los receptores de los
- 50 virus de la gripe aviar y humana, respectivamente.

### **FIGURAS 7A y 7B: Cinética del crecimiento de células EB14 en un biorreactor con alimentación discontinua de 3L**

Figura 7A: se dejó que se acumulara la biomasa derivada de EB14 a 37°C en un medio de crecimiento celular complementado con 0,5X de Yeastolate hasta que se alcance una densidad celular de 5 a  $6 \cdot 10^6$  células/mL. Luego, se diluyó la mezcla 2,9, veces y se realizó un seguimiento de la cinética del crecimiento celular durante un periodo de 10 días. La densidad celular de 13 millones de células/ml se alcanzó el día 5.

- 5 Figura 7B: flexibilidad del índice de separación para la cinética del crecimiento celular de células EB-14 en un biorreactor con alimentación discontinua de 3L: Después de la siembra de células con un índice de separación de 1/10 (0,23 L a una densidad de  $0,4 \cdot 10^6$  células/mL en 2,1 L de volumen final), se dejó que se acumulara la biomasa derivada de EB14 en un medio de crecimiento Excell 65319 (SAFC) a 37°C durante un periodo de 11 días. Las concentraciones de L-glutamina (2mM) y D-(+)-glucosa (2g/L) se ajustaron diariamente como un procedimiento de alimentación discontinua y se fijaron los parámetros del biorreactor de la siguiente manera: velocidad de rotación: 80rpm, pO<sub>2</sub>: 50%, pH: 7,20.

**FIGURA 8: Influencia del medio de producción y tamaño de las agrupaciones para la propagación del virus MVA-GFP en células EB14 infectadas: Expresión del GFP**

- 15 Se dejó que las células EB14 formaran agrupaciones pequeñas (panel izquierdo) o grandes (panel derecho) en matraces tipo tanque agitado T175 durante la proliferación celular en un medio de crecimiento celular SFM (SAFC: Excell 65319). Luego se infectaron las agrupaciones con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus MVA-GFP y se diluyó la mezcla en numerosos medios de producción SFM (Optipro, Excell 65319, Excell 65629). Durante un periodo de propagación del virus de 7 días a 37°C, se tomaron imágenes diariamente de células infectadas expuestas a UV. Control: se utilizó optipro (INVITROGEN) como medio de crecimiento celular y de producción.

20 **FIGURA 9: Influencia del medio de producción y tamaño de las agrupaciones para la propagación del virus MVA-GFP en células EB14 infectadas: titulación del virus infeccioso**

- 25 Se dejó que las células EB14 formaran agrupaciones pequeñas (panel izquierdo) o grandes (panel derecho) en matraces tipo tanque agitado T175 durante la proliferación celular en un medio de crecimiento celular (SAFC Excell 65319). Luego se infectaron las agrupaciones con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus MVA-GFP y se diluyó la mezcla en numerosos medios de producción (Optipro, Excell 65319, Excell 65421, Excell 65625, Excell 65626, Excell 65627, Excell 65628, Excell 65629, G9916). Durante un periodo de propagación del virus de 7 días a 37°C, se recogieron muestras diariamente y se realizó una titulación TCID<sub>50</sub> al final de la cinética.

**FIGURA 10: Influencia del medio de producción y complementos para la propagación del virus MVA-GFP en células EB14 infectadas**

- 30 Se dejó que las células EB14 formaran agrupaciones pequeñas en matraces tipo tanque agitado T175 durante la proliferación celular en un medio de crecimiento celular (SAFC Excell 65319). Luego se infectaron las células con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus MVA-GFP y se diluyó la mezcla en numerosos medios de producción (desde el panel izquierdo al derecho: medio Excell 65319, Excell 65629 o G9916) complementado o no con 1X de yeastolate (complemento 1) y/o 1X de ácido graso (complemento 2). Durante un periodo de propagación del virus de 7 días a 37°C, se recogieron muestras diariamente y se realizó una titulación TCID<sub>50</sub> al final de la cinética.

**FIGURA 11: Expresión de GFP en células EB-14 infectadas con el virus MVA-GFP en un biorreactor con alimentación discontinua de 3L**

- 40 Se dejó que la biomasa derivada de EB14 se acumulara durante la fase de proliferación celular en el medio de crecimiento Excell 65319. Luego se infectaron las células con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus MVA-GFP y se diluyó la mezcla en el medio de producción G9916. Luego se tomaron imágenes diariamente (aumento X5 o X10) de células infectadas expuestas a UV a 37°C (PI: Post-infección).

**FIGURA 12: Titulación del virus infeccioso del virus de la gripe MVA-GFP derivado de EB14 propagado en un biorreactor con alimentación discontinua de 3L**

- 45 Se dejó que la biomasa derivada de EB14 se acumulara durante la fase de proliferación celular en el medio de crecimiento Excell 65319. Luego se infectaron las células con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus MVA-GFP y se diluyó la mezcla en Excell 65319 complementado con 1x de Yeastolate. Durante un periodo de propagación del virus de 9 días a 37°C, se recogieron muestras diariamente y se realizó una titulación TCID<sub>50</sub> al final de la cinética y se comparó con las titulaciones obtenidas de las células CEF.

**FIGURA 13: Análisis mediante micrografía electrónica del virus MVA-GFP producido en células EB14**

- 50 Las células EB14 fueron infectadas con  $10^{-2}$  TCID/célula del virus MVA-GFP y se recogieron 18h, 48h y 72h después de la infección. Se examinaron secciones finas de muestras fijadas y embebidas mediante microscopía electrónica (Dr. D.Spehner, IGBMC, Estrasburgo).

**FIGURA 14: Titulación del virus infeccioso de múltiples cepas de gripe humana producidas en células EB14.**

Se infectaron células EB14 en matraces tipo tanque agitado T175 con  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/célula de varias cepas de gripe humana A/H3N2, A/H1N1 y B, en presencia de 0,75 USP/mL de tripsina recombinante. Se recogieron muestras cada 24h y la titulación TCID<sub>50</sub> se analizó al final de la cinética mediante la titulación de las células MDCK en ausencia de suero bovino (panel izquierdo). Algunas células EB14 infectadas se analizaron en paralelo mediante microscopía electrónica, revelando la producción de partículas del virus de la gripe (panel derecho; Dr. D.Spehner, IGBMC, Estrasburgo).

#### FIGURAS 15A y 15B: Replicación productiva de las múltiples cepas del virus de la gripe en las células EB14

##### Figura 15A: Análisis por transferencia Western de hemaglutinina (HA) en células EB14 infectadas con varias cepas del virus de la gripe

Las células EB14 se cultivan en un medio sin suero en matraces de agitación T175 y se infectan con las cepas virales indicadas a una multiplicidad de infección de  $10^{-4}$ , en presencia de 0,75 USP/mL de tripsina. Se recogen 4µL de sobrenadantes del cultivo celular y se analizan mediante electroforesis a través de SDS-PAGE al 10% y transferencia Western. Las proteínas se electrotransferieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno y se detectaron subunidades sin cortar (HA0) o posteriores al corte (HA1 y HA2) de HA mediante incubación con un suero de oveja anti-HA policlonal específico. Para la inmunotinción, se utilizó una IgG anti-oveja conjugada con peroxidasa. Para cada cepa de virus, se compara la acumulación de HA de 72h a 168h post-infección con cantidades crecientes de los reactivos HA estándar derivada de huevo.

##### Figura 15B: Análisis SRID de niveles de producción de HA derivada de EB14 para varios virus de la gripe.

Se infectaron células EB14 en matraces de agitación T175 con  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/célula de varias cepas de gripe humana A/H3N2, A/H1N1 y B, en presencia de 0,75 USP/mL de tripsina. Se recogieron muestras cada 24h y se realizó análisis de inmunodifusión radial simple (SRID) al final de la cinética. Para cada cepa del virus, el cálculo de acumulación de HA se relaciona con una curva dosis-respuesta de los correspondientes antígenos estándar bien definidos.

#### FIGURAS 16A – 16B: Producción de las cepas del virus de la gripe A/H3N2 en células EB14 en biorreactores de 3L

##### Figura 16A: Cinética del crecimiento de las células EB14 infectadas con la cepa del virus de la gripe A/H3N2/NewYork/55/2005

Se dejó que la biomasa de EB14 se acumulara a 37°C durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento celular. Luego, se infectaron células con  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus de la gripe A/H3N2/New York/55/2005, la mezcla se diluyó en un medio de producción Excell65629 (medio E) complementado con 0,3 USP/mL de tripsina y la temperatura se redujo a 33°C. Durante un periodo de propagación del virus de 10 días, se recogieron muestras diariamente y se almacenaron a -80°C. Panel izquierdo: densidad celular ( $\times 10^6$  células/mL), panel derecho: número total de células (rombo amarillo,  $\times 10^7$  células) y viabilidad (círculos rojos, %).

##### Figura 16B: Análisis de HA mediante ensayos de transferencia Western y SRID

Se analizaron muestras recogidas del biorreactor de 3L durante un periodo de post-infección de 7 días para la detección y cuantificación de la HA producida con un suero de oveja anti-HA policlonal específico. Panel izquierdo: análisis por transferencia Western de 4µL de sobrenadante viral al que se le realizó una inmunotinción con un anticuerpo de oveja anti-HA junto con una IgG anti-oveja conjugada con peroxidasa. Se compara la acumulación de HA con cantidades crecientes de reactivos estándar derivados de huevo. HA0: subunidad de HA sin cortar, HA1 y HA2: subunidades de HA cortadas. Panel derecho: cuantificación SRID de 10µL de sobrenadante viral. El cálculo del contenido en HA se relaciona con una curva dosis-respuesta de los mismos reactivos estándar.

#### FIGURAS 17A y 17B: Producción de la cepa del virus de la gripe B en células EB14 en un biorreactor de 3L

##### Figura 17A: Cinética del crecimiento de células EB14 infectadas con la cepa del virus de la gripe B/Johannesburg/5/99

Se dejó que las células EB14 se acumularan a 37°C durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento celular. Luego, se infectaron células con  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus de la gripe B/Johannesburg/5/99, la mezcla se diluyó en un medio de producción SAFC Excell 65629 (medio E) complementado con 0,3 USP/mL de tripsina y la temperatura se redujo a 33°C. Durante un periodo de propagación del virus de 10 días, se recogieron muestras diariamente y se almacenaron a -80°C. Panel izquierdo: densidad celular ( $\times 10^6$  células/mL), panel derecho: número total de células (rombo amarillo,  $\times 10^7$  células) y viabilidad (círculos rojos, %).

##### Figura 17B: Análisis por transferencia Western de la HA del virus de la gripe B/Johannesburg/5/99 derivado de EB14

Se analizaron muestras recogidas durante un periodo de post-infección de 7 días para la detección de la HA producida con un suero de oveja anti-HA policlonal específico. Se utilizaron 4µL de sobrenadante viral para realizar el análisis de transferencia Western, en el que a los anticuerpos capturados con antígenos se les realizó una inmunotinción con una

IgG anti-oveja conjugada con peroxidasa. Se compara la acumulación de HA con las cantidades crecientes de antígenos estándar derivados de huevo. HA0: subunidad de HA sin cortar, HA1 y HA2: subunidades de HA cortadas.

**FIGURAS 18A y 18B: Producción de las cepas del virus de la gripe A/H1N1 en células EB14 en biorreactor de 30L**

**5 Figura 18A: Cinética del crecimiento de las células EB14 infectadas con la cepa del virus de la gripe A/H1N1/NewCaledonia/20/99**

Se dejó que las células EB14 se acumularan a 37°C durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento celular. Luego, se infectaron células con  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus de la gripe A/H1N1/NewCaledonia/20/99, la mezcla se diluyó en un medio de producción SAFC Excell 65629 (medio E) complementado con 0,3 USP/mL de tripsina y la temperatura se redujo a 33°C. Durante un periodo de propagación del virus de 8 días, se recogieron muestras diariamente y se almacenaron a -80 °C. Panel izquierdo: densidad celular ( $\times 10^6$  células/mL), panel derecho: número total de células (rombo amarillo,  $\times 10^7$  células) y viabilidad (círculos rojos, %).

**Figura 18B: Análisis de hemaglutinina del virus de la gripe A/H1N1/NewCaledonia/20/99 derivado de EB14**

Se analizaron muestras recogidas durante un periodo de post-infección de 7 días para la detección y cuantificación de la HA producida con un suero de oveja anti-HA policlonal específico. Panel izquierdo: análisis por transferencia Western de 4µL de sobrenadante viral en el que a los anticuerpos capturados con antígenos se les realizó una inmunotinción con un anticuerpo de oveja anti-HA junto con una IgG anti-oveja conjugada con peroxidasa. Se compara la acumulación de HA con cantidades crecientes de reactivos estándar derivados de huevo. HA0: subunidad de HA sin cortar, HA1 y HA2: subunidades de HA cortadas. Panel derecho: cuantificación SRID de 10µL de sobrenadante viral. El cálculo del contenido en HA se relaciona con una curva dosis-respuesta de los mismos reactivos estándar.

**EJEMPLOS**

**EJEMPLO 1 :Procedimiento de derivación de las líneas de células EBx®**

El procedimiento de establecimiento de las líneas de células madre embrionarias aviares EBx® se ha descrito anteriormente en WO03/076601 y WO05/007840. Brevemente, este procedimiento de establecimiento de líneas de células EBx® comprende las etapas siguientes:

- a) aislamiento, cultivo y expansión de células aviares, preferiblemente células madre embrionarias aviares, en un medio de cultivo completo que contiene todos los factores que permiten su crecimiento y en presencia de una capa alimentadora de fibroblastos de ratón, preferiblemente inactivados, y complementados con suero animal;
- b) subcultivo mediante modificación del medio de cultivo para obtener una retirada progresiva o total de dichos factores, de dicho suero y de dicha capa alimentadora;
- c) establecimiento de líneas de células aviares adherentes o no adherentes capaces de proliferar en un medio basal en la ausencia de factores de crecimiento exógenos, capa alimentadora inactivada y un nivel bajo de suero o sin suero;

En el caso en el que el medio basal de la etapa c) todavía comprenda un nivel bajo de suero (es decir, alrededor del 2% o menos), dicho procedimiento puede comprender opcionalmente una etapa adicional d) de cambio del medio basal que ya no contiene un factor de crecimiento exógeno, que ya no contiene una capa alimentadora inactivada y que contiene un nivel bajo de suero con un medio de cultivo seleccionado entre:

- un medio basal complementado con suero (i) y diluido con un medio sin suero, luego cultivo durante subcultivos sucesivos de dichas células aviares en el medio basal (i) en el que el índice de medio sin suero aumenta progresivamente hasta la desaparición completa de dicho medio basal que no contiene un factor de crecimiento exógeno, capa alimentadora inactivada, ni suero;
- un medio sin suero complementado con suero (ii), luego cultivo durante subcultivos sucesivos de dichas células aviares en dicho medio (ii) en el que el índice de suero disminuye progresivamente hasta obtener un medio sin suero;
- un medio sin suero (iii), luego cultivo de dichas células aviares en el medio (iii); luego mantenimiento en un medio sin suero de dichas células aviares adaptadas al cambio de medio.

El término "factor que permite su crecimiento" como se emplea en el presente documento se refiere al factor de crecimiento necesario para la supervivencia y el crecimiento de las células aviares en el cultivo. Según la invención, los factores de crecimiento comprenden factores tróficos y citoquinas. Los factores tróficos son principalmente SCF, IGF-1 y bFGF. Las citoquinas son principalmente citoquinas cuya acción se realiza a través de un receptor que se asocia con la proteína gp130 como LIF, interleuquina 11, interleuquina 6, receptor de interleuquina 6, CNTF, oncostatina y cardiotrofina.

