

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 074**

51 Int. Cl.:

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2009 PCT/US2009/034732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09137146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009 E 09743133 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2257622**

54 Título: **Procedimiento de producción de líneas celulares continuas**

30 Prioridad:

25.02.2008 US 67174 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**NANOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
13200 NW Nano Court
Alachua, FL 32615, US**

72 Inventor/es:

**REITER, MANFRED;
MUNDT, WOLFGANG;
FEIGL, SIMONE y
VON FIRCKS, SIMONE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 628 074 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 producción de líneas celulares continuas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para producir líneas celulares.

5 Antecedentes de la invención

Las líneas celulares se han convertido en una valiosa herramienta para la fabricación de vacunas. La producción de algunas vacunas importantes y vectores víricos aún se realiza en huevos de gallina embrionados o en fibroblastos de embrión de gallina primarios. El tejido de ave primario para la multiplicación de virus se proporciona mediante plantas de producción SPF (libres de patógenos específicos). Los tejidos SPF derivados son costosos y la calidad del material de suministro es a menudo difícil de controlar. Por lo tanto, la inconsistencia y la escasez de suministro son las desventajas más predominantes de las tecnologías basadas en huevos SPF. Esto mismo se aplica a planteamientos en los que se usan cultivos de monocapa de fibroblastos primarios. Para multiplicar las líneas celulares de manera indefinida, se necesita inmortalizar las células. La mayoría de líneas celulares inmortalizadas actualmente en uso son descendientes de células cancerosas o de células de hibridomas fusionadas. Sin embargo, la última tecnología se limita a fusionar con células de mieloma. No existe tecnología general que pueda generar células inmortalizadas de distintos tipos.

Rhim J. S., Annals of the New York Academy of Sciences 2000, Vol. 919, páginas 16-25, describe que pueden inmortalizarse distintos tipos de células en diferentes condiciones de inmortalización.

Sumario de la invención

20 Es un objeto de la presente invención producir una célula continua a partir de material celular discontinuo. En particular, el fin era proporcionar líneas celulares continuas que tengan el potencial para proliferar sin la introducción de genes víricos exógenos.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de líneas celulares de ave continuas que comprende proporcionar células vivas de un animal o un ser humano, irradiar dichas células con luz UV, proliferar dichas células y seleccionar células capaces de proliferar tras al menos 20 pases como células de una línea celular continua sin la introducción de genes víricos exógenos.

Tal línea celular continua es cultivo celular que puede propagarse y usarse para la expresión recombinante de biomoléculas tales como proteínas, o para la fabricación de productos víricos tales como antígenos víricos o una población de virus completa, en particular, para fines de vacunación.

30 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento para producir virus que comprende producir una línea celular de ave continua de acuerdo con el procedimiento inventivo, infectar dichas células con dicho virus, propagar dicho virus en dichas células y recoger dicho virus.

En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para producir un producto de gen recombinante que comprende producir una línea de ave continua mediante el procedimiento inventivo, transfectar las células con un ácido nucleico que codifica dicho producto génico, expresar dicho producto génico y, opcionalmente, recoger dicho producto génico.

40 También se desvela una línea celular continua que puede obtenerse mediante el procedimiento de proporcionar células vivas de un animal o un ser humano, irradiar dichas células con una dosis eficaz de luz UV, hacer proliferar dichas células y seleccionar células capaces de proliferar tras al menos 20 pases como células de dicha línea celular continua.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el esquema del procedimiento de tratamiento UV.

La Fig. 2 muestra cultivos celulares de codorniz continuos.

La Fig. 3 muestra el árbol filogenético y la vía de tratamiento para producir una línea celular de codorniz continua.

45 La Fig. 4 muestra una correlación de la dosis de UV al tiempo de irradiación con la preparación usada para producir células continuas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una línea celular de ave continua a través del tratamiento UV de células.

50 Una línea celular es una población de células formada mediante uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se denomina como un pase. Cuando las células se subcultivan, se denomina que se han

5 sometido a pases. Una población de células específica, o una línea celular, puede caracterizarse por el número de veces que se ha sometido a pases. El cultivo primario es el primer cultivo tras el aislamiento de células del tejido. Tras el primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (pase uno). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (pase 2), etc. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchos duplicados de poblaciones durante el período de pases; por lo tanto, el número de duplicados de poblaciones de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de células (es decir, el número de duplicados de poblaciones) durante el período entre pases depende de muchos factores, que incluyen, pero no se limitan a, la densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento y tiempo entre pases. El cultivo puede realizarse mediante la inoculación de un medio celular, dejando que las células crezcan hasta que se forme un cultivo celular confluyente o una película continua por las células e inoculando un nuevo medio celular con una parte de las células confluentes. No obstante, el sometimiento a pases es una herramienta para evaluar la capacidad de propagación. Normalmente, las células, entre las que se incluyen células sin irradiar, aisladas de un tejido que puede someterse a pases aproximadamente 10-20 veces hasta que alcanzan un estado en el que no se produce ninguna propagación o duplicado celular adicional. Las células entran a continuación en un estado de senescencia a partir del cual no pueden obtenerse subcultivos adicionales. Al contrario del mismo, las líneas celulares continuas son capaces de propagarse después de más de 20 pases, tal como después de 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 pases. Los inventores han descubierto ahora que tal línea celular continua que puede someterse a pases múltiples veces después del 20º pase, en células inmortalizadas en particular, puede obtenerse a través de la alteración de células mediante tratamiento UV, es decir, irradiando dichas células con una dosis eficaz de luz UV. Los términos "dosis eficaz de luz UV" de acuerdo con la presente invención debe ser la cantidad de irradiación necesaria para transformar las líneas celulares discontinuas en líneas celulares continuas. La dosis eficaz de luz UV va desde la dosis mínima necesaria para tales transformaciones hasta la dosis máxima que estas células toleran sin consecuencias letales para el cultivo celular en su conjunto. Está claro que por encima o por debajo de los límites de dosis eficaz no pueden obtenerse líneas celulares continuas. El experto en la materia puede determinar fácilmente las dosis eficaces óptimas para cada línea celular basándose en la información y orientación contenida en el presente documento con optimización rutinaria. Las células pueden ser células primarias o células capaces de propagarse tras unos pocos pases. El cultivo de líneas celulares puede realizarse con técnicas de cultivo celular convencionales, tales como en sistemas de matraz T o sistemas de frasco rotatorio, o en un tanque con agitación u otros formatos de biorreactores. En varias realizaciones de la invención, el cultivo se adapta a y mantiene en condiciones libres de suero.

