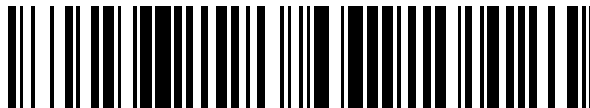


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 928**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2014 PCT/EP2014/068248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15028546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014 E 14758351 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3039127**

54 Título: **Producción a gran escala de virus en cultivos celulares**

30 Prioridad:

30.08.2013 US 201361872024 P

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

12.08.2020

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE y
KM BIOLOGICS CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GERKENS, PASCAL CHARLES LOUIS;
LECOQ, MICHELE THERESE RITA;
KASUGAYA, TATSUYA;
KAWATSU, KENJIRO;
MIYATSU, YOSHINOBU y
TANABE, TETSURO**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 778 928 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

Producción a gran escala de virus en cultivos celulares

La presente invención se ha realizado con la financiación del gobierno de Estados Unidos bajo el Contrato n.º HHSO100200600011C otorgado por el Department of Health and Human Services; El gobierno de Estados Unidos ciertos determinados derechos sobre la presente invención.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir virus o antígenos víricos, producidos mediante cultivo de células, a los virus o antígenos víricos que se pueden obtener por este procedimiento y a las vacunas que contienen dichos virus o antígenos víricos. En particular, la invención proporciona un procedimiento para mejorar el rendimiento del virus.

Antecedentes

El desarrollo de tecnologías basadas en cultivos celulares como alternativa a los sistemas de producción tradicionales basados en huevo para la fabricación de vacunas víricas parece probablemente como la solución más rápida y más prometedora para superar los inconvenientes y limitaciones asociados con los sistemas tradicionales basados en huevo. Las producciones comerciales de vacunas víricas requieren normalmente grandes cantidades de virus como fuente de antígenos. Sin embargo, el procedimiento basado en huevo es vulnerable debido a la calidad biológica variable de los huevos y a que carece de flexibilidad debido a los problemas logísticos ocasionados por la falta de disponibilidad de grandes cantidades de huevos adecuados.

Los sistemas de cultivo de células parecen ser un modo alternativo adecuado de preparación de vacunas, más simple, flexible, y consistente, que permite mejorar las posibilidades de las capacidades de producción de vacunas a gran escala y por tanto alcanzan grandes cantidades de virus, si es necesario. Por ejemplo, en respuesta a una amenaza natural de pandemia o a un ataque terrorista.

Sin embargo, una producción eficaz de vacunas requiere el crecimiento de cantidades de virus a gran escala producidos con alto rendimiento a partir de un sistema hospedador. Las condiciones de cultivo en las cuales se hace crecer un virus tienen enorme importancia en los que respecta a conseguir un alto rendimiento aceptable del virus. Por tanto, a fin de maximizar el rendimiento del virus deseado, el sistema y las condiciones de cultivo deben adaptarse específicamente para proporcionar un entorno que sea ventajoso para que la producción del virus deseado sea adecuada para la producción a gran escala. Una manera es mejorar la productividad celular específica, por ejemplo, mejorando el medio de cultivo, o aumentando la densidad celular. Debido al hecho que, tras la producción, el virus producido mediante cultivo celular debe recuperarse del cultivo celular y purificarse, otra manera de mejorar el rendimiento del virus es limitar la pérdida de material del virus que se produce a lo largo de las diferentes etapas de purificación. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar procedimientos alternativos y mejorados de producir virus con un aumento del rendimiento del virus. El procedimiento de acuerdo con la presente invención proporciona un rendimiento del virus mejorado sobre los procedimientos conocidos en la técnica.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir un virus en cultivo celular que comprende al menos las etapas de:

a) proporcionar una población de células en un medio de cultivo celular, en el que se aplica a las células una entrada de potencia volumétrica de 30 W/m^3 o 120 W/m^3 , hasta que la densidad celular de las células alcanza al menos 8×10^6 células/ml, al menos 9×10^6 células/ml, al menos 10×10^6 células/ml, al menos 12×10^6 células/ml, al menos 12×10^6 células/ml, o al menos 13×10^6 células/ml,

b) infectar la población de células:

i. inoculando la población con el virus, y

ii. incubando la población inoculada con el fin de permitir que el virus se replique y propague, en el que la entrada de potencia volumétrica se aumenta de nuevo a 30 W/m^3 o 120 W/m^3 ,

c) recoger el virus producido, proporcionando de esta forma una cosecha de virus, y

d) purificar el virus, en el que la cosecha de virus se clarifica mediante microfiltración y se purifica adicionalmente mediante al menos una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de una vacuna que comprende las etapas de llevar a cabo el procedimiento de la invención y premezclar el virus purificado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de producir virus en un cultivo celular, lo que es

particularmente útil para la producción a gran escala. En particular, el procedimiento de acuerdo con la invención ayuda a aumentar el rendimiento del virus limitando la pérdida de virus durante el procedimiento de purificación. Los inventores observaron de manera sorprendente que se producen algunos cambios en la parte inicial del procedimiento de producción del virus, tales como un aumento en la entrada de potencia volumétrica aplicada a las células cultivadas usadas para producir un virus, lo que da como resultado una mejora significativa en la parte final de dicho procedimiento, tal como un aumento en el rendimiento del virus obtenido tras varias etapas de purificación. En particular, los inventores observaron que, aunque el aumento de la entrada de potencia durante la fase inicial del cultivo no tuvo impacto sobre la productividad específica de células, se obtuvo un impacto positivo sobre una etapa de clarificación por microfiltración posterior en la que aumentó significativamente el rendimiento del virus obtenido después de dicha etapa, en comparación con el rendimiento obtenido cuando se implementó una entrada de potencia inferior durante la fase de cultivo celular. Además, no solo aumentó la recuperación del virus tras la etapa de microfiltración, sino también los porcentajes de recuperación obtenidos fueron más consistentes y menos variables de un experimento a otro. También, los inventores