5 Las células aviares de la etapa a) son células seleccionadas entre las células embrionarias aviares, más preferiblemente entre las células madre embrionarias aviares y células primarias aviares. En una realización preferida, las células son células madre embrionarias aviares totipotentes o pluripotentes aisladas de una suspensión de población de células blastodérmicas en etapa X disociadas que se obtienen a partir de un embrión aviar, más preferiblemente un embrión de pollo (véase la clasificación EYAL–GILADI: EYAL–GILADI y KOCHAN, 1976, « From cleavage to primitive streak formation : a complementary normal table and a new look at the first stages of the development in the chick ». "General Morphology" Dev. Biol. 49: 321–337). Estas células madre embrionarias aviares se caracterizan por un tiempo de duplicación lento comprendido entre 48 a 72 horas en cultivo a 39°C.

10 La modificación del medio de cultivo de la etapa b) del procedimiento de establecimiento de líneas de células EBx® para obtener la retirada progresiva o total de los factores de crecimiento, suero y/o capa alimentadora se puede realizar simultáneamente, sucesivamente o separadamente. La secuencia de ablación del medio de cultivo se puede elegir entre:

- capa alimentadora / suero / factores de crecimiento;
- capa alimentadora / factores de crecimiento / suero;
- 15 - suero / factores de crecimiento / capa alimentadora;
- suero / capa alimentadora / factores de crecimiento;
- factores de crecimiento / suero / capa alimentadora;
- factores de crecimiento / capa alimentadora / suero.

En una realización preferida, la secuencia de ablación es factores de crecimiento / capa alimentadora / suero.

20 Este procedimiento permite la selección de clones de células que están adaptados a estas nuevas y cada vez más drásticas condiciones de cultivo hasta que se obtienen líneas estables que son capaces de crecer en un medio reducido en suero o en un medio completamente sin suero. Las líneas EBx® establecidas son preferiblemente células madre no adherentes que proliferan en suspensión en un medio sin factores de crecimiento exógenos y suero sin células alimentadoras.

25 Por "medio de cultivo completo" se entiende un medio basal complementado con factores de crecimiento y suero animal. Un ejemplo de un medio de cultivo completo se describe en Pain et al. (1996, Development 122:2339–2348), EP 787.180 y US 6.114.168, US 5.340.740, US 6.656.479 y US 5.830.510. Según la invención, "medio basal" se refiere a un medio con una formulación clásica de medios que permite, por sí mismo, al menos la supervivencia celular y, aún mejor, el crecimiento celular. Los ejemplos de medios basales son los medios SFM como los descritos anteriormente o medios como BME (medio basal de Eagle), MEM (medio mínimo de Eagle), medio 199, DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), GMEM (medio de Eagle modificado por Glasgow), DMEM–HamF12, Ham–F12 y Ham–F10, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio 5A de MacCoy, RPMI 1640. Un medio basal comprende sales inorgánicas (por ejemplo: CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ...), aminoácidos, vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido fólico, pantotenato D–Ca, ...) y otros componentes como glucosa, beta–mercaptoetanol, piruvato de sodio.

35 Es posible distinguir esquemáticamente dos familias de factores de crecimiento: las citoquinas y los factores tróficos. Las citoquinas son principalmente citoquinas cuya acción se realiza a través de un receptor que se asocia con la proteína gp130. De esta manera, LIF, interleuquina 11, interleuquina 6, receptor de interleuquina 6, CNTF, oncostatina y cardiotrofina tienen un modo de acción similar con el reclutamiento a nivel del receptor de una cadena específica y la combinación de ésta última con la proteína gp130 en una forma monomérica o a veces heterodimérica. Los factores tróficos son principalmente SCF, IGF–1 y bFGF. Más preferiblemente, el medio completo comprende un medio basal, factor de crecimiento de insulina 1 (IGF–1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleuquina 6 (IL–6), receptor de interleuquina 6 (IL–6R), factor de la célula madre (SCF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), opcionalmente interleuquina 11 (IL–11) y suero animal. Las células aviares, preferiblemente las células embrionarias aviares de la etapa a) se cultivan durante numerosos subcultivos en el medio completo. El medio se complementa con al menos uno de los factores de crecimiento seleccionados del grupo de: LIF, IGF–1, CNTF, IL–6, IL–6R, SCF, bFGF, IL–11, oncostatina, cardiotrofina. Según una realización preferida, el medio de cultivo completo es un medio basal complementado con IGF–1 y CNTF. Según otra realización preferida, el medio de cultivo completo es el medio basal complementado con IGF–1, CNTF, IL–6, IL–6R, SCF, bFGF, opcionalmente IL–11. La concentración de los factores de crecimiento IGF–1, CNTF, IL–6, IL–6R, SCF, bFGF, opcionalmente IL–11 en el medio basal está comprendida entre aproximadamente 0,01 a 10 ng/ml, preferiblemente, 0,1 a 5 ng/ml, y más preferiblemente aproximadamente 1 ng/ml.

55 Después de aproximadamente los subcultivos 3 a 10, el medio completo se reduce en factores de crecimiento (etapa b). Preferiblemente, para cada factor de crecimiento, la reducción se realiza directamente en una etapa, de un subcultivo a otro. Alternativamente, la reducción del factor de crecimiento se realiza gradualmente, mediante una disminución progresiva de la concentración del factor de crecimiento en el medio completo. En una realización más



preferida, la reducción de los factores de crecimiento se realiza simultáneamente para al menos dos factores de crecimiento. En una realización preferida, cuando el medio de cultivo completo es un medio basal complementado con IGF-1 y CNTF; la reducción de los factores de crecimiento se realiza en un ciclo de reducción. En otra realización preferida, cuando el medio de cultivo completo es el medio basal complementado con IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, bFGF, opcionalmente IL-11, la reducción de los factores de crecimiento se realiza en dos ciclos de reducción: en primer lugar, SCF, IL6, IL6R, bFGF opcionalmente IL11 se retiran directamente del medio completo; las células aviares se mantienen entonces en el cultivo durante al menos un subcultivo en un medio completo que contiene IGF1 y CNTF, opcionalmente IL-11 y complementado con suero animal. En segundo lugar, IGF1 y CNTF, opcionalmente IL-11 se retiran directamente del medio de cultivo, que comprende en última instancia el medio basal sólo complementado con suero. Habitualmente, el medio se reduce totalmente de factores de crecimiento en aproximadamente los subcultivos 20 a 30.

En una realización preferida, la privación de células alimentadoras se realiza después de la privación de factores de crecimiento. La privación de células alimentadoras es progresiva y se realiza a lo largo de numerosos subcultivos. Las células aviares ahora se siembran en un matraz a una concentración más baja que la de la etapa a), aproximadamente alrededor de  $4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> a  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Las células alimentadoras se siembran en un matraz a aproximadamente  $4,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Progresivamente, la concentración de las células alimentadoras en el matraz disminuye. Prácticamente, la misma concentración de las células alimentadoras se utiliza para 2 a 4 subcultivos, luego se utiliza una concentración más baja de células alimentadoras para 2 a 4 subcultivos adicionales, etc. El matraz luego se siembra con aproximadamente  $4,2 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, luego aproximadamente  $2,2 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, luego aproximadamente  $1,8 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, luego aproximadamente  $1,4 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, luego aproximadamente  $1,1 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, luego aproximadamente  $0,9 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, luego aproximadamente  $0,5 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>. Luego, el matraz se siembra con  $6,5 \times 10^4$  células aviares/cm<sup>2</sup> a  $7,5 \times 10^4$  células aviares/cm<sup>2</sup> y sin células alimentadoras. En la hipótesis de que las células aviares no estén en buena forma después de una disminución de la concentración de células alimentadoras en el matraz, entonces las células aviares se cultivan durante subcultivos adicionales con la misma concentración de células alimentadoras antes de llevar a cabo la privación de células alimentadoras.

En otra realización preferida, la privación de suero se realiza después de la privación del factor de crecimiento y de las células alimentadoras. El medio basal se cambia por un medio seleccionado entre:

- El medio basal (i) complementado con suero y diluido con un medio sin suero nuevo (ii). Luego, las células aviares se cultivan a través de sucesivos subcultivos en el medio (i) en el que la proporción del medio sin suero aumenta progresivamente hasta la completa desaparición del medio basal complementado con suero (dilución progresiva).

- Un medio sin suero nuevo (ii) complementado con suero. Luego, las células aviares se cultivan a través de sucesivos subcultivos en el medio (ii) en el que la proporción del suero disminuye progresivamente hasta la obtención de un medio sin suero (ablación progresiva).

- Un medio sin suero nuevo (ii) no complementado con suero. Luego, las células aviares se encuentran directamente en el medio sin suero (ii) (ablación directa).

En una realización preferida, la privación de suero se realiza mediante una ablación progresiva.

Las células alimentadoras son células animales que han sido preferiblemente inactivadas mediante irradiación o químicamente tratadas con mitomicina. El alimentador se puede modificar genéticamente para expresar factores de crecimiento como el SCF. Preferiblemente, las células alimentadoras son líneas de células de fibroblastos de ratón como STO (American Type Culture Collection ATCC N°CRL-1503).

Este procedimiento da lugar al establecimiento de líneas de células derivadas de embriones aviares llamadas EBx® que se mantienen en un cultivo *in vitro* durante un periodo de tiempo considerable. De forma ventajosa, las células EBx® obtenidas en la etapa c) son capaces de proliferar durante al menos 50 días, 100 días, 150 días, 300 días o preferiblemente al menos 600 días. Los 600 días no constituyen un límite de tiempo porque las células EBx® obtenidas están todavía vivas después de periodos de tiempo mucho más largos. Por ejemplo, un banco de células principal de células EB14 se ha producido en el subcultivo P160 y un banco de células de final de producción de EB14 se ha producido en P184 y las células EB14 son todavía capaces de proliferar. Por lo tanto, se considera que estas líneas pueden crecer indefinidamente en un medio de cultivo básico sin factores de crecimiento exógenos, suero y/o capa alimentadora inactivada. La expresión "línea" se refiere a toda población de células capaz de proliferar indefinidamente en un cultivo *in vitro* mientras mantiene en un grado mayor o menor las mismas características morfológicas y fenotípicas. Por supuesto, el método mencionado anteriormente posibilita la obtención de clones celulares que derivan de células obtenidas a partir de líneas establecidas. Estos clones son células que son genéticamente idénticas a la célula de la que derivan por división.

Las líneas de células establecidas y las células derivadas de las mismas (etapa c o d) son preferiblemente líneas de células madre aviares derivadas de embriones, más precisamente aquellas células son células madre derivadas de embriones aviares pluripotentes. Las células madre derivadas de embriones aviares EBx® que se obtienen a partir del procedimiento de la invención son células pequeñas, redondas e individualizadas con un tiempo de duplicado de aproximadamente 24 horas o menos a 39°C. Las células que se obtienen a partir del procedimiento de la invención se

encuentran al menos en el subcultivo p60, al menos p70, al menos p80, al menos p90, al menos p100, al menos p110 al menos p120, al menos p130, al menos P150, al menos P160, al menos P170, al menos P180 o posterior. Las células madre derivadas de embriones aviares según la invención presentan al menos una de las siguientes características:

- un alto índice núcleo-citoplasma,
- 5 - una actividad de fosfatasa alcalina endógena,
- una actividad de telomerasa endógena
- una reactividad con anticuerpos específicos contra SSEA-1 (TEC01 ), SSEA-3 y EMA-1,
- expresan el gen ENS1;

10 Un tiempo de duplicado más corto que el tiempo de duplicado de las células aviares de la etapa a) del procedimiento de la invención (48 a 72h a 39°C), de aproximadamente 24 horas o menos en las mismas condiciones de cultivo.

15 Estas líneas de células EBx® son capaces de proliferar indefinidamente en un medio basal, en particular en un medio como los medios SAFC Excell, DMEM, GMEM, HamF12 o McCoy complementados con varios aditivos comúnmente utilizados por expertos en la materia. Entre los aditivos, se pueden mencionar aminoácidos no esenciales, vitaminas y piruvato de sodio, ácidos grasos, hidrolizados de levadura y soja. Sin embargo, las células pueden proliferar en un medio basal sin glutamina. Estas líneas de células y las células derivadas de ellas presentan la característica de crecer ya sea como células adherentes o como células en suspensión.

Preferiblemente, las células EBx® de la invención, preferiblemente las células EB14, presentan todas las características mencionadas anteriormente y son útiles para la producción de biológicos como vacunas virales y péptidos recombinantes y proteínas (es decir, anticuerpos...).

## 20 **EJEMPLO 2 :CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EB14**

### **2.1 - Cariotipo de células EB14**

El análisis del cariotipo de células EB14 se ha realizado en el Laboratorio del Pr. Michel Franck, Unité de zootechnie, ethnologie et économie rurale, Ecole Nationale Vétérinaire, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, Francia.

25 Se elaboró un cariotipo para las células EB14 en dos subcultivos diferentes (Subcultivo 105 y 118) utilizando técnicas estándar muy conocidas para el experto en la materia. Como era de esperar, las células EB14 en los subcultivos 105 y 118 presentan un cariotipo diploide (Figura 2):

Subcultivo 105: número modal de cromosomas = 78 (media promedio: 78,41 - desviación estándar: 4,951 sobre 53 metafases estudiadas)

30 Subcultivo 118: número modal de cromosomas = 79 (media promedio: 79,68 - desviación estándar: 3,733 sobre 50 metafases estudiadas).

El genoma de pollo comprende dos tipos de pares de cromosomas: macro y microcromosomas. El análisis del subcultivo 115 muestra que el número modal de macrocromosomas es 18 con una media promedio de 17,82 y una desviación estándar de 0,833 y un número modal de microcromosomas de 60 con una media promedio de 60,6 y una desviación estándar de 4,7. El análisis del subcultivo 118 muestra que el número modal de macrocromosomas es 18 con una media promedio de 18,24 y una desviación estándar de 0,797 y un número modal de microcromosomas de 60 con una media promedio de 61,44 y una desviación estándar de 3,688. No existe una desviación significativa en la distribución de cromosomas entre los dos subcultivos estudiados.

La línea de células EB14 muestra en cariotipo diploide masculino normal (ZZ) en los subcultivos 105 y 118 que demuestra la estabilidad cromosómica de las células EB14.

### 40 **2.2 - Análisis de tumorigenicidad de las células EB14 en el modelo de rata recién nacida inmuno-suprimidas**

Se ha evaluado la tumorigenicidad de las células EB14 en el subcultivo 127 en el modelo de rata recién nacida inmuno-suprimida (Sanofi-Aventis, Francia) (informe técnico de la OMS N° 878 (1998)). Se utilizaron células Hela como controles positivos. Se inyectaron subcutáneamente 10 millones de células EB14 a diez ratas recién nacidas inmuno-suprimidas y se inyectaron subcutáneamente 10 millones de células Hela a diez ratas adicionales recién nacidas inmuno-suprimidas. Todos los animales recibieron 0,1 ml de suero de ratas anti-tímocito los días 0, +2, +7 y +14. Se observaron los animales con regularidad durante tres semanas para detectar nódulos en el lugar de la inyección. Después de 3 semanas, los animales fueron matados y examinados para detectar la proliferación celular en el lugar de la inyección y en otros órganos. No se observaron nódulos o tumores en el lugar de la inyección de células EB14 o en órganos distantes. Las EB14 no son tumorigénicas en el modelo de rata recién nacida inmuno-suprimida.

### 50 **2.3 - Las células EB14 expresan receptores del virus de la gripe aviar y humana**

La detección de receptores para los virus de la gripe aviar (Sia 2–3Gal) y humana (Sia 2–6Gal) en las células EB14 se realiza mediante un análisis de separación de células fluorescente utilizando lectinas etiquetadas con digoxigenina (Boehringer):

- la lectina aglutinina *Sambuca nigra* (SNA) se une específicamente a Sia 2–6Gal;
- 5 □ la lectina aglutinina *Maackia amurensis* (MAA) se une específicamente a Sia 2–3Gal.