En la presente solicitud la expresión "luz UV" significa radiación ultravioleta que tiene una longitud de onda de desde 10 a 400 nm, en particular 100 a 400 nm. La luz UV puede seleccionarse del grupo que consiste en UV C (100 a 280 nm), UV B (280 a 320 nm) y UV A (320 a 400 nm). En algunas realizaciones de la invención, la longitud de onda es de entre 200 y 300 nm. Pueden usarse agentes fotosensibilizantes tales como aquellos que se intercalan en el ADN y que se activan mediante luz UV para aumentar el efecto de alteración de la radiación UV, aunque no son necesarios en todas las realizaciones de la invención. En una realización de la presente invención la luz UV es UV C y tiene una longitud de onda de desde aproximadamente 100 a aproximadamente 280 nm. En otra realización de la presente invención la luz UV tiene una longitud de onda de desde aproximadamente 240 a aproximadamente 290 nm. En otra realización de la presente invención aproximadamente el 85 % o más de la luz UV tiene una longitud de onda de aproximadamente 254 nm.

Sin estar sujeto a ninguna teoría se cree que la luz UV altera el material genético de una célula, lo que introduce mutaciones. Aunque tales alteraciones pueden repararse generalmente mediante los mecanismos de reparación de células, algunas alteraciones pueden permanecer. Estas alteraciones pueden introducir mutaciones letales y también alteraciones que dan como resultado la inmortalización celular. A partir de experimentos de irradiación UV puede seleccionarse una dosis óptima lo que da como resultado que una parte significativa de células se inmortalice y pueda cultivarse. Tras el sometimiento a pases, se cree que únicamente se seleccionan las células viables que son capaces de multiplicarse, que se espera que tengan únicamente alteraciones mínimas con al menos una alteración lo que da como resultado la inmortalización. Una parte significativa de las células irradiadas no se inmortalizarán sino que conseguirán distintas alteraciones, dando lugar a células apoptóticas o necróticas. Sin embargo, en principio, es suficiente únicamente una célula con la alteración que induce la inmortalización para obtener un cultivo celular continuo, ya que esta célula continuará propagándose y sobrevivirá a través de las múltiples rondas de pases como se describe en el presente documento.

La emisión de luz UV puede ser una emisión de luz UV de forma continua, por ejemplo, tecnología de lámpara de mercurio, o luz UV pulsada, por ejemplo, tecnología de láser monocromático. La intensidad de UV deseada puede generarse mediante la combinación de dos o más lámparas. Al menos dos procedimientos de irradiación pueden combinarse con una pausa entre ellos. La materia objeto de la invención abarca cualquier dosis eficaz de luz UV, es decir, cualquier dosis de luz UV que altere una célula para que prolifere continuamente. La dosis eficaz puede depender de una diversidad de factores que se conocen generalmente en el ámbito, por ejemplo, los parámetros físicos de las cámaras de irradiación UV, tales como el tamaño y diámetro de la lámpara y la cámara, la distancia entre el medio que contiene las células y la fuente de luz UV, las propiedades de absorción y reflejo de la luz del material de la cámara. En realizaciones particulares de la invención, las células se irradian en una monocapa, una capa celular sobre una superficie. Del mismo modo, la intensidad de onda e intensidad de la luz UV así como el tiempo de contacto que la célula está expuesta a la luz UV son también críticas para la dosis eficaz. Además, la

dosis eficaz también se ve influenciada por la célula misma, el medio que contiene el virus y sus propiedades de absorción de la luz. En diversas realizaciones de la invención, la dosis eficaz es suficiente para alterar al menos un 20 % 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 % o 100 % de las células contenidas en la muestra, y en otras realizaciones la dosis eficaz es suficiente para alterar las células a un nivel en el que al menos el 10% de las células se ven alteradas también para crecer continuamente. Del 10 % al 90 % de las células morirán por la irradiación. En ciertas realizaciones de la invención, una muestra que contiene las células se expone a una dosis eficaz de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 mJ/cm². En algunas realizaciones la dosis eficaz es hasta aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 180, 150, 130 o 105 mJ/cm². En realizaciones particulares de la invención, la dosis de UV es de entre aproximadamente 70 y 105 mJ/cm². En algunas realizaciones, estas dosis se emplean mediante luz UV C. El término "aproximadamente" se refiere a la propiedad de lámparas UV comunes que no proporcionan una luz UV aislada a una única longitud de onda (como en los láseres) sino que tienen un espectro en forma de gauss que también emite luz en longitudes de onda cercanas. En realizaciones que usan algunas de estas lámparas, "aproximadamente" se refiere a la desviación del valor de longitud de onda del 10%.

Antes o después de la irradiación o el sometimiento a pases, la línea celular puede seleccionarse adicionalmente para cumplir los criterios de control de calidad tales como esterilidad, ausencia de contaminación por micoplasma, ausencia de contaminación vírica accidental, y/o pasar la prueba de F-Pert para la presencia de actividad transcriptasa inversa, así como otros criterios de control de calidad usados en la técnica para seleccionar líneas celulares para usos de biotecnología médica. En este sentido "ausencia de" debe entenderse como que las contaminaciones se ven reducidas por debajo del límite de detección de los procedimientos de pruebas de calidad actuales. Ya que la tecnología actual puede generar líneas celulares continuas sin el uso de vectores víricos o la introducción de retrovirus, las líneas celulares inventivas a menudo no tienen ninguna actividad retroviral, como puede probarse mediante un ensayo para actividad transcriptasa inversa. Sin embargo, tal actividad retroviral puede introducirse de forma específica en líneas celulares de la invención mediante técnicas de ingeniería molecular para fines de, por ejemplo, producción de virus o proteínas en las líneas celulares.

La línea celular puede ser de cualquier célula eucariota, particularmente de un organismo superior, tal como en células de pez, de ave, de reptil, de anfibio o de mamífero e incluso células de insecto o de planta. Algunas realizaciones usan células de mamífero tales como de hámster, ratón, rata, perro, caballo, vaca, primate o ser humano; otras realizaciones usan células de aves tales como de gallina, pato, canario, loro, codorniz, avestruz, emú, pavo o ganso. En general, cualquier especie de ave puede ser una fuente de células de ave para su uso en la invención. En algunas realizaciones, es ventajoso utilizar una especie menos frecuentemente domesticada (tal como una codorniz o un emú) para evitar la posible contaminación de tejidos de reserva con virus prevalentes en especies más comúnmente domesticadas (tales como gallinas).