Las líneas de células EB14 y MDCK se lavaron en 10mM de HEPES, 150mM de NaCl pH 7,5 y se resuspendieron en el mismo regulador de pH a una concentración final de  $5 \cdot 10^6$ . Las células se incubaron 30 min en hielo, luego durante unos 15 a 30 minutos adicionales en presencia de SNA o MAA. Las células tratadas con lectina se lavaron en 10mM de HEPES, 150mM de NaCl pH7,5, antes de la incubación en hielo durante 15 a 30 minutos con un anticuerpo anti-digoxigenina etiquetado con FITC. Luego, las células se lavan en 0,9% de NaCl y se analizan por FACS.

Las células EB14 expresan receptores de superficie celular que comprenden oligosacáridos con residuos Sia 2–6Gal y Sia $\alpha$ 2–3Gal (Figura 6).

### **EJEMPLO 3: PRODUCCIÓN DE MVA EN CÉLULAS EB14**

#### **3.1 - Materiales y métodos**

15 Se utilizó un virus MVA recombinante que codifica un gen de proteína fluorescente verde. Se realizó una titulación de los virus MVA–GFP infecciosos en células DF–1. Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de  $15 \cdot 10^3$  células/pocillo en un medio DMEM (Biowhittaker) complementado con 5% de suero de ternero fetal (FCS) (SAFC) y 2 mM de L–glutamina (Biowhittaker). Veinticuatro horas después, las células se infectaron con muestras diluidas en serie diez veces en DMEM y se incubaron durante una semana a 37°C, en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se midió la infectividad del virus mediante observación microscópica del efecto citopático global (ECP) y de las células infectadas expuestas a UV. Luego, se calcularon las titulaciones TCID<sub>50</sub> según el método de Reed y Muench (1938, A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493–97).

#### **3.2- Infección en matraces de cultivo tisular**

##### **3.2.1 - Materiales**

- 25 ○ **Recipiente:** matraz F175 (Starstedt, Ref. 83 1812502)
- **Agitador orbital:** IKA KS260 o equivalente
- **Sonicador:** IKA U50 (controlado con sonda US50–3)
- **Medio:** Excell 65319 (SAFC–JRH) con 2,5 mM de glutamina (Cambrex Ref. BE17605E);

##### **3.2.2 - Métodos**

#### **30 ETAPA 1: Preparación de células EB14**

Las células se deben preparar 2 semanas antes de empezar el experimento de infección.

Día 0: las células EB14 se siembran en un matraz F175 a  $0,4 \cdot 10^6$  células/mL en 25 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina [1<sup>a</sup> siembra después de la rotura de las agrupaciones]. Las células se incuban a 37°C, 7,5% de CO<sub>2</sub>, atmósfera húmeda bajo agitación (60 rpm)

35 Día 1: se añaden 25 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

Día 2: se añaden 50 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

Día 3: se cuentan las células. Se siembra una alícuota de células EB14 en un nuevo matraz F175 a  $0,4 \cdot 10^6$  células/mL en 25 ml de un medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Esto representa la dilución +1.

Día 4: se añaden 25 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

40 Día 5: se añaden 50 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

Día 6: se cuentan las células. Se siembra una alícuota de células EB14 en un nuevo matraz F175 a  $0,4 \cdot 10^6$  células/mL en 25 ml de un medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Esto representa la dilución +2.

Luego, la amplificación de las células continúa así hasta una dilución que comprende preferiblemente entre +3 a +7, más preferiblemente +3 a +5. Luego se debe continuar con la etapa 2 de la infección de células.

45 Para obtener un cultivo celular que contiene grandes células EBx® agrupadas (de ahora en adelante llamado: condiciones de "grandes agrupaciones"), cuando las células se subcultivan por dilución en recipiente(s) más

grande(s), las células EBx® no se centrifugan y las agrupaciones no se rompen mediante pipeteo y agitación. Por otro lado, para obtener un cultivo celular sin una proporción sustancial de células EBx® agrupadas, las agrupaciones se fragmentan por pipeteo o agitación cuando se subcultivan las células (de ahora en adelante llamadas: condiciones "sin agrupaciones").

## 5 ETAPA 2: Infección de células EB14 con MVA–GFP (proteína verde fluorescente)

Día 1: las células EB14 se siembran en un matraz F175 a  $0,4 \times 10^6$  células/mL en 40 mL de medio JRH Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Las células se incuban a 37°C, 7,5% de CO<sub>2</sub>, atmósfera húmeda bajo agitación (60 rpm).

Días 2 y 3: las células se cuentan.

10 Día 4: las células se cuentan. Cuando la densidad celular en el matraz es de aproximadamente  $4 \times 10^6$  células/ml, las células EB14 se infectan con una MOI de 0,01 TCID<sub>50</sub>/célula con 1 ml de mezcla de infección viral por matraz. Se prepara la mezcla de infección viral justo antes de su uso mediante una dilución del virus en el medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Cada inóculo se sonica 30 segundos (amplitud 100% y ciclo continuo) en hielo en un tubo Falcon™ de 15 ml. El inóculo se calienta a temperatura ambiente antes del mezclado con el cultivo celular. Después de la inoculación, el medio de cultivo infectado se incubaba 1 h a 37°C. Luego, se añaden al matraz 60 ml del medio fresco  
15 Excell 65319 complementado con 2,5 mM de glutamina, 0,5x de Yeastolate y 0,35ml/L de ácidos grasos. El cultivo celular infectado se incubaba adicionalmente a 37°C durante al menos 144h (nótese bien: el pico de producción viral se encuentra entre pi + 72 h y pi + 120 h).

20 Las muestras de cultivo celular (1mL) se recogen cada 24h y se mantienen congeladas a –80°C. Antes de la recogida de las muestras, se homogeniza el cultivo celular mediante pipeteo suave. Se realiza una titulación del virus en cada muestra recogida al final del experimento utilizando el método de Reed y Muench de TCID<sub>50</sub>/mL (1938).

### 3.3- Infección en centrifugador

#### 3.3.1 - Materiales

- **Recipiente:** frasco centrifugador de 500 ml y 1 litro (Corning)
- **Agitador orbital:** IKA KS260 o equivalente
- 25 ○ **Sonicador:** IKA U50 (controlado con sonda US50–3)
- **Medio:** Excell 65319 (SAFC–JRH) con 2,5 mM de glutamina (Cambrex Ref. BE17605E);

#### 3.3.2 - Método

##### **ETAPA 1 : Preparación de células EB14**

Las células se deben preparar 2 semanas antes de empezar el experimento de infección.

30 Día 0: las células EB14 se siembran en un matraz F175 a  $0,4 \times 10^6$  células/mL en 25 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina [1ª siembra después de la rotura de las agrupaciones]. Las células se incuban a 37°C, 7,5% de CO<sub>2</sub>, atmósfera húmeda bajo agitación (60 rpm)

Día 1: se añaden 25 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

Día 2: se añaden 50 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

35 Día 3: las células se cuentan. Se siembra una alícuota de células EB14 en un nuevo matraz F175 a  $0,4 \times 10^6$  células/mL en 25 ml de un medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Esto representa la dilución +1.

Día 4: se añaden 25 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

Día 5: se añaden 50 ml de medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina.

40 Día 6: las células se cuentan. Se siembra una alícuota de células EB14 en un nuevo matraz F175 a  $0,4 \times 10^6$  células/mL en 25 ml de un medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Esto representa la dilución +2.

Luego, la amplificación de las células continúa así hasta una dilución que comprende preferiblemente entre +3 a +7, más preferiblemente +3 a +5. Luego se debe continuar con la etapa 2 de la infección de células.

45 Para obtener un cultivo celular con grandes células EBx® agrupadas (de ahora en adelante llamados: "grandes agrupaciones"), cuando las células se subcultivan por dilución en recipiente(s) más grande(s), las células EBx® no se centrifugan y las agrupaciones no se rompen por pipeteo y agitación. Por otro lado, para obtener un cultivo celular sin una proporción sustancial de células EBx® agrupadas, las agrupaciones se fragmentan mediante pipeteo o agitación cuando se subcultivan las células (de ahora en adelante llamadas: "sin agrupaciones").

**ETAPA 2: Infección de células EB14 con MVA–GFP**

Día 1: Las células EB14 se siembran en un frasco centrifugador de 500 ml (ó 1.000 ml) a  $0,4 \times 10^6$  células/mL en 150 mL (ó 300ml) de medio JRH Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Las células se incuban a 37°C, 7,5% de CO<sub>2</sub>, atmósfera húmeda bajo agitación (100 rpm).

5 Días 2 y 3: las células se cuentan.

10 Día 4: las células se cuentan. Cuando la densidad celular en el centrifugador es de aproximadamente  $4 \times 10^6$  células/ml, las células EB14 se infectan con una MOI de 0,01 TCID<sub>50</sub>/célula con 1 ml de mezcla de infección viral por frasco centrifugador. Se prepara la mezcla de infección viral justo antes de su uso mediante una dilución del virus en el medio Excell 65319 con 2,5mM de glutamina. Cada inóculo se sonica 30 segundos (amplitud 100% y ciclo continuo) en hielo en un tubo Falcon™ de 15 ml. El inóculo se calienta a temperatura ambiente antes del mezclado con el cultivo celular. Después de la inoculación, el medio de cultivo infectado se incuba 1 h a 37°C. Luego, se añaden al matraz 60 ml del medio fresco Excell 65319 complementado con 2,5 mM de glutamina, 0,5x de Yeastolate y 0,35ml/L de ácidos grasos en el frasco centrifugador de 500ml (ó 1.000 ml). El cultivo celular infectado se incuba adicionalmente a 37°C durante al menos 144h (nótese bien: el pico de producción viral se encuentra entre pi + 72 h y pi + 120 h).

15 Las muestras de cultivo celular (1mL) se recogen cada 24h y se mantienen congeladas a –80°C. Antes de la recogida de las muestras, se homogeniza el cultivo celular mediante pipeteo suave. Se realiza una titulación del virus en cada muestra recogida al final del experimento utilizando el método de Reed y Muench de TCID<sub>50</sub>/mL (1938)\*. \*Reed L y Muench H (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493–97.

**3.4 - Infección en biorreactor tipo tanque agitado de 3L****20 3.4.1 Método****Descongelación de células**

25 Se almacenan crioviales de células en nitrógeno líquido a –196 °C; cada criovial contiene  $20 \cdot 10^6$  células. El criovial se descongela directamente en un baño de agua precalentado a 37°C para descongelar el vial congelado rápidamente. La suspensión celular se pipetea en un tubo estéril PP de 50 mL con 30 mL de medio de cultivo pre–calentado. La suspensión celular se centrifuga 5 min a  $300 \pm 20g$ , a temperatura ambiente, el sobrenadante se desecha y el sedimento se resuspende en 15 ml del medio de cultivo fresco y se homogeniza suavemente. La suspensión celular se coloca en un matraz de T75 cm<sup>2</sup> y se incuba a 37°C en una atmósfera con 7,5% de CO<sub>2</sub> en un agitador orbital a 50 rpm. Después de 24 horas y 48 horas de cultivo, se añaden 15 ml del medio de cultivo pre–calentado al cultivo celular. Después de 72 horas de cultivo, se recoge una muestra (después de la homogeneización a granel) y se realiza un recuento: se esperan  $\geq 40 \cdot 10^6$  células. Luego se realiza la primera amplificación.

**Primera amplificación celular: centrifugación, disociación y dilución.**

35 Las células en suspensión se recogen del o de los matraces en un tubo o tubos estériles PP de 50 mL. Después de 5 min de centrifugación a  $300 \pm 20 g$ , a temperatura ambiente, el sobrenadante se desecha y se añaden 10 mL del medio de cultivo fresco pre–calentado al o a los sedimentos. Las agrupaciones celulares se disocian suavemente con una pipeta de 10 mL y las soluciones celulares se combinan en un tubo estéril PP de 50 mL, en caso de ser necesario. El volumen del cultivo se completa hasta 20 mL con el medio de cultivo fresco pre–calentado, en caso de ser necesario. Se realiza un recuento utilizando azul de tripán para determinar la densidad celular y la viabilidad celular (la viabilidad celular se encuentra generalmente en aproximadamente el 80%). En 1 matraz de T175 cm<sup>2</sup>, se siembran  $0,4 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> en 40 ml de medio de cultivo pre–calentado. El cultivo celular se incuba a 37°C en una atmósfera con 7,5 % de CO<sub>2</sub> en un agitador orbital a 50 rpm. El día 2, se añaden 60 ml del medio de cultivo pre–calentado al cultivo celular. El día 3, se realiza la dilución celular.

**Dilución +1 a +5 (sin centrifugación, sin disociación, sólo dilución).**

45 Se toma una muestra del matraz T175 (después de mezclar suavemente) para realizar un recuento utilizando azul de tripán para determinar la densidad celular. Se toma una muestra del matraz T175 (después de mezclar suavemente) con el fin de sembrar  $0,4 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> en 1 matraz T175 cm<sup>2</sup> en un volumen total de 25 ml medio de cultivo pre–calentado. Esto representa la dilución +1.

50 El día 1, se añaden 50 ml de medio de cultivo pre–calentado. El día 2, se realiza la Dilución +2 utilizando la misma forma que para la dilución+1 (véase más arriba). La amplificación celular se realiza de esta manera, hasta Dilución +3 a +5. El inóculo para el biorreactor de 3L se puede preparar a partir de la Dilución +3 hasta la Dilución +5. Se preparan dos matraces T175 como inóculo.

**Siembra de células en un biorreactor tipo tanque agitado de 3L****Siembra - Día 0**

Se prepara el inóculo (se necesitan  $320 \cdot 10^6$  células para inocular el biorreactor de 3L). Se combinan los 2 matraces T175. Se toma una muestra después de mezclar suavemente (las agrupaciones celulares no deben romperse) para realizar un recuento utilizando un azul de tripán para determinar la densidad celular. Se prepara una mezcla celular de 150 mL con el fin de obtener una concentración celular de  $0,40 \cdot 10^6$  células. $\text{ml}^{-1}$  en el volumen del cultivo final de 800 ml en el biorreactor.

Antes de sembrar las células el pH se ajusta en el recipiente a 7,2 (porque el pH disminuirá por la inyección de superficie de  $\text{CO}_2$ ). La  $\text{pO}_2$  se ajusta a saturación de 50% de  $\text{O}_2$  (el regulador de flujo de masa se ajusta a 100 % lo que corresponde a una velocidad de flujo del rociado máxima a  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Al inicio del procedimiento, el pH se mantiene por inyección de superficie de  $\text{CO}_2$ , más adelante, se controla añadiendo 7,5% de  $\text{NaHCO}_3$ . La aireación de superficie se inicia con aire a una velocidad de flujo de  $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

#### Seguimiento del cultivo / Adición de la alimentación (Día 1, Día 2)

El recuento celular se realiza en forma rutinaria. Los metabolitos como glutamato, glutamina, lactato y glucosa se analizan durante todo el cultivo con el software BioProfile Basic. La concentración de metabolitos se ajusta, en caso de ser necesario. Por ejemplo, la concentración de glutamina se ajusta a 2 mM.