Las células irradiadas pueden ser de cualquier tipo de tejido. En algunas realizaciones el tejido se obtiene de un embrión. En muchas realizaciones, se usa un cultivo mezclado de más de un tipo de tejido, como puede obtenerse mediante la desintegración de tejido o de varios tejidos. En realizaciones adicionales las células son del cordón umbilical de un embrión. Las células irradiadas puede ser el/los tejido(s) puede(n) ser o incluir, por ejemplo, células endoteliales, células epiteliales, células madre pluripotentes o totipotentes, células madre embrionarias, células neuronales, células renales, células hepáticas, células musculares, células de colon, leucocitos, células pulmonares, células de ovario, células cutáneas, células de bazo, células estomacales, células tiroideas, células vasculares, células pancreáticas y/o células precursoras de las mismas y combinaciones de las mismas.

En muchas realizaciones las células se unen a una superficie durante la irradiación o durante el cultivo. El cultivo sobre una superficie es especialmente adecuado para células endoteliales, en el que las células pueden seleccionarse adicionalmente para cumplir criterios de calidad adicionales tales como su capacidad para formar monocapas, que puede verse obstaculizado si la dosis de UV introduce demasiada alteración perjudicial. Sobre tal superficie las células pueden formar monocapas. En particular las células se cultivan o irradian en un microportador. De modo alternativo, las células también pueden irradiarse o cultivarse o ambos en suspensión. Las células que se han irradiado o cultivado inicialmente sobre una superficie pueden adaptarse a continuación para crecer en cultivo en suspensión.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para producir un virus que comprende proporcionar células de una línea celular continua que se puede obtener mediante el procedimiento inventivo, infectar dichas células con dicho virus, propagar dicho virus en dichas células y recoger dicho virus.

En la presente invención, los virus para producir se seleccionan de virus de ADN o ARN con envoltura o sin envoltura, con genomas monocatenarios o bicatenarios (ADN), sentido o antisentido, continuos o segmentados. Los virus pueden seleccionarse del grupo que consiste en baculovirus, poxvirus, adenovirus, papovavirus, parvovirus, hepadnavirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, astrovirus, picornavirus, retrovirus, ortomixovirus, filovirus, paramixovirus, rabdovirus, arenavirus y bunyavirus. En algunas realizaciones de la invención, los virus se seleccionan del grupo de virus con envoltura, entre los que se incluye, flavivirus, togavirus, retrovirus, coronavirus, filovirus, rabdovirus, bunyavirus, ortomixovirus, paramixovirus, arenavirus, hepadnavirus, herpesvirus y poxvirus. En otras realizaciones, los virus son virus con envoltura tales como gripe, entre los que se incluye gripe A, B o C, virus del Nilo Occidental, virus de vaccinia, virus de vaccinia modificado o virus del río Ross. En otras realizaciones de la

invención, los virus se seleccionan del grupo de virus de ARN con envoltura, entre los que se incluye, flavivirus, togavirus, retrovirus, coronavirus, filovirus, rabdovirus, bunyavirus, ortomixovirus, paramixovirus y arenavirus. En realizaciones particulares el virus es MVA (virus vaccinia Ankara modificado), virus TBE (encefalitis transmitida por garrapatas), virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, virus de Nueva Caledonia o un virus de la gripe.

- 5 Tras la etapa de recolección, el virus puede desactivarse mediante cualquier medio conocido para la desactivación de virus, por ejemplo, como se desvela en el número de publicación de EE.UU. 2006/0270017 A1, la cual se incorpora en el presente documento por referencia. En particular, puede realizarse desactivación mediante tratamiento de formaldehído y/o irradiación UV, solo o en combinación.

10 En general, sustancias de suero o derivadas de suero, tales como, por ejemplo, albúmina, transferrina o insulina, pueden comprender agentes no deseados que pueden contaminar los cultivos celulares y los productos biológicos obtenidos de los mismos. Además, los aditivos derivados de suero humano deben probarse para todos los virus conocidos, incluyendo virus de hepatitis y VIH que pueden transmitirse vía suero. Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones del procedimiento inventivo, las células de la línea celular se adaptan para crecer en un medio sin suero, por ejemplo, se seleccionan por su capacidad de crecer en un medio sin suero. El medio puede estar sin suero o fracciones de suero, o también en general sin componentes sanguíneos. El medio para estas realizaciones de la invención se selecciona a partir de F12 de DMEM/HAM, RPMI, MEM, BME, medio de Waymouth, en particular un medio sin oligopéptidos o proteínas tal como se describe en el documento US 2007/0212770 que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, o una combinación de los mismos. Dicho medio sin oligopéptidos puede estar sin proteínas sanguíneas u oligopéptidos con un tamaño superior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 aminoácidos pero puede comprender glutatión. El medio sin proteínas está sustancialmente sin proteínas pero puede contener proteínas producidas por las líneas celulares o proteasas. En particular, el medio también puede comprender una poliamida como agente promotor del crecimiento y/o ser un medio definido químicamente tal como se describe en el documento US 2007/0212770. La expresión "definido químicamente" significa que el medio no comprende ningún suplemento no definido, tales como, por ejemplo, extractos de componentes animales, órganos, glándulas, plantas o levadura. Por consiguiente, cada componente de un medio definido químicamente se define con precisión. Los medios definidos químicamente están sustancialmente sin proteínas, o hidrolizados celulares, pero pueden contener proteínas producidas por la línea celular o proteasas. Ejemplos de tales medios se proporcionan en "A guide to Serum-Free Cell Culture", GIBCO cell culture (2003) disponible la WWW en www.invitrogen.com/content/sfs/brochures/332-032442_SFMBrochure.pdf.

30 Estos medios, incluyendo el medio sin suero, el medio sin oligopéptidos o el medio definido químicamente, también comprenden glutatión y/o proteasas, en particular tripsina tal como tripsina porcina o recombinante antes o después de la inoculación de virus (Klenk y col. (1975) *Virology*, 68: 426-439). Tales proteasas también pueden necesitarse durante el cultivo de las líneas celulares ya que las células unidas a una superficie muestran desde una fuerte a muy ligera adherencia. Pueden separarse células unidas fuertemente por proteasas y/o agentes quelantes tales como EDTA (Doyle y col. Capítulo 4: Core Techniques, en: *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, ECACC, John Wiley & Sons, Chichester (1996)). Adicionalmente el medio, en particular el medio sin proteínas, puede comprender hidrolizados de planta o levadura antes o después de la inoculación. Por supuesto se espera que el medio comprenda proteínas o productos metabólicos producidos por las líneas celulares inventivas.