#### Infección con MVA–GFP (Día 3)

Después de 3 días de cultivo, la densidad celular debería ser mayor a  $3 \cdot 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ . Si se alcanza la densidad celular diana ( $3$  a  $5 \cdot 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ ), se realiza la infección del virus a una MOI de  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula. La cepa del virus se descongela en hielo. La mezcla de la infección se prepara en un tubo estéril PP de 50 mL con 10 mL del medio de producción. La mezcla se sonica durante 30 segundos (amplitud 100% y ciclo continuo) en hielo. La mezcla de la infección se inocula en el biorreactor. Después de 1 hora de adsorción viral, el medio de producción final se añade al recipiente. El medio de producción de Excell 65319 1,5 L en 1,5 L se complementa con Yeastolate y ácidos grasos a una concentración final de respectivamente 0,5X y 0,35ml/L (volumen final: 2,3L).

#### Seguimiento de la producción / Adición de la siembra (Día 4, Día 5, Día 6, Día 7, Día 8, Día 9, Día 10)

El pico de producción viral de MVA se alcanza entre las 72h y 120h posteriores a la infección. Todos los días, se recoge una muestra de aproximadamente 15 ml del biorreactor para realizar el recuento celular, análisis de morfología celular y para observar el CEP. Los metabolitos tales como glutamato, glutamina, lactato y glucosa se analizan durante todo el cultivo con el software BioProfile Basic. La concentración de metabolitos se ajusta, en caso de ser necesario. Por ejemplo, la concentración de glutamina se ajusta a 2 mM, en caso de ser necesario. La concentración de glucosa se ajusta a  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , en caso de ser necesario.

#### Análisis

Se realiza la titulación del virus al final del experimento utilizando todas las muestras recogidas.

### **3.5 - Resultados**

#### **3.5.1 - Cinética del crecimiento celular de células EB14 en un biorreactor de alimentación discontinua de 3L**

Las células EB14 se cultivan en forma rutinaria en un biorreactor tipo tanque agitado. Se deja acumular la biomasa derivada de EB14 a  $37^\circ\text{C}$  en un medio de crecimiento celular hasta que se alcanza una densidad celular de  $5$  a  $6 \cdot 10^6$  células/mL. Luego, se diluye la mezcla aproximadamente 3 veces y se realiza un seguimiento de la cinética del crecimiento celular durante un periodo de 10 días. En tales condiciones, se alcanza la densidad celular de  $12$  a  $16$  millones de células/ml habitualmente alrededor del día 5 a 8 (Figura 7A). Se puede aumentar el índice de dilución de los subcultivos de las células EB14. La Figura 7B muestra una cinética de crecimiento de células EB14 diluidas 10 veces.

#### **3.5.2 - Flexibilidad de las células EB–14: purificación en placas del virus MVA–GFP en células adherentes**

Las células EB14 crecen en un cultivo en suspensión. Sin embargo, las células EB14 también tienen la capacidad de crecer en adherencia en matraces y placas. Esta característica permite a los inventores realizar la purificación en placas de MVA–GFP en células EB14 adherentes. Para realizarlo, se inocularon diluciones seriadas de diez veces del virus MVA–GFP en células EB–14 adherentes sembradas en placas de 6 pocillos 24h antes a una densidad de  $7 \cdot 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ . Después de la adsorción viral, las células fueron recubiertas con una capa de una mezcla de 1,2% de LMP agarosa/2,5% de FCS DMEM e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante varios días. Finalmente, los pocillos se tiñeron con rojo neutro. Luego, se puede calcular la titulación de la unidad formadora de placas con diluciones proporcionando placas aisladas.

### **3.5.3 - Influencia del medio de producción y tamaño de las agrupaciones para la propagación del virus MVA-GFP en células EB14 infectadas**

Se dejó que las células EB14 formaran agrupaciones pequeñas o grandes en matraces tipo tanque agitado T175 durante la proliferación celular en un medio de crecimiento celular (Excell 65319). Luego se infectaron las agrupaciones con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus MVA-GFP y se diluyó la mezcla en varios medios de producción (Optipro, Excell 319, Excell 421, Excell 625, Excell 626, Excell 627, Excell 628, Excell 629, G9916).

La presencia de grandes agrupaciones de células EB14 mejora la infección y propagación del virus (Figura 8), dando lugar a mayores titulaciones del virus MVA (Figura 9). La adición de complementos tales como yeastolate (complemento 1) y ácidos grasos (complemento 2) en el medio de producción del virus mejora aún más las titulaciones del virus MVA. Como se muestra en la figura 10, cuando el 1X de yeastolate (complemento 1) se añade solo en el medio, el rendimiento viral de MVA-GFP aumenta y se obtiene incluso un efecto sinérgico cuando se añade yeastolate (complemento 1) y ácidos grasos (complemento 2) en el medio de crecimiento celular. De hecho, 1X de ácido graso solo no aumenta las titulaciones virales.

### **3.5.4 - Producción del virus MVA en un biorreactor de 3L**

Se dejó que la biomasa derivada de EB14 se acumulara durante la fase de proliferación celular en el medio de crecimiento Excell 65319. Luego, se infectaron las células con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula del virus MVA-GFP y se diluyó la mezcla en el medio de producción Excell 65319. Después de la adición de Excell 65319, la densidad celular disminuyó (día 3) y el día 5, la densidad celular de las células infectadas aumentó y alcanzó 4 millones de células/ml. El hecho de que no se realice una centrifugación durante la amplificación celular permite obtener un gran tamaño de las agrupaciones en el cultivo 2 a 4 días post-infección (Figura 11). En tales condiciones, la productividad de MVA-GFP es alta. Desde la post-infección del día 6, la titulación del MVA-GFP es aproximadamente  $10^{8,32}$  TCID<sub>50</sub>/ml (concentración celular de  $1,49 \times 10^6$  células/ml) que corresponde a TCID<sub>50</sub>/célula = 414 (factor de amplificación 41.000) (Figura 12). Parece que cuando las células EB14 se amplifican sin fragmentar las agrupaciones (por dilución por ejemplo), se obtiene una titulación viral más alta en un biorreactor de 3L en comparación con la obtenida en ausencia de grandes agrupaciones (factor de amplificación de aproximadamente 1.900 y TCID<sub>50</sub>/célula = 19) en el cultivo celular.

### **3.5.5- Ultraestructura normal de las células EB14 infectadas con MVA**

Se analizaron las células EB14 infectadas con el virus MVA mediante micrografía electrónica (Dr. Daniele Spehner y Robert Drillien, IGBMC, Estrasburgo, Francia). La maduración del virus MVA producido en las células EB14 es normal y similar a la observada en los fibroblastos embrionarios de pollo primarios.

## **EJEMPLO 4: PRODUCCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE EN CÉLULAS EB14**

### **4.1 - Materiales y métodos**

#### **4.1.1 - Ensayo de infectividad del virus de la gripe (TCID50)**

Se realizó la titulación de los virus infecciosos de la gripe en células MDCK. En breve, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de  $3 \cdot 10^3$  células/pocillo en un medio UltraMDCK complementado con 2,5 mM de L-glutamina. Veinticuatro horas después, las células se infectaron con muestras diluidas en serie diez veces en UltraMDCK que contenía  $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de tripsina-EDTA y se incubaron durante una semana a 33°C, en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se ensayó la replicación del virus en un ensayo de HA utilizando células sanguíneas rojas de pollo y se calcularon las titulaciones de TCID<sub>50</sub> según el método de Reed y Muench (1938)\*.

\*Reed L, Muench H, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-97.

#### **4.1.2 - Ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID)**

Se determinó la concentración de hemaglutinina en muestras derivadas de las células EB14 infectadas con el virus de la gripe según lo descrito por Wood y colegas\*. Brevemente, las placas de vidrio se revistieron con un gel de agarosa que contenía suero anti-gripe (se recomienda la concentración proporcionada por NIBSC). Después de que se coloca el gel, se cargaron 10  $\mu\text{L}$  de las diluciones apropiadas de la referencia y las muestras en pocillos perforados  $\varnothing$  de 3mm. Después de una incubación de 18 a 24 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente, las placas se remojaron en 0,9% de NaCl y se lavaron en agua destilada. Luego, el gel fue presionado y secado. Las placas se tiñeron con una disolución azul brillante de Coomassie durante 15 min y se destiñeron dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que las zonas teñidas definidas claramente fueron visibles. Después de secar las placas, el diámetro de las zonas teñidas alrededor de los pocillos de los antígenos se midió en dos direcciones en ángulos rectos. Se construyeron curvas dosis-respuesta de diluciones de antígenos frente a la superficie y se calcularon los resultados según los métodos de ensayo de razón de la pendiente estándar. \*Wood JM. et al. "An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines". J Biol Stand. 1977;5(3):237-47).

#### **4.1.3 - Análisis por transferencia Western de la proteína hemaglutinina de la gripe**

Se realizó SDS-PAGE como lo describe Laemmli UK (1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 259:680-685) en un gel de poli(acrilamida al 10%). Se transfirieron proteínas desnaturizadas (SDS al 1%, 70mM de  $\beta$ -mercaptoetanol) a una membrana de difluoruro de polivinilideno (hybond P, Amersham) mediante un procedimiento de transferencia semiseco (Kyhse-Andersen J (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 10:203-209). Las transferencias se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente con una mezcla compuesta por 5% de leche en polvo rica en materia grasa en TBST complementado con FCS al 1% (SAFC). Luego, las transferencias se incubaron durante toda la noche en una disolución de bloqueo complementada con suero de oveja anti-HA policlonal específico (1:500 (NIBSC)). Las transferencias se lavaron 6 veces con TBST y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de oveja conjugado con HRP (1:5.000 (Rockland) en la disolución de bloqueo. Después de 6 lavados con TBST, el complejo proteína-conjugado se reveló finalmente utilizando quimioluminiscencia (kit ECL, Amersham) y películas (Hyperfilm, Amersham).

#### **4.2 - Infección con virus de la gripe de células EB14 en un biorreactor de 3L**

##### **4.2.1 - Materiales y equipamiento**

###### Material de descongelado de células

- Matraces de T75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Cat# 831813502)
- Medio de cultivo (medio sin suero)
- 200 mM de L-glutamina (Biowhittaker, Cat# BE17-605E)
- Agitador orbital IKA KS260 (Fisher Bioblock, Cat# F35044)

###### Material de amplificación celular

- Matraces de T175 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Cat# 831812502)
- Medio de cultivo (medio sin suero): Excell 65319 (JRH, Cat# 65319-1000M1687) añadido con 2,5mM de glutamina
- 200 mM de L-glutamina (Biowhittaker, Cat# BE17-605E)
- Disolución Yeastolate UF 50X (JRH, Cat# 58902-100M)
- D (+) glucosa (45%) (Sigma, Cat# G8769)

###### Material de producción

- Medio de producción (medio sin suero): Excell 65629 (JRH, Cat# 65629) complementado con 2,5 mM de gln
- Disolución Yeastolate UF 50X (JRH, Cat# 58902-100M)
- 200 mM de L-glutamina (Biowhittaker, Cat# BE17-605E)
- D (+) glucosa (45%) (Sigma, Cat# G8769)
- Tripsina (Trypzean 1X, Sigma, Cat# T3449)
- Disolución de bicarbonato de sodio al 7,5 % (Sigma, Cat# 205-633-8)
- Cepa del virus de la gripe (congelada a -80°C)

##### **4.2.2 - Método**

###### Descongelación de células

Se almacenan crioviales de células en nitrógeno líquido a -196°C; cada criovial contiene 20.10<sup>6</sup> células). El criovial se descongela directamente en un baño de agua pre-calentado a +37 °C. La suspensión celular se coloca en un tubo estéril PP de 50 mL con 30 mL de medio de cultivo pre-calentado. Después de la centrifugación (5 min a 300 ± 20 g, a temperatura ambiente), se añaden 15 mL de medio de cultivo fresco al sedimento y se homogeneiza suavemente. La muestra se cuenta utilizando azul de tripán. El recuento tiene que ser  $\geq 20.10^6$  células y la viabilidad tiene que ser > 70% para garantizar un buen cultivo. La suspensión celular se coloca en un matraz de T75 cm<sup>2</sup> y se incuba a + 37°C en una atmósfera con 7,5% de CO<sub>2</sub> en un agitador orbital a 50 rpm. Después de 24 horas y 48 horas de cultivo, se añaden 15 mL del medio de cultivo pre-calentado al cultivo. Después de 72 horas de cultivo, se recoge una muestra (después de la homogeneización a granel) y se cuenta: se esperan 20 a 30.10<sup>6</sup> células. Luego se realiza la primera amplificación.



Primera amplificación celular: centrifugación, disociación y dilución

La célula en suspensión se recoge del o de los matraces en un o unos tubos estériles PP de 50 mL y se centrifuga 5 min a  $300 \pm 20$  g, a temperatura ambiente. Se añaden 10 mL de medio de cultivo fresco pre-calentado al o a los sedimentos. Las agrupaciones celulares se disocian suavemente y las suspensiones celulares se combinan; el volumen se completa hasta 40 mL con medio de cultivo fresco pre-calentado. En 1 matraz de T175 cm<sup>2</sup>, se colocan  $0,25 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> en 40 ml de medio pre-calentado y se incuba a +37°C en una atmósfera con 7,5 % de CO<sub>2</sub> en un agitador orbital a 50 rpm. El día 2, se añaden 60 ml de medio de cultivo pre-calentado. El día 3, se realiza un segundo ciclo de amplificación.

Siembra de células en un biorreactor tipo tanque agitado de 3L10 Siembra - Día 0

Se prepara el inóculo (se necesitan  $320 \cdot 10^6$  células para inocular el biorreactor de 3L). Se combinan 2 matraces T175. Se toma una muestra después de mezclar suavemente (las agrupaciones celulares no deben romperse) para realizar un recuento utilizando azul de tripán para determinar la densidad celular. Se prepara una mezcla celular de 150 mL con el fin de obtener una concentración celular de  $0,40 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> en el volumen del cultivo final de 800 ml en el biorreactor.

Antes de sembrar las células, el pH se ajusta en el recipiente a 7,2 (porque el pH disminuirá por la inyección de superficie de CO<sub>2</sub>). La pO<sub>2</sub> se ajusta a saturación de 50 % de O<sub>2</sub> (el regulador del flujo de masa se ajusta a 100 % lo que corresponde a una velocidad de flujo del rociado máxima a 50 mL.min<sup>-1</sup>). Al inicio del procedimiento, el pH se mantiene por inyección de superficie de CO<sub>2</sub>, más adelante, se controla añadiendo 7,5% de NaHCO<sub>3</sub>. La aireación de superficie se inicia con aire a una velocidad de flujo de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.

Seguimiento del cultivo / Adición de la alimentación (Día 1, Día 2)

El recuento celular se realiza en forma rutinaria. Los metabolitos tales como glutamato, glutamina, lactato y glucosa se analizan durante todo el cultivo con el software BioProfile Basic. La concentración de metabolitos se ajusta, en caso de ser necesario. Por ejemplo, la concentración de glutamina se ajusta a 2 mM.

25 Infección - Día 3

Después de 3 días de cultivo, la densidad celular tiene que estar por encima de  $4-5 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Si se logra la densidad celular diana, la infección del virus se realiza a una MOI de  $10^{-4}$ . La temperatura del recipiente se ajusta a 33°C. La cepa del virus se descongela en hielo. La mezcla de la infección se prepara en 10 mL del medio de producción. Después de la inoculación de la mezcla de la infección en el biorreactor, se realiza la adsorción viral durante 1 hora. Se prepara el medio de producción final: en 1,5 L del medio de producción, se añade la tripsina con el fin de obtener una concentración final en el recipiente de  $0,3$  U.mL<sup>-1</sup> (2,3 L en total) y se añade 0,5X de Yeastolate. Luego se añade el medio de producción final pre-calentado.

Seguimiento de la producción / Adición de la alimentación (Día 4, Día 5, Día 6, Día 7, Día 8, Día 9, Día 10)

Todos los días, se recoge una muestra de aproximadamente 15 ml del biorreactor para realizar el recuento celular, análisis de morfología celular y para observar el CEP. Los metabolitos tales como glutamato, glutamina, lactato y glucosa se analizan durante todo el cultivo con el software BioProfile Basic. La concentración de metabolitos se ajusta, en caso de ser necesario. Por ejemplo, la concentración de glutamina se ajusta a 2 mM, en caso de ser necesario. La concentración de glucosa se ajusta a  $2$  g.L<sup>-1</sup>, en caso de ser necesario.

Análisis

Al final del experimento, se realizan las cuantificaciones de titulación del virus, ensayos de hemaglutinina (HAU) y antígeno HA (transferencia Western, SRID) utilizando todas las muestras recogidas.

**4.3 - Resultados**

Los inventores demuestran que las células EB14 son un sustrato celular fiable y eficiente para la replicación de varias cepas A y B del virus de la gripe. La producción del virus de la gripe se puede realizar en varios recipientes, tales como matraces y agitadores (datos no presentados) y biorreactores. Los inventores obtuvieron un procedimiento con alimentación discontinua reproducible y eficiente de producción del virus de la gripe en biorreactores tipo tanque agitado de 3L y 30L. Se logran rutinariamente productividades por encima de 25 mg/l de hemaglutinina en matraces y se logran rutinariamente productividades por encima de 35 mg/l de hemaglutinina en matraces con cepas A y B del virus de la gripe.

50

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un procedimiento de replicación de un virus seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, hepadnavirus, virus herpes, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, picornavirus, poxvirus, reovirus y retrovirus, en células madre derivadas de embriones aviares, en el que dichas células se establecen por un procedimiento que comprende las etapas siguientes:
- 5 A) aislamiento, cultivo y expansión de células madre embrionarias aviares en un medio de cultivo completo que contiene todos los factores que permiten su crecimiento y en presencia de una capa alimentadora inactivada de fibroblastos de ratón y complementados con suero animal;
- 10 B) subcultivo mediante modificación del medio de cultivo para obtener una retirada progresiva o total de dichos factores, de dicho suero y de dicha capa alimentadora;
- C) establecimiento de líneas de células aviares adherentes o no adherentes capaces de proliferar en un medio basal en la ausencia de factores de crecimiento exógenos, capa alimentadora inactivada y un nivel de 2% o menor de suero o sin suero,
- comprendiendo dicho procedimiento de replicación las etapas de:
- 15 a) proliferación de dichas células obtenidas en la etapa C) en un recipiente de cultivo, en suspensión, en un medio sin suero N°1, en el que se deja que dichas células se agreguen entre sí para formar agrupaciones celulares durante al menos dicha etapa de proliferación, y en el que dichas agrupaciones celulares no se rompen por centrifugación y dichas células se subcultivan por dilución en un recipiente de cultivo mayor;
- 20 b) infección de dichas células en agrupaciones celulares con el virus seleccionado cuando la densidad celular es de al menos 1,5 millones de células/ml;
- c) poco antes de la infección, simultáneamente a la infección, o poco después de la infección, adición al cultivo celular de medio sin suero N°2; y
- d) cultivo adicional de dichas células infectadas con el fin de permitir la replicación del virus; y
- e) opcionalmente, recogida de dicho virus.
- 25 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el recipiente del cultivo de la etapa a) es un biorreactor tipo tanque agitado continuo.
- 3.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que se añaden entre 0,25 a 10 volúmenes de medio sin suero N°2 al medio sin suero N°1.
- 30 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio sin suero N°1 y el medio sin suero N°2 tienen una composición diferente.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio sin suero N°1 y/o el medio sin suero N°2 está/están complementado(s) con al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, colesterol, carbohidratos, hidrolizados proteicos de origen no animal, y una mezcla de ellos.
- 35 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende la etapa adicional de alimentar las células con al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, hidrolizados proteicos de origen no animal, y una mezcla de ellos.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la alimentación se produce durante las etapas a) a d), preferiblemente durante las etapas b) a d).
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la alimentación se produce diariamente, continuamente, más de una vez al día o menos de una vez al día.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en asparagina y glutamina, o una mezcla de ellas.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la alimentación de glutamina se realiza durante las etapas a) a d) para mantener la concentración de glutamina en el medio entre 0,5 mM a 5 mM, preferiblemente alrededor de 2 mM.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que los carbohidratos se seleccionan del grupo que consiste en D-glucosa y D-galactosa o una mezcla de ellas.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la alimentación de D-glucosa se realiza durante las etapas b) a d) para mantener la concentración de D-glucosa en el medio alrededor de 0,5g/l a 25g/l de D-glucosa, preferiblemente alrededor de 2g/l de D-glucosa.
- 5 13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la etapa c) se realiza después de la etapa de infección b), preferiblemente alrededor de 1 hora después de la etapa b).
14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa de infección b) se realiza a una m.o.i (multiplicidad de infección) de aproximadamente  $10^4$  a  $10^6$ , preferiblemente aproximadamente  $10^3$  a  $10^5$ , y más preferiblemente aproximadamente  $10^4$ .
15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el virus es un poxvirus.
- 10 16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que el poxvirus es un avipox seleccionado del grupo que consiste en virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, virus de la viruela del junco, virus de la viruela de los mainates, virus de la viruela de las palomas, virus de la viruela de los psitacinos, virus de la viruela de las codornices, virus de la viruela de los gorriones, virus de la viruela de los estorninos pintos y virus de la viruela de los pavos.
17. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que el poxvirus es un virus vaccinia.
- 15 18. El procedimiento según la reivindicación 17, en el que el virus vaccinia es un virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).
19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el virus es un virus natural o un virus recombinante seleccionado del grupo que consiste en virus del sarampión y de las paperas.
- 20 20. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 14, en el que el virus se selecciona del grupo que consiste en virus de la gripe humana, virus de la gripe aviar, virus de la gripe porcina, virus de la gripe equina y virus de la gripe felina.
21. El procedimiento según la reivindicación 20, el que dicho virus de la gripe humana es una cepa A seleccionada del grupo que consiste en las cepas H1N1, H2N2, H3N2, H4N2, H4N6, H5N1, H7N7 y H9N2.
22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que la infección en la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es de al menos 4 millones de células/ml en un procedimiento discontinuo o con alimentación discontinua, preferiblemente 6 millones de células/ml.
- 25 23. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que la infección en la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es de al menos 8 millones de células/ml en un procedimiento de perfusión, preferiblemente alrededor de 9 a 10 millones de células/ml.
24. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el cultivo celular se realiza a una temperatura comprendida entre  $30^{\circ}\text{C}$  a  $39^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente a alrededor de  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 30 25. El procedimiento según la reivindicación 24, en el que el cultivo celular se realiza a una temperatura de  $33^{\circ}\text{C}$  y el virus es un virus de la gripe.
26. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que dichas células madre embrionarias aviares en la etapa A) son células madre embrionarias de pollo o pato.