40 Las líneas celulares que se pueden obtener mediante el procedimiento inventivo son generalmente no tumorigénicas y/o no cancerígenas. En algunas realizaciones las células de las líneas celulares se prueban y seleccionan para pasar la prueba de calidad tal como la prueba de F-pert.

45 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento para producir un producto de gen recombinante que comprende proporcionar células de una línea celular continua que puede obtenerse mediante el procedimiento inventivo, transfectar las células con un ácido nucleico que codifica dicho producto génico, expresar dicho producto génico y opcionalmente recoger dicho producto génico. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o APN. Además del gen, el ácido nucleico puede comprender promotores para la expresión en la célula y marcadores de selección.

50 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una línea celular continua que puede obtenerse mediante el procedimiento de proporcionar células vivas de un animal o un ser humano, irradiar dichas células con una dosis eficaz de luz UV, hacer proliferar dichas células y seleccionar células capaces de proliferar tras al menos 20 pases como células de dicha línea celular continua. Las líneas celulares inventivas también incluyen la descendencia de tales líneas celulares producidas. En particular, la línea celular se define como obtenible mediante las realizaciones del procedimiento descrito en el presente documento. Las líneas celulares continuas obtenibles pueden tener rasgos característicos tales como actividad telomérica de cariotipos específicos asociados con la irradiación UV necesaria para producir la línea celular continua. En realizaciones particulares de la invención, las células de la línea celular son no tumorigénicas y/o no cancerígenas y, en particular, también pasan pruebas de calidad tales como la prueba F-pert.

60 En realizaciones particulares la línea celular es una línea celular depositada en la ECACC con el número de acceso de depósito 08020602, 08020603 o 08020604 que corresponden a las referencias de solicitud QOR/RE07-169, QOR1 CJ07 y CORECB/SF08-06, respectivamente. Líneas celulares inventivas adicionales tienen los rasgos

característicos, como capacidad de propagación, patrón de ciclo celular, actividad telomerasa, cariotipo, patrón de cromosoma o longitud de los telómeros como dichas líneas celulares depositadas y por supuesto ser una línea celular continua.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos sin quedar limitados a los mismos.

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Radiación temporalmente distinta de células Vero con luz UV para producir mutantes

Materiales:

Medio de TC de Vero
 Tampón N1
 Tripsina (dilución 1:10)
 Inhibidor de tripsina
 placas de 6 pocillos, Corning Cat. N.º 3516 25cm² de
 matraz T, Nunc Cat. N.º: 163371 lámpara UV, VL
 50C, Rejilla tubular 240 nm, 50 W, empresa Vilber-
 Lourmet

Procedimiento:

10 La preparación se realiza en placas de 6 pocillos con 1x10⁶ células/pocillos y 5 ml de volumen de medio (en preparación doble). Se preparan un total de 7 placas (cada vez 2 pocillos/placa).

Después de 24 h había un buen cultivo de monocapa.

Los 5 ml de medio se drenaron a 1 ml y las placas abiertas se irradiaron con luz UV (distancia de las placas de la lámpara UV = 9 cm)

placa A: 15 min
 placa B: 30 min
 placa C: 45 min
 placa D: 60 min
 placa E: 90 min
 placa F: 120min
 placa G: control, sin irradiación

15 Tras la irradiación, las células de ambos pocillos se tripsinizan (1 ml de tripsina + 0,5 ml de inhibidor de tripsina/pocillo), en el que las células del 1^{er} pocillo se usan para determinar el recuento celular (CC) y viabilidad, y las células del 2^o pocillo se someten a pases en 25 cm² de roux con 10ml de medio.

Prueba n.º	Tiempo de irradiación	TCC/pocillo [x10 ⁶]	Bürker- Turk viab. [%]
A	15 min	1,50	60,8
B	30 min	1,25	27,9
C	45 min.	1,15	5,6
D	60 min	0,95	23,6
E	90 min	0,55	no determinado
F	120min	0,30	no determinado
G	control	1,25	94,2

Se tripsinizó, el contenido del matraz T 25 el TCC y la viabilidad se determinan usando Cedex:

Prueba n.º	TCC/Roux [x10 ⁶]	Viab. [%]	Imagen de microscopía
A	0,80	23,2	células esferoidales, sin adherencia
B	0,60	18,8	células en el sobrenadante, sin adherencia
C	0,60	34,4	células individuales en el sobrenadante, sin adherencia

(continuación)

Prueba n.º	TCC/Roux [x106]	Viab. [%]	Imagen de microscopía
D	0,50	25,0*	solo restos celulares restantes
E	0,50	22,7*	solo restos celulares restantes
F	0,40	11.1*	solo restos celulares restantes
G	1,80	96,6	buena monocapa, 95-100 %
* ¡los valores reales son inferiores ya que el recuento celular en el Cedex es demasiado bajo para la determinación de recuento celular correcto!			

Ejemplo 2: Irradiación UV de células de ave

El objeto de este estudio era investigar el uso potencial de tratamiento con luz UV como herramienta para la generación de líneas celulares continuas adecuadas para la producción de vacunas.

5 Embriones de gallina y de codorniz primarios se usaron como material de partida para la producción de cultivos de monocapa primarios iniciales. Se usaron cultivos celulares de calidad controlada derivados de los mismos para el procedimiento de derivación basado en la exposición a luz UV.

Exposición de células primarias a luz UV (254 nm). La línea celular continua se desarrolló a partir de células primarias de embriones de codorniz cotuí o gallinas por medio de irradiación UV.

10 El recorrido detallado de desarrollo de la línea celular derivada a partir de células primarias de embriones de codorniz hasta la producción de bancos de seguridad se ilustra en la fig. 3 en forma de un árbol filogenético.

Como material de partida para la irradiación UV, en cada caso se descongeló una ampolla de los bancos celulares de la primera evaluación (gallina, codorniz japonesa y codorniz cotuí) que se origina a partir de la preparación celular de los embriones de la gallina, embriones de la codorniz japonesa y de la codorniz cotuí (cultivo mezclado de embriones completos desintegrados).