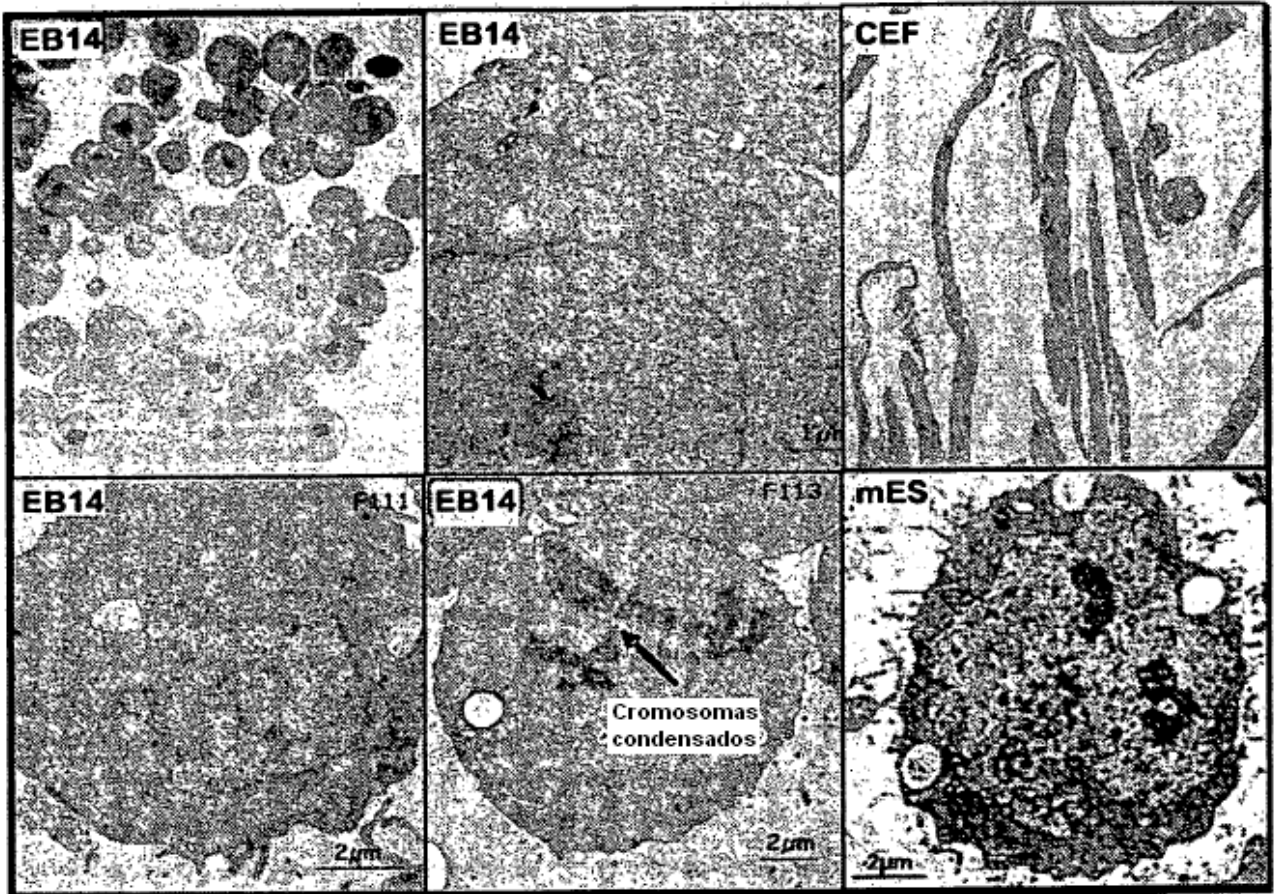


FIGURA 1

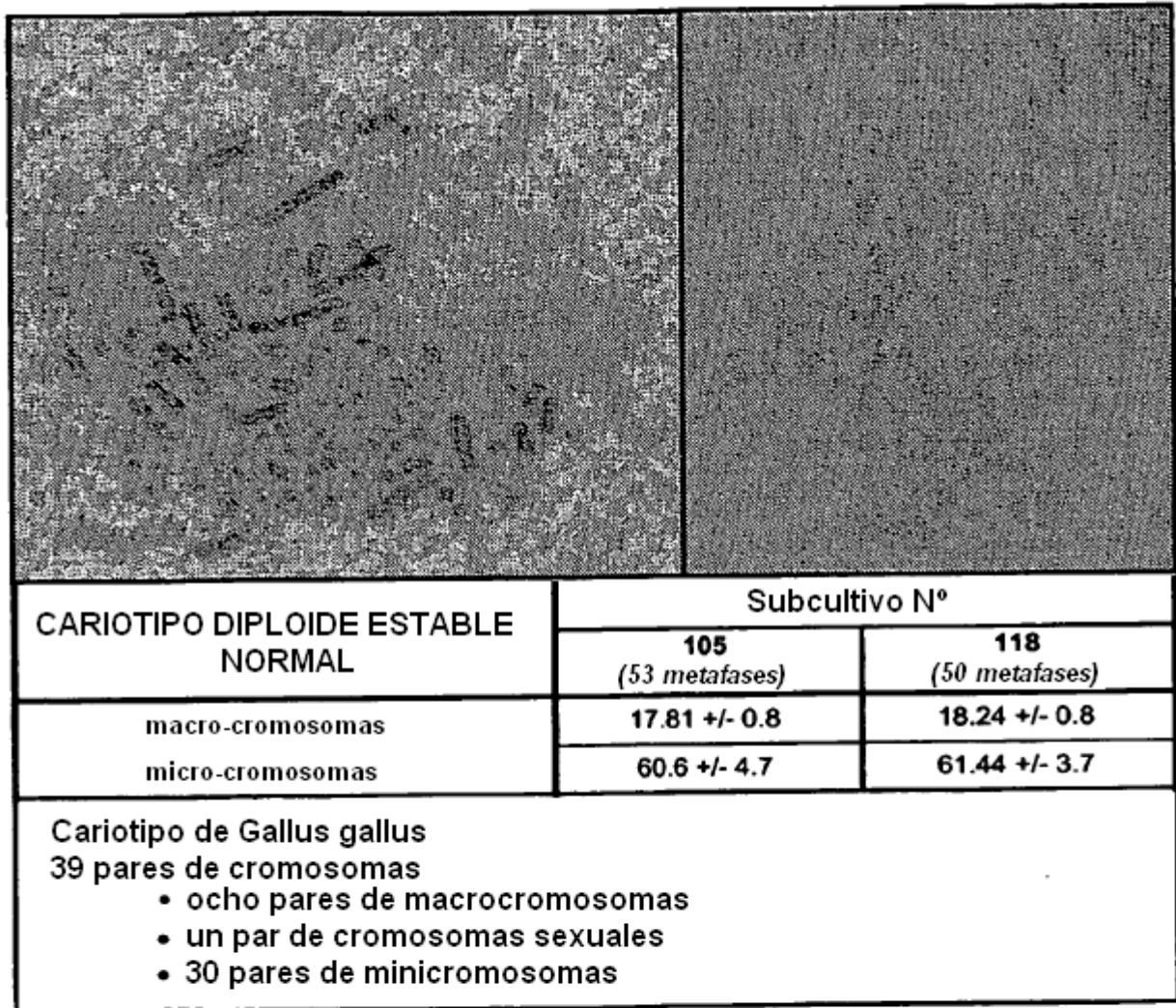


FIGURA 2

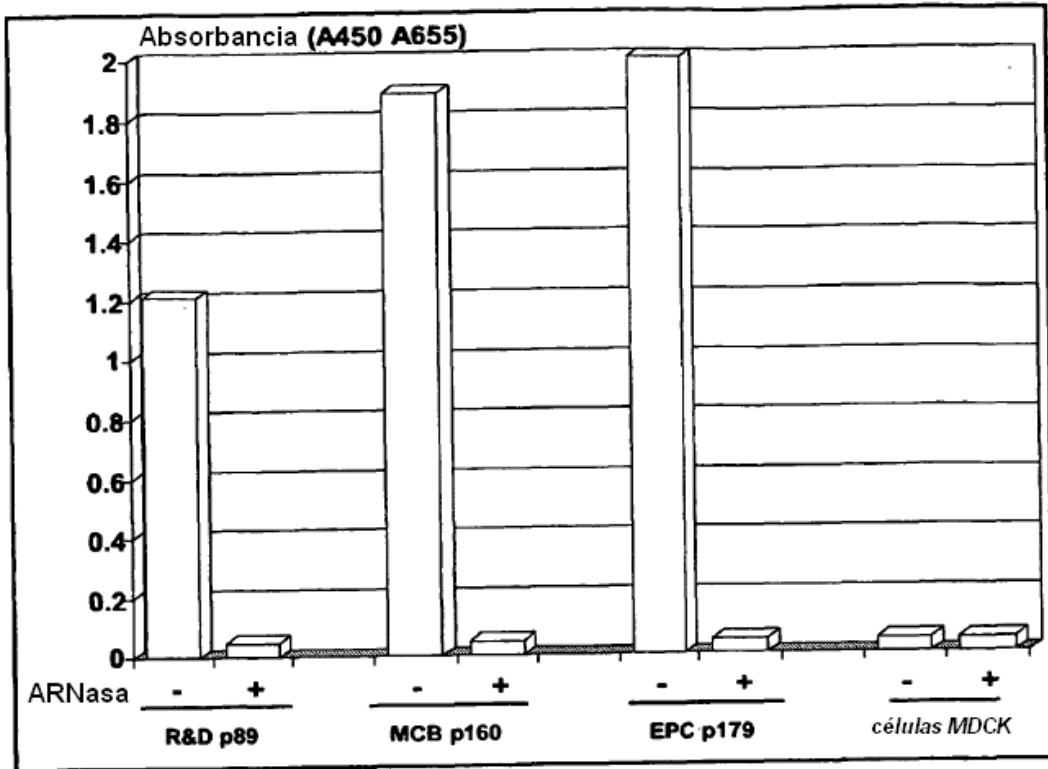


FIGURA 3

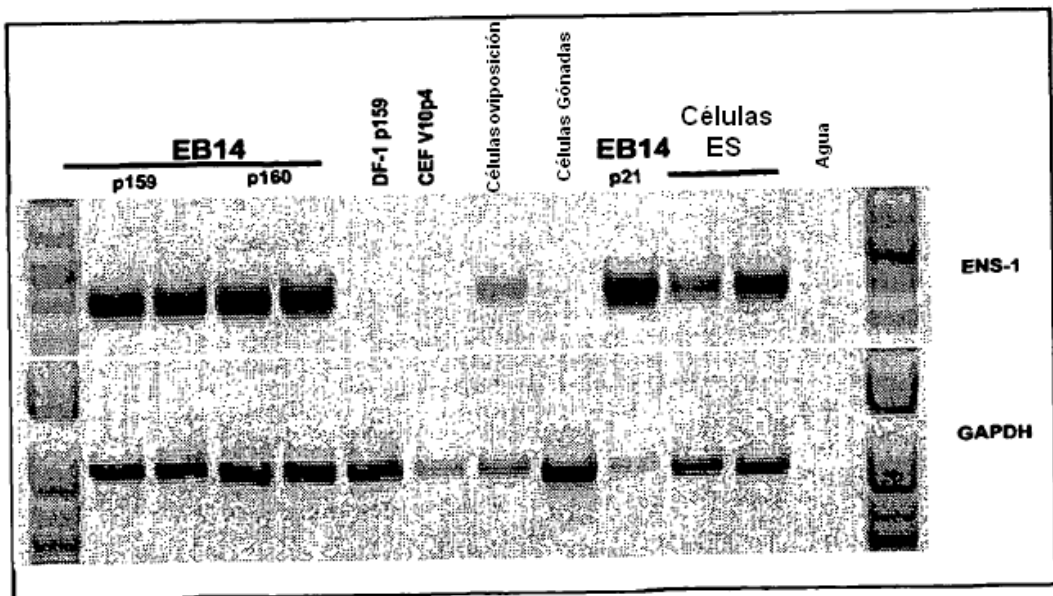


FIGURA 4

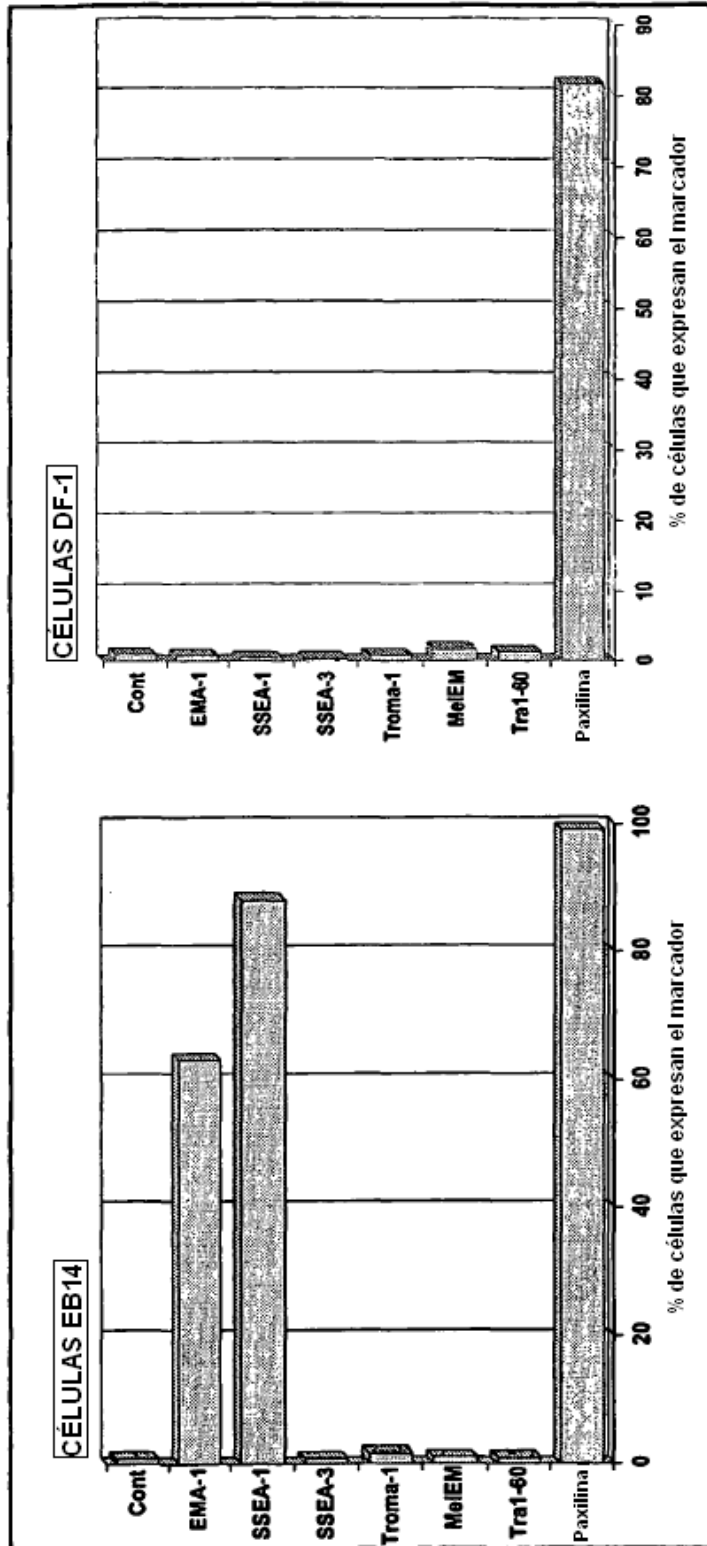


FIGURA 5

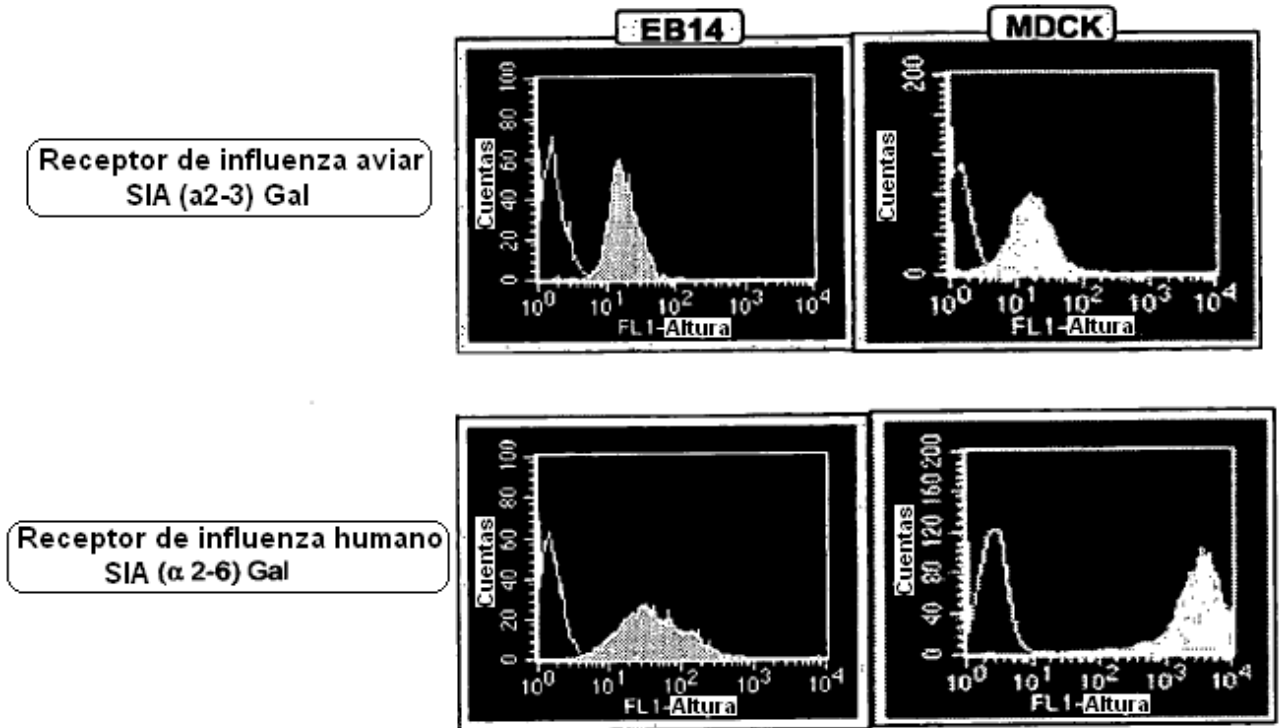


FIGURA 6



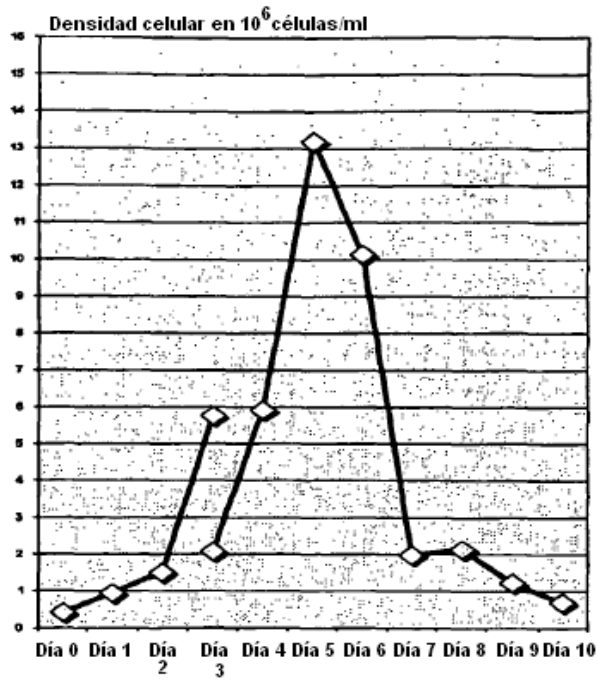


FIGURA 7A

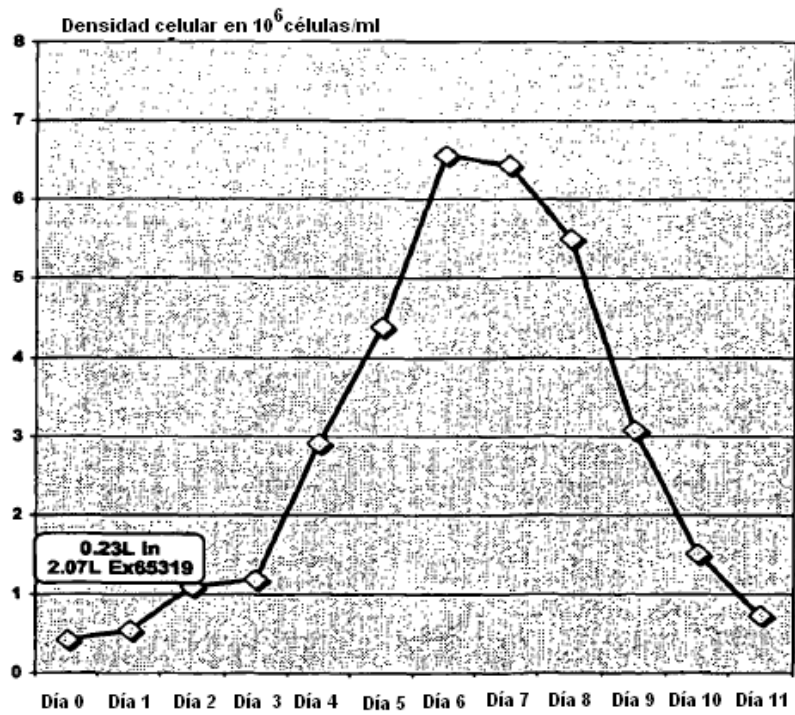


FIGURA 7B

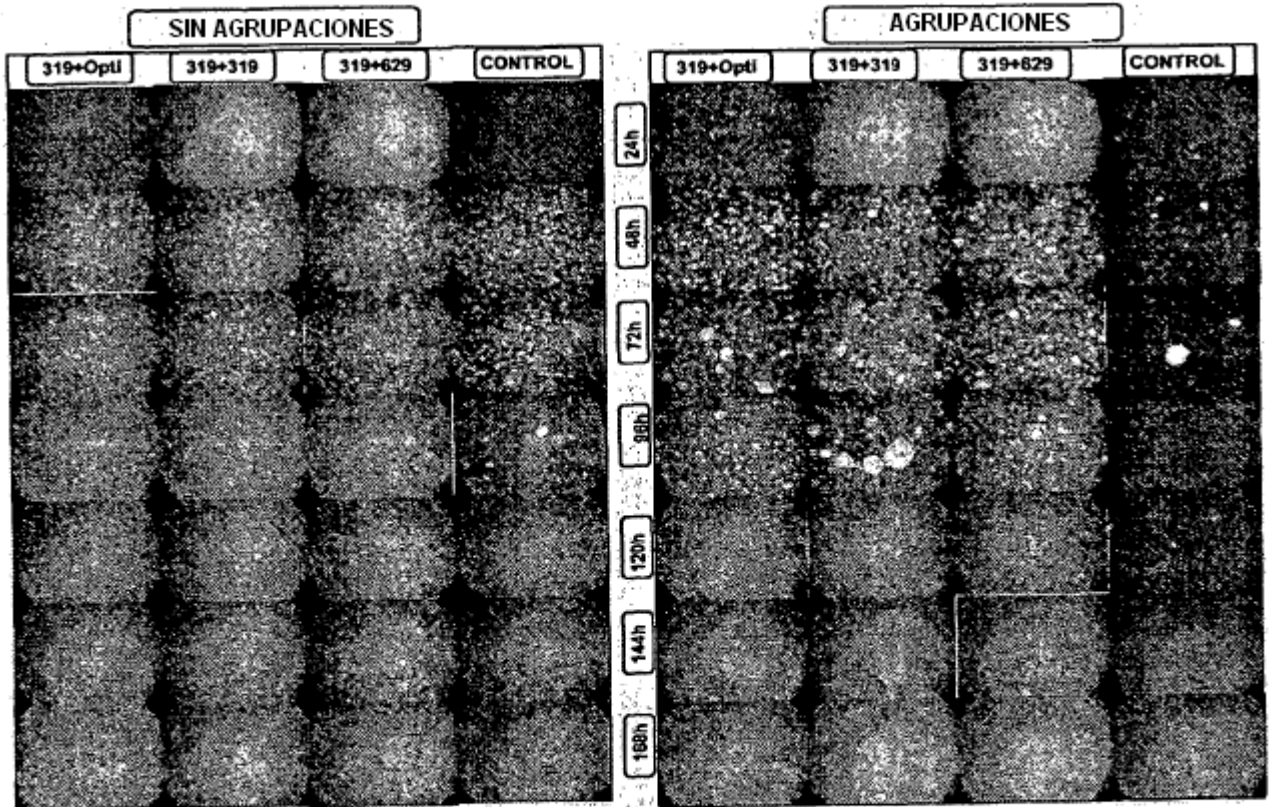