15 La preparación para la irradiación UV se realizó en placas de 6 pocillos con una siembra de células de 1x10⁶ células/pocillo y 5 ml de volumen de medio. El medio TBE (FSME) con un 5 % de FBS y antibióticos (penicilina, estreptomycin y gentamicina) se usaron como medio. Se preparó un total de 7 placas con 2 pocillos/placa cada una. Tras 24 h., se pudo observar en los pocillos un cultivo de monocapa uniforme. Para la irradiación de las células, los 5 ml de medio se drenaron a 1 ml y las placas abiertas se irradiaron con luz UV en el banco de flujo laminar del siguiente modo. La distancia de las placas de la lámpara UV era de 9 cm. Se usó una lámpara UV de la empresa Vilber-Lourmet (VL 50C, Rejilla tubular 240 nm, 50 W) como fuente de luz UV.

- placa A: 0,5 min
- placa B: 1 min
- placa C: 2 min
- placa D: 3 min
- placa E: 4 min
- placa F: 5 min
- placa G: control, sin irradiación

25 Tras la irradiación, las células se tripsinizaron en los pocillos (1 ml de tripsina 1:10 diluida con tampón N1), en los que 1 ml de la suspensión celular (un total de 6 ml) se usó para determinar el CC y viabilidad, y las células restantes se sometieron a pases con 5 ml de medio en 25 cm² de roux. Los resultados se resumen en la tabla de este ejemplo.

30 Durante el primer periodo de cultivo (aproximadamente 25-35 días) únicamente hubo intercambios de medio y la morfología y adherencia de las células se evaluó ópticamente en las pruebas individuales. Únicamente cuando se observó la formación de islas de las células que crecen de forma adherente en los matraces T-25, las células de las pruebas A-E se tripsinizaron y transfirieron a placas de 6 pocillos (superficie más pequeña que los matraces T-25) para estimular una colonización celular homogénea y adherente. A partir de este punto en el tiempo, aproximadamente K40-K50, las células que llegaron a una confluencia del 80-100 % se sometieron a pases adicionales en matraces T-25 y T-75 cada 6-9 días y se prepararon en 1-2 ampollas de seguridad que sirvieron como material de partida para producir los bancos celulares de evaluación (aproximadamente 10 ampollas). La tripsinización y sometimiento a pase de dichas poblaciones celulares se describe en el ejemplo 3.

35 Preparaciones usadas

Medio: - Medio TBE (FSME) + FBS 5 % + mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomycin 100 mg/l y 50 mg/l de gentamicina)

- Medio TBE (FSME) + FBS 10 %
 - Medio de TC de Vero + FBS 10 %
 - Tampón N1
 - Tripsina gamma
- 5 - DMSO abreviaturas de la empresa Sigma: CC... recuento celular, matraces T de T-25/75/175...25/75/175cm²,

Tabla: Recuentos celulares y viabilidades de las pruebas individuales tras la irradiación

Prueba n.º	Tiempo de irradiación	CC/ml [x10 ⁶]	Bürker- Turk viab. [%]	TCC/pocillo [x10 ⁶]
A	30 s	0,75	87,3	0,15
B	1 min	0,75	79,5	0,15
C	2 min	0,80	84,1	0,16
D	3 min	0,70	90,4	0,14
E	4 min	0,80	80,0	0,16
F	5 min	0,70	*	0,14
G	control	0,75	84,1	0,15
* no determinado				

Debido a los valores de recuento celular similares y viabilidades de las preparaciones de prueba individuales A-G, no se pudo mostrar una diferencia significativa respecto al tiempo de irradiación UV de las células. Esta es la razón por la cual la morfología y adherencia de los cultivos comparados se evaluaron casi diariamente para reconocer sus particularidades.

De todas las preparaciones de prueba A-F, la población celular de la preparación E mostró las mejores propiedades de una línea celular continua, que crece de forma adherente, tal como una estructura celular homogénea, que se cultiva en diferentes matraces T, un crecimiento celular constante tras varios pases, capacidad de crioconservación y adecuación para la propagación de virus (por ejemplo, virus MVA).

En el caso de células de codorniz, la población celular de la preparación F no se pudo cultivar con éxito. Se pudo observar un crecimiento celular reducido con formación de césped celular no homogéneo (grandes agujeros) tras más de 6 pases con las células (prueba G) que no se habían irradiado con luz UV. Desde el pase 16, las células perdieron su capacidad de división y no se pudieron ya cultivar. En conjunto, se lograron resultados similares con las pruebas celulares de codorniz y gallina.

Ejemplo 3: Tripsinización y sometimiento a pases de células

La tripsinización y sometimiento a pases de las células de codorniz que crecen de forma adherente se realizó en un esquema de sometimiento a pases similar al que se usa normalmente para las células Vero. Tras verter el medio de cultivo, se llevó a cabo una etapa de lavado con un tampón N1, a continuación, el cultivo se cubrió con capa(s) de la cantidad correspondiente de tripsina gamma, diluida 1:10, y se incubó a una temperatura (con placas de 6 pocillos y T-25 (matraces T T-25...25cm²) la temperatura ambiente es suficiente) de 37 °C hasta que las células se despegan del recipiente de cultivo (mediante golpes suaves). No es necesaria la adición del inhibidor de tripsina para detener el efecto de la tripsina debido al FBS contenido en el medio de cultivo. Posteriormente, las células se transfieren a un nuevo medio de cultivo y se reparten en recipientes de cultivo adicionales en correspondencia con las separaciones respectivas y se dejan, de nuevo, crecer.

La siguiente tabla indica las cantidades usadas durante la tripsinización.

recipiente de cultivo	Tampón N1	Tripsina gamma (1:10 diluida con tampón N1)
placa de 6 pocillos	2 ml	1 ml
matraz T de 25 cm ²	5 ml	1 ml
matraz T de 75 cm ²	10 ml	1 ml
matraz T de 175cm ²	20 ml	2 ml

Ejemplo 4: Dosimetría de UV-C para la inmortalización de células con la lámpara UV VL 50C

Se midió la dosis para obtener líneas celulares continuas con irradiación UV. La preparación de la dosimetría fue similar a la preparación para el tratamiento celular. La radiación con luz UV-C causa una transformación de yoduro de potasio y yodato de potasio disueltos en solución de tampón en triyoduro marrón-amarillo. El triyoduro tiene su máximo de absorción a 352 nm y puede medirse cuantitativamente en un fotómetro espectral. Este principio permite medir la dosis UV aplicada durante la exposición de monocapa celular dependiendo del tiempo de exposición. Por lo tanto, basándose en mediciones en placas de 6 pocillos, un tiempo de exposición de desde 0,5 a 5 minutos corresponde a una dosis UV de desde 20 a 120 mJ/cm² (figura 4).

La dosimetría se realiza de la forma más precisa posible, como la prueba de línea celular. En cada caso, 1 ml de las soluciones modelo con coeficientes de absorción (367 nm) de aproximadamente 2,5/cm, 4,5/cm y 7,5/cm se irradia en un pocillo de la placa de 6 pocillos. Cada solución modelo se irradia 6 veces. Tiempos de irradiación = 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min y 5 min. Para averiguar la dosis exacta para el tiempo de irradiación respectivo, se determina la DO (253,7 nm) del medio usado.

Materiales usados:

- 15 - lámpara UV portátil, VL50C, 254 nm, 50 W, empresa Vilber-Lourmat
- Fotómetro espectral, empresa Therma, Dispositivo n.º: PA5007-012MM
- placa de 6 pocillos
- Ácido bórico 99,9 %, empresa Riedel- de Haen, Lote n.º: 60460
- Sedimentos de NaOH, empresa Baxter, Lote n.º: 318608
- 20 - PVP K17 PF (polivinilpirrolidona K17 Collidon), empresa Basf, Lote n.º: 30408609T0
- Yoduro de potasio, empresa Sigma Aldrich, Lote n.º: P2963-500G
- Yodato de potasio, empresa Merck, Lote n.º: K32577451622
- Medio de TC de VERO (VT), Cargo: ORSFVTC0700401
- Agua WFI, empresa Baxter, PP2
- 25 Se preparan tres soluciones modelo en cantidades suficientes.

Tabla 1: Composición de las soluciones modelo

Reactivo	Solución modelo 1	Solución modelo 2	Solución modelo 3
Ácido bórico	6,18 g/l disuelto en agua destilada		
sedimentos de NaOH	valor de pH deseado: 9,15; aproximadamente 2 g/l		
PVP K17 PF		2,414 g/l	
Yoduro de potasio más puro	1,41 g/l	2,57 g/l	4,30 g/l
Yodato de potasio más puro	0,3 g/l	0,55 g/l	0,92 g/l

Las soluciones modelo pueden almacenarse en un lugar oscuro hasta que se usen pero al menos hasta 47 días.

Se recogen 60 ml de cada una de las soluciones modelo 1, 2 y 3 para la producción de una curva de calibración. Protegidas de luz incidente, estas muestras se envían a IBC que establece la curva de calibración. Se transfieren 100 ml de cada una desde las soluciones modelo 1, 2 y 3 a matraces Schott y se protegen de luz incidente. La lámpara UV portátil VL 50C se coloca en un armazón. La distancia entre la placa de mesa y el lado inferior de la lámpara UV portátil es 9 cm. La lámpara UV portátil se ajusta tal que el filtro apunte a la placa de mesa (es decir, hacia abajo).

La lámpara UV portátil se enciende 30 minutos antes de usarse.

Se preparan los 3 matraces Schott con los 100 ml de soluciones modelo 1, 2 y 3, pipetas, pipettboy, un matraz Schott vacío y tres placas de 6 pocillos. 1 ml de solución modelo 1 se pipetea en el pocillo superior izquierdo de una placa de 6 pocillos. Este pocillo se coloca debajo de la lámpara UV portátil sin ninguna cobertura de tal modo que se coloca debajo del filtro. Tras una irradiación de 30 segundos, el pocillo se retira rápidamente de su posición debajo de la lámpara UV portátil. 370µl de la solución de 1 ml irradiada se transfieren a una cubeta de sílice en capas finas y el DO_{367nm} se determina en 5 minutos. Se mide lo mismo tres veces y se registra. Se determina el valor medio de estos 3 valores. Si un valor medido está más allá de la región de calibración del fotómetro, correspondientemente, se usará una cubeta con un espesor de capa diferente. El sobrenadante en el pocillo se succiona y descarta.

Estas etapas se repiten para todos los tiempos de irradiación. Basándose en las funciones de curva obtenidas y DO (253,7 nm) del medio VT, la dosis respectiva de UV [mJ/cm²] se calcula lejos de 30 segundos a 5 minutos. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla: Dosis UV calculada basándose en las funciones de curva respectivas

tiempo de irradiación	tiempo de irradiación
30 segundos	3 minutos
función de curva potencial	función de curva potencial
$y = 21,767x^{0,1945}$	$y = 147,31x^{0,5363}$
A 253,7 medio VT (=x)	A 253,7 medio VT (=x)
4,01	4,01
dosis UV [mJ/cm ²]	dosis UV [mJ/cm ²]
16,61	69,95
tiempo de irradiación	tiempo de irradiación
1 minuto	4 minutos
función de curva potencial	función de curva potencial
$y = 56,953x^{0,4709}$	$y = 212,7x^{0,5159}$
A 253,7 medio VT (=x)	A 253,7 medio VT (=x)
4,01	4,01
dosis UV [mJ/cm ²]	dosis UV [mJ/cm ²]
29,61	103,90
tiempo de irradiación	tiempo de irradiación
2 minutos	5 minutos
función de curva potencial	función de curva potencial
$y = 98,154x^{0,4322}$	$y = 2\ 64,53x^{0,5377}$
A 253,7 medio VT (=x)	A 253,7 medio VT (=x)
4,01	4,01
dosis UV [mJ/cm ²]	dosis UV [mJ/cm ²]
53,86	125,36

Como puede observarse a partir de esta tabla, la función de curva de la dosis es $y = 24,09x + 4,3125$. X es el tiempo de irradiación en minutos e y es la dosis en mJ/cm² (Fig. 4).