FIGURA 8

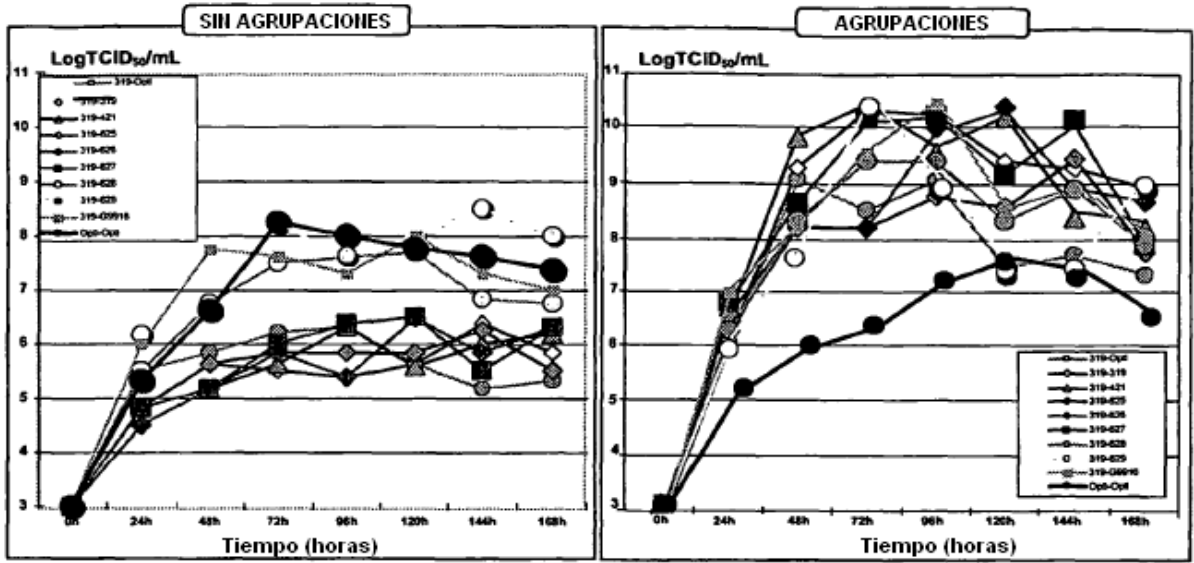


FIGURA 9

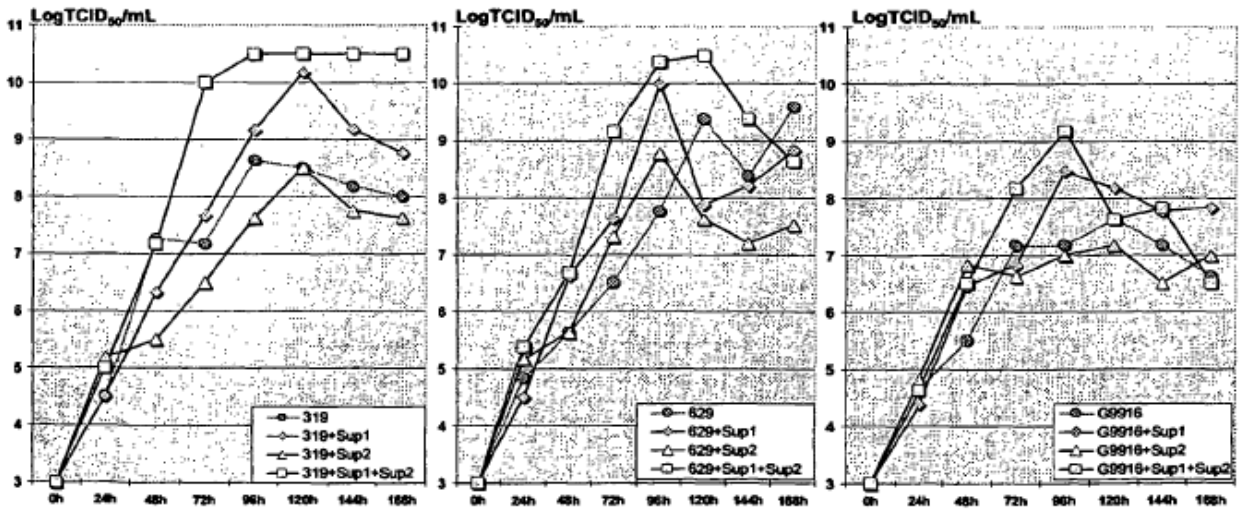


FIGURA 10

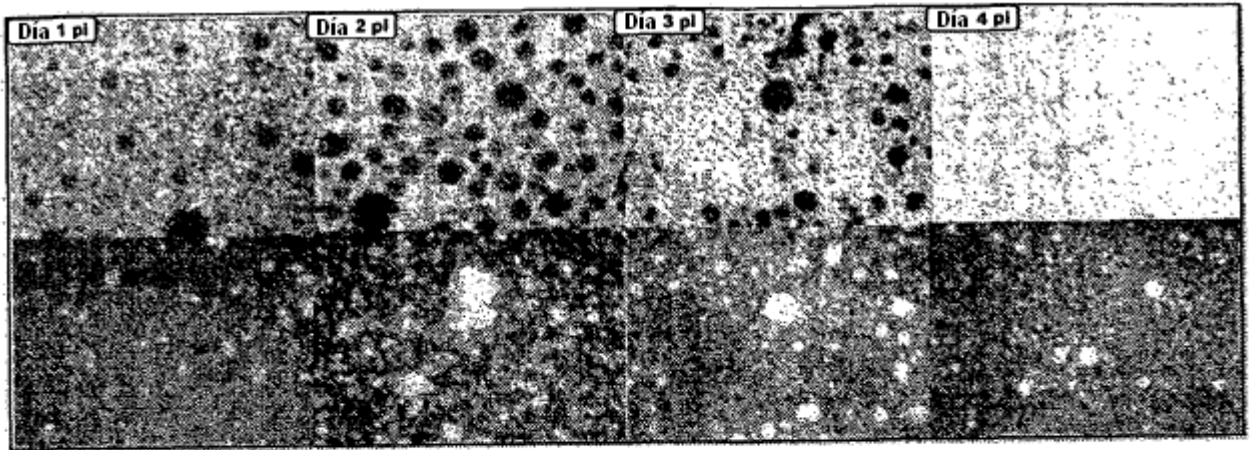


FIGURA 11

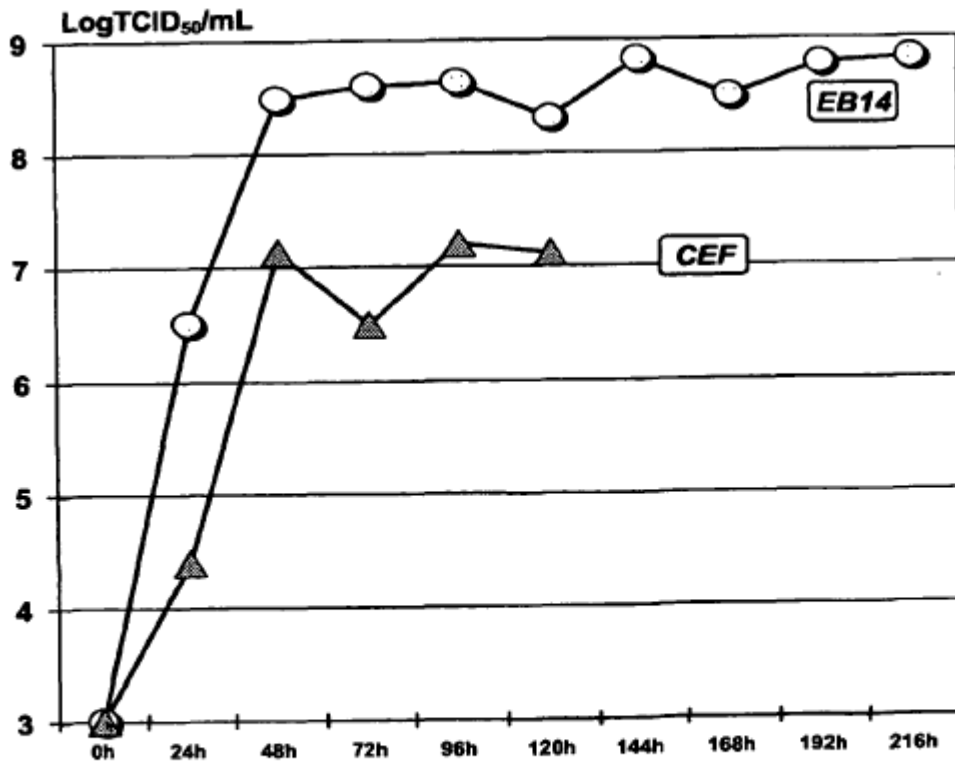


FIGURA 12

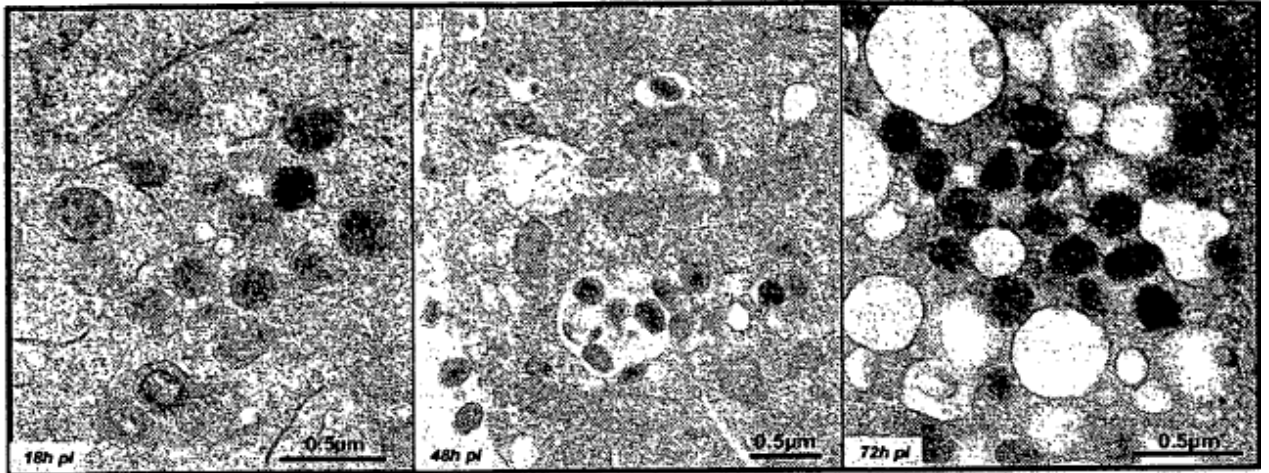


FIGURA 13

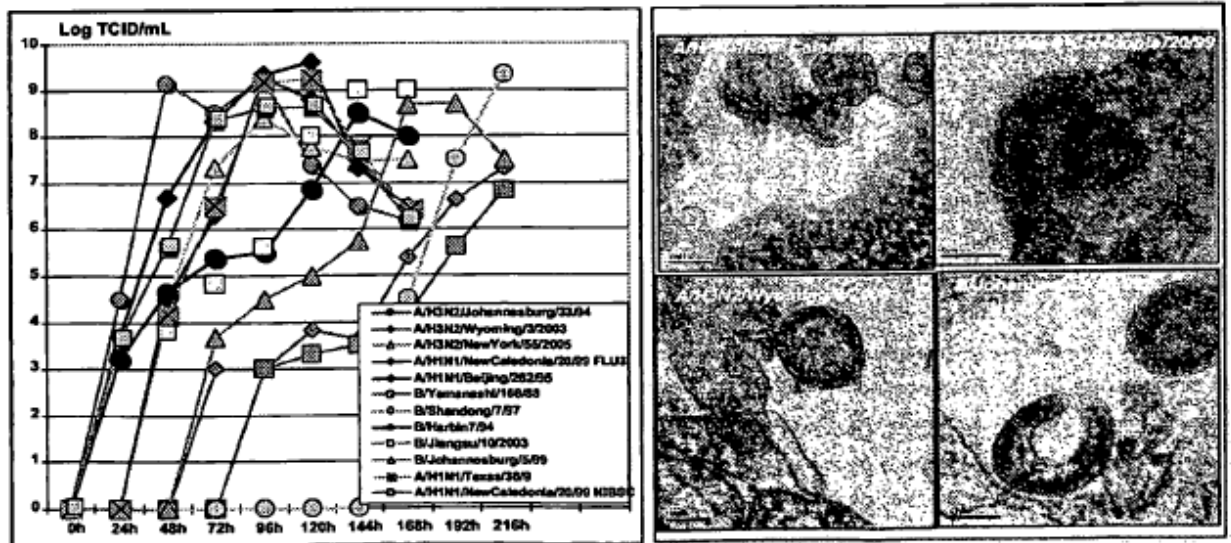


FIGURA 14

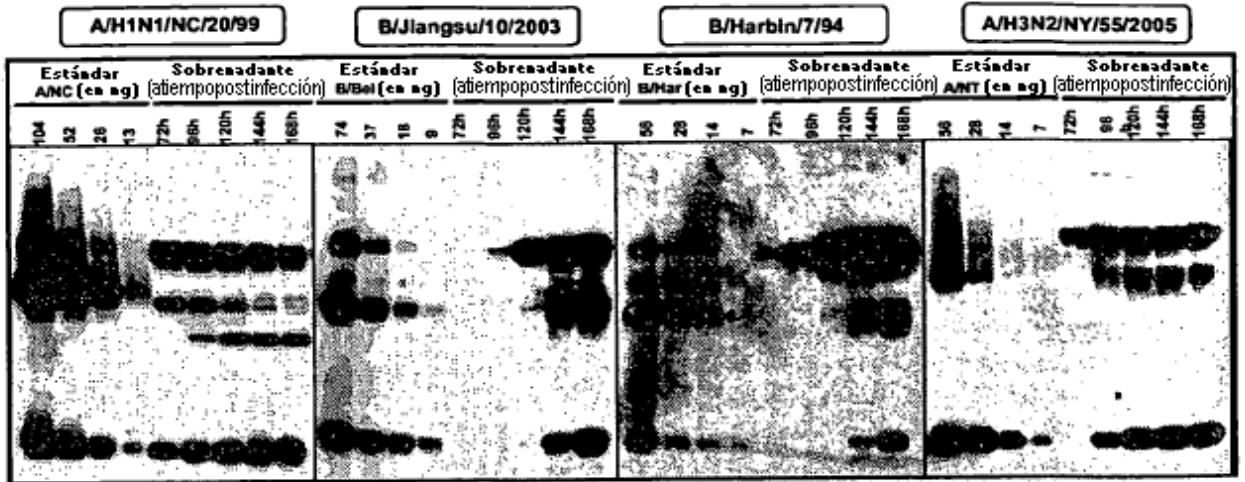


FIGURA 15A

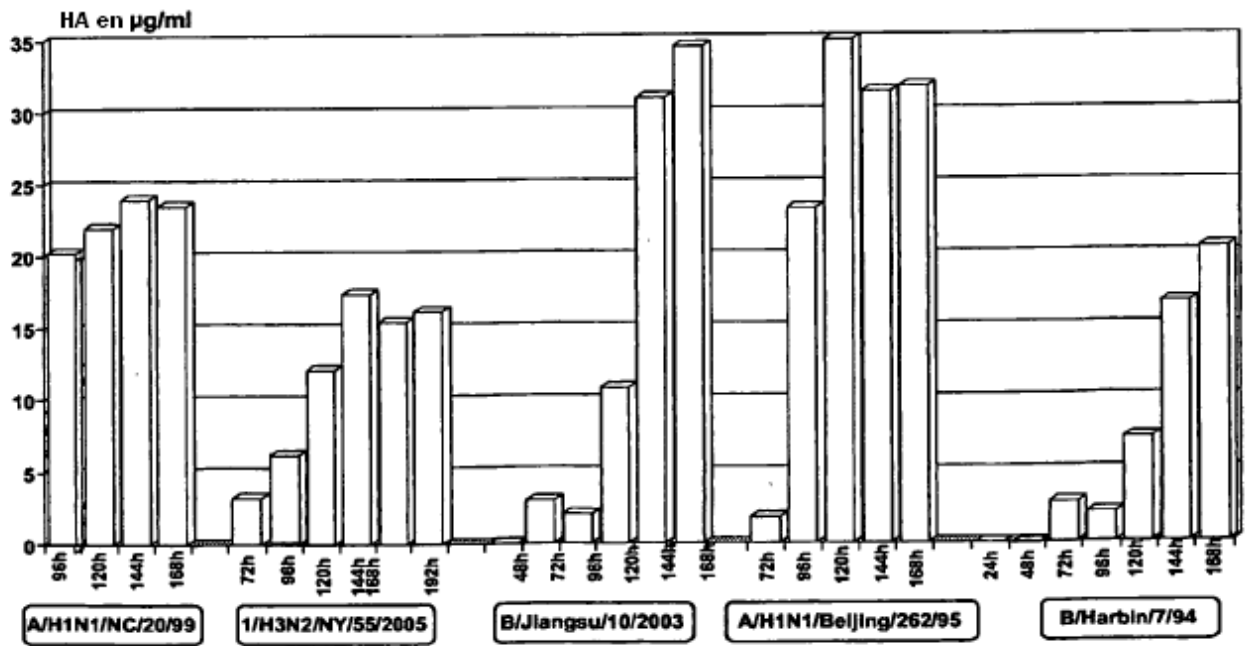


FIGURA 15B

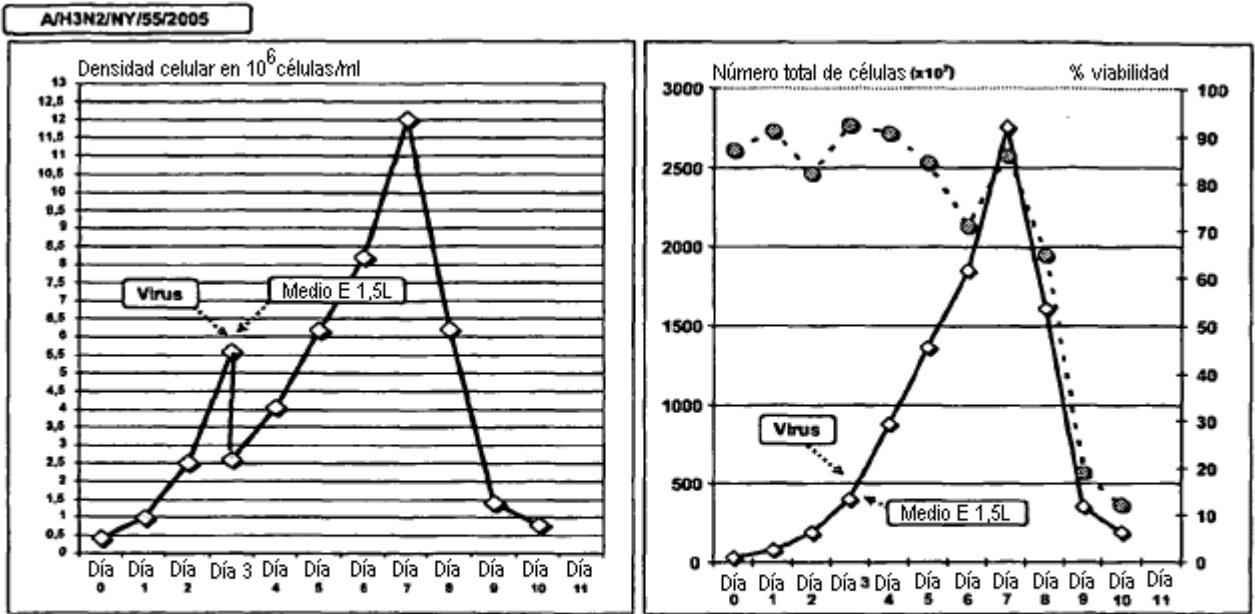


FIGURA 16A

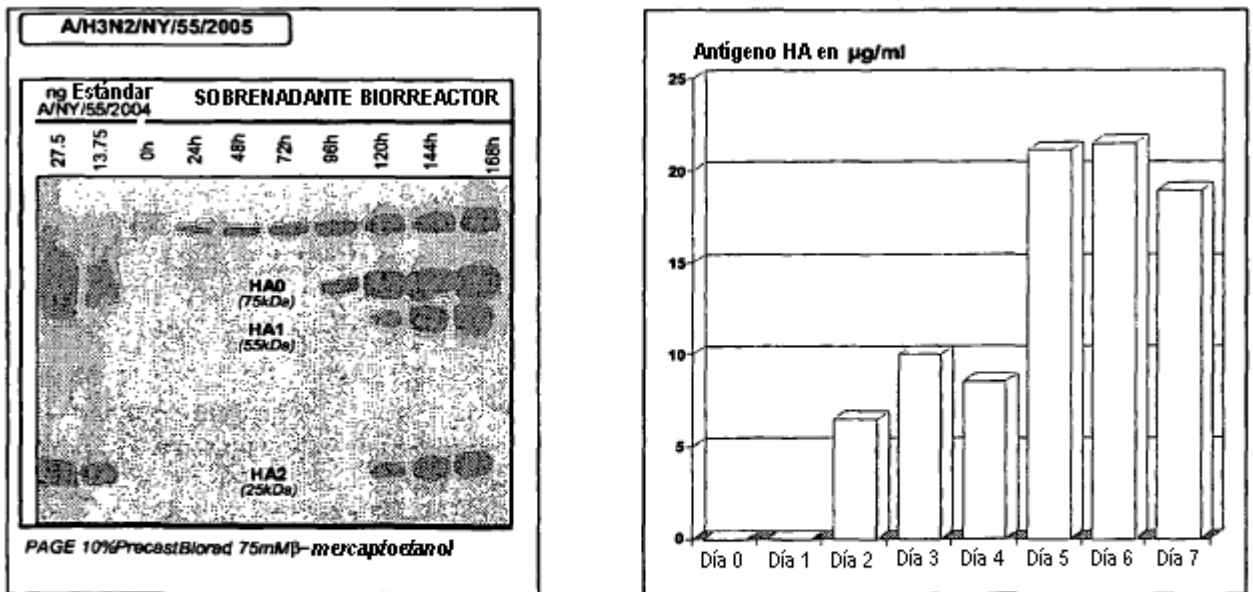


FIGURA 16B

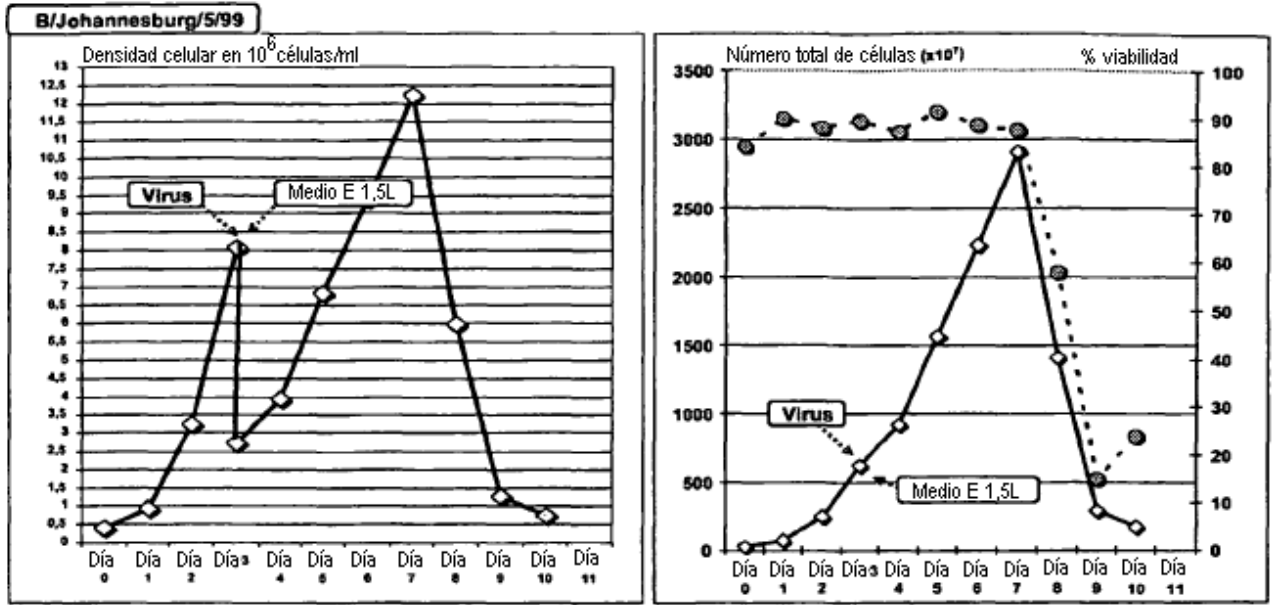
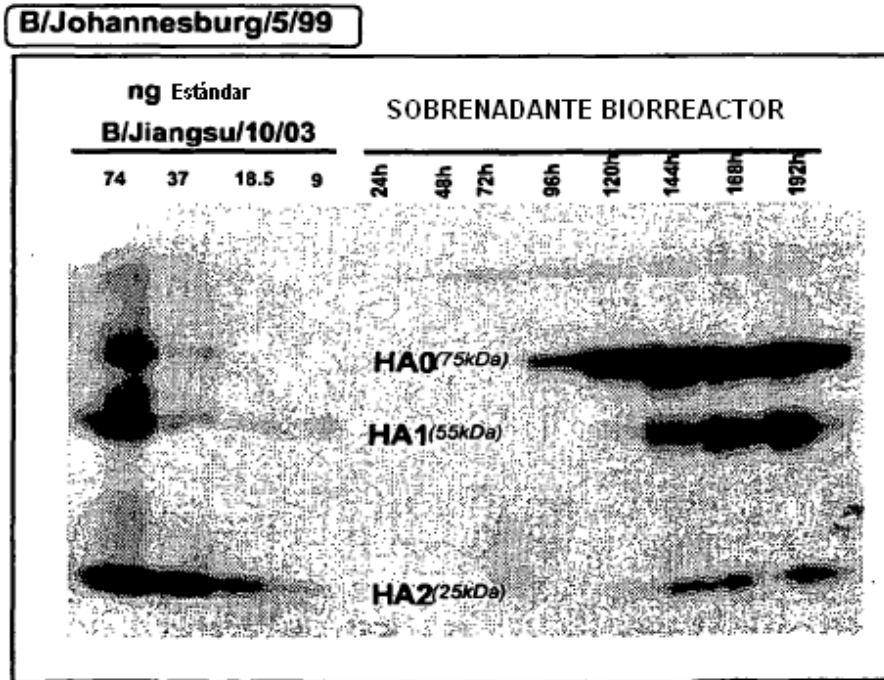


FIGURA 17A



PAGE 10% Precast Biorad, 75mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 4 $\mu$ L sobrenadante

FIGURA 17B



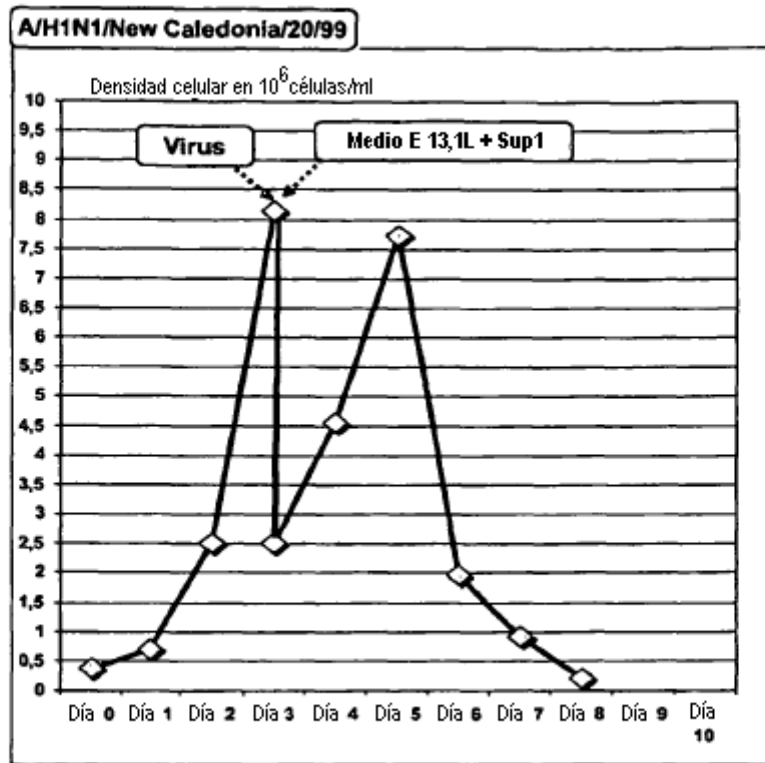


FIGURA 18A

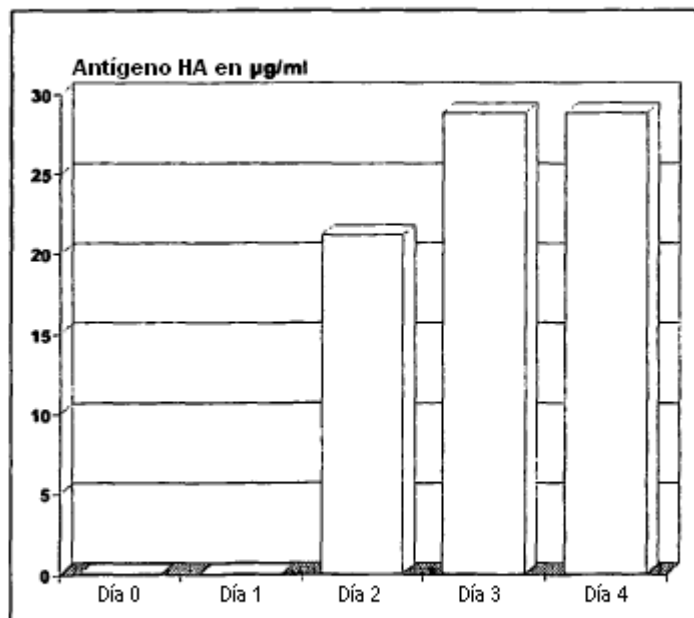
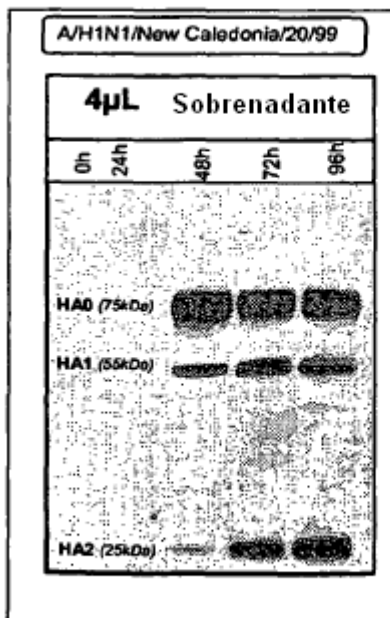


FIGURA 18B