Ejemplo 5: Producción de virus en células continuas

- 5 MVA, r-MVA, TBE y gripe se propagaron en células de codorniz continuas. Se establecieron cultivos de frasco rotatorio de células de codorniz como se ha descrito anteriormente. Los cultivos se infectaron con (GMP) MVA, TroVax, TBE y virus de la gripe. Se escogió una MDI de acuerdo con el procedimiento de producción de MVA actual. Se recogieron los productos víricos después de 3 a 4 días. Se usó un medio de cultivo AS de TC de Vero 10 % FBS durante la incubación a una incubación de 32 °C.
 Infec.: llevada a cabo con 10 ml después de 1 h. a un volumen final (60 ml)

TBE:	50 µl de virus
MVA:	250 µl de virus
Nueva Caledonia (NC):	50 µl

- 10 Abreviatura: KXX...día de cultivo XX
 Recogida de muestras: muestra de 3x1 ml, NOVA, NaBr- con NC, HA, microfotografía

ES 2 628 074 T3

TBE

día	glucosa	glutamina	lactato	NH4	pH	CO2	título de virus	TBE-Elisa	CPE	TBE-HA
	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[mg/l]		[%]	Ig ufp/ml	µg/ml	%	HAU/200 µl
1	x	x	x	x	x		x	x	0	x
2	2,83	0,31	0,33	21	7,36	5,8	neg	0,02	0	16
3	2,71	0,27	0,4	26	7,32	6	6,34	0,08	0	16
4	2,47	0,2	0,59	47	7,36	5,1		0,21	0	64

MVA

día	glucosa	glutamina	lactato	NH4	pH	CO2	TCID ₅₀		CPE
	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[mg/l]		[%]	título		%
1	x	x	x	x	x	x	x	x	0
2	2,64	0,31	0,44	20	7,31	6,1	x	x	0
3	2,6	0,27	0,58	23	7,26	6,1	x	x	0
4	2,36	0,21	0,74	43	7,35	4,9	7,02e8V/ml	x	0

Nueva Caledonia

día	glucosa	glutamina	lactato	NH4	pH	CO2	NaBr	HA	CPE
	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[mg/l]		[%]	mm		%
1	x	x	x	x	x	x	x	x	20
2	2,76	0,3	0,34	21	7,32	6,2	x	3 =8HAU	70
3	2,82	0,26	0,38	25	7,34	5,7	0	5 =32HAU	100
4	2,63	0,19	0,48	45	7,41	5	0,00E = +00	5 =32HAU	100

Control

día	glucosa	glutamina	lactato	NH4	pH	CO2	NaBr	HA	CPE
	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[mg/l]		[%]	mm		%
1	x	x	x	x	x	x	x	x	0
2	1,78	0,16	1,24	31	7,03	6,3	x	x	0
3	1,24	0,12	1,42	34	6,87	6,9	x	x	0
4	1,52	0,11	1,61	53	6,94	4,9	x	x	0

5 Titulación de virus lograda para MVA y r-MVA cultivados en experimentos de frasco rotatorio:

Virus	TCID ₅₀ /ml
MVA	8x10 ⁸
r-MVA (TroVax)	9x10 ⁸

Titulación de virus lograda para TBE y gripe cultivados en experimentos de frasco rotatorio:

Virus	Título (log ufp/ml)	HA (HAU/50µl)	CPE (%)
TBE	6,9	64	100
Nueva Caledonia	no determinado	32	100

Ejemplo 6: Ensayo de F-Pert de distintos cultivos celulares

El ensayo de F-Pert permite detectar actividad transcriptasa inversa mediante PCR y es necesario para la validación de seguridad. Se prepararon distintos cultivos (Vero (control neg.), gallina primaria (control pos.), células de codorniz y gallina continuas) de acuerdo con el mismo procedimiento. Se recogieron sobrenadantes de cultivo y se procesaron para la prueba de control de calidad de F-Pert

5

Resultados de la prueba F-Pert	
Cultivo celular	F-Pert
Vero (control)	negativo
CEC (células de gallina primaria)	positivo
células de codorniz (4 cultivos distintos)	negativo
células de gallina (2 distintos cultivos)	negativo

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una línea celular de ave continua que comprende irradiar células de ave vivas con una dosis eficaz de luz UV, y seleccionar células capaces de proliferar tras al menos 20 pases como células de una línea celular de ave continua sin la introducción de genes víricos exógenos.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la longitud de onda de la luz UV está entre 200 nm y 300 nm.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la dosis de luz UV es de al menos 500 J/m² (al menos 50 mJ/cm²).
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la dosis de luz UV es de hasta 3000 J/m² (hasta 300 mJ/cm²).
- 10 5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la etapa de selección comprende seleccionar dichas células tras al menos 40 pases.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las células de ave están unidas a una superficie o están en suspensión.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las células de ave son células de un embrión.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las células de ave se mezclan en un cultivo de más de un tipo de tejido.
- 15 9. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las células de ave están en una monocapa.
10. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las células de la línea celular de ave continua se adaptan para su cultivo en un medio sin suero, opcionalmente F12 de DMEM/HAM, RPMI, MEM, BME, medio de Waymouth, un medio sin oligopéptidos, un medio definido químicamente o una combinación de los mismos.
- 20 11. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichas células de la línea celular de ave continua se seleccionan para ser no tumorigénicas y/o no cancerígenas.
12. Un procedimiento de producción de un virus que comprende las etapas de:
 - (i) producir una línea celular de ave continua de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1;
 - (ii) infectar células de la línea celular de ave continua con un virus en condiciones que permitan la proliferación del virus; y
 - (iii) recoger dicho virus.
- 25 13. El procedimiento de la reivindicación 12 en el que el virus se selecciona de baculovirus, poxvirus, adenovirus, papovavirus, parvovirus, hepadnavirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, astrovirus, picornavirus, retrovirus, ortomixovirus, filovirus, paramixovirus, rabdovirus, arenavirus, bunyavirus, MVA, virus TBE, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, virus de Nueva Caledonia o un virus de la gripe.
- 30 14. Un procedimiento de producción de un producto de gen recombinante que comprende las etapas de:
 - (i) producir una línea celular de ave continua de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1;
 - (ii) transfectar células de la línea celular de ave continua con un ácido nucleico que codifica un producto génico recombinante en condiciones que permitan la producción de dicho producto génico y
 - (iii) opcionalmente, recoger dicho producto génico.
- 35 15. Una línea celular depositada en el ECACC con el número de acceso de depósito 08020602, 08020603 o 08020604.

Fig. 1

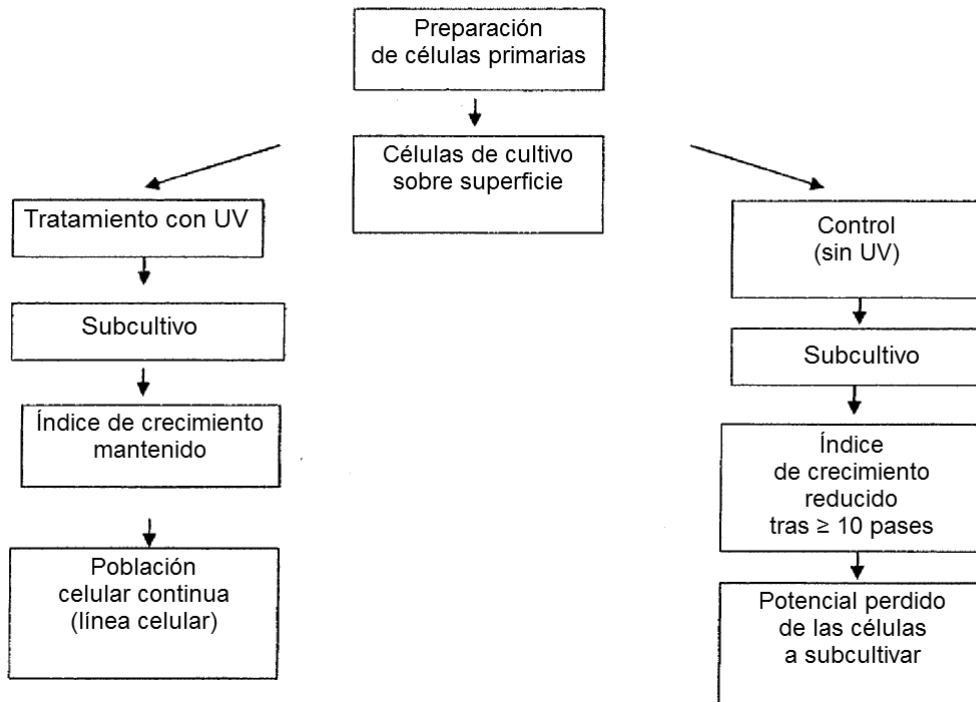
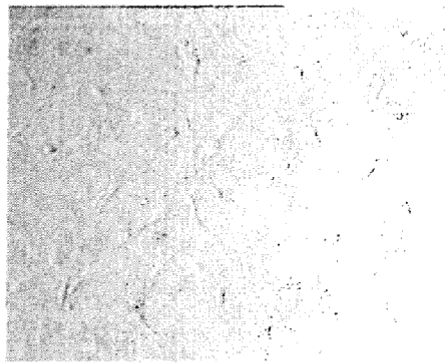
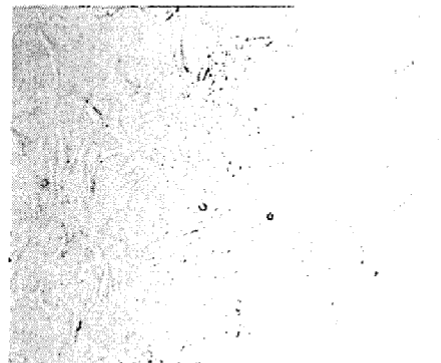


Fig. 2



después del paso



antes de la confluencia

Fig. 3

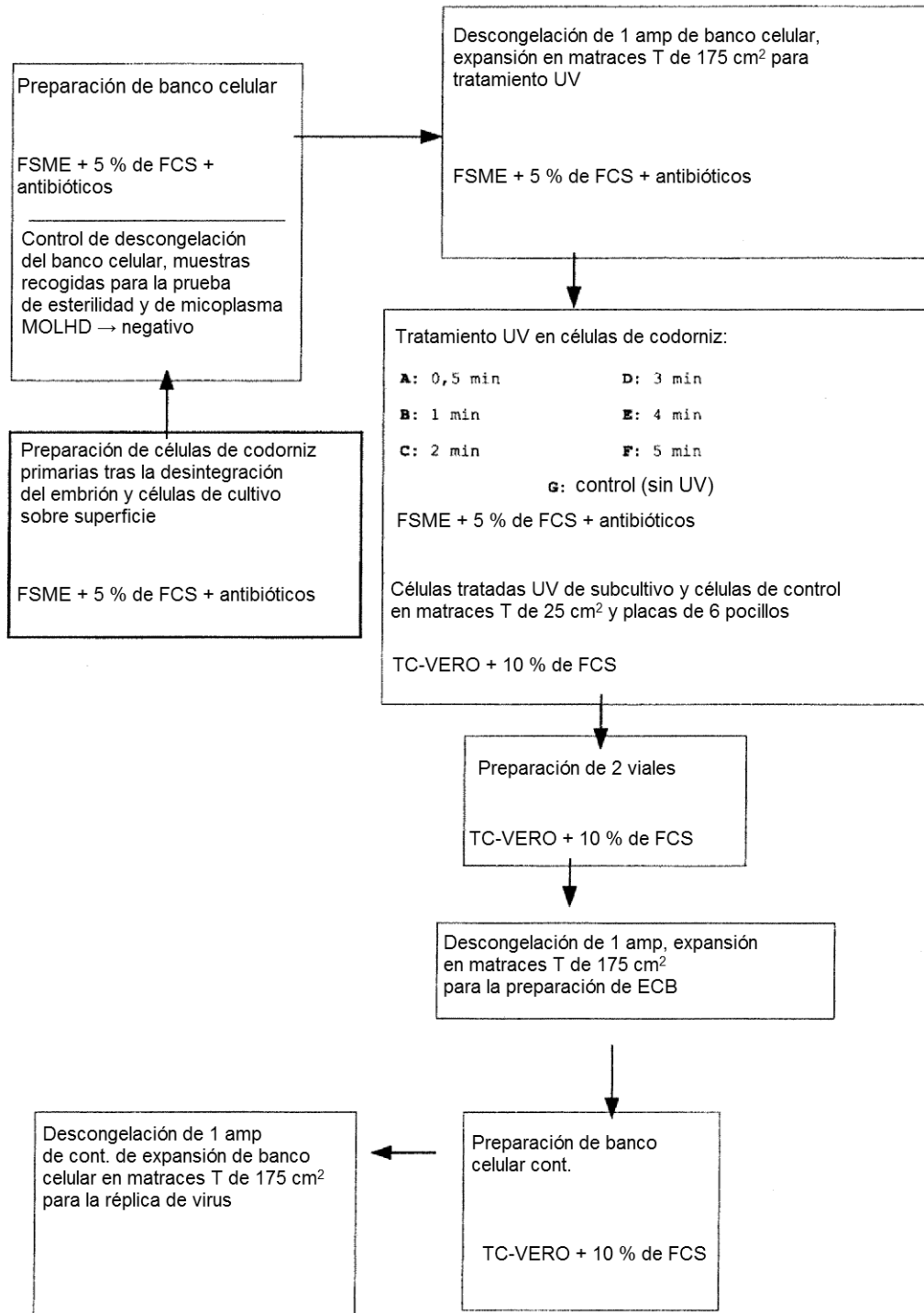


Fig. 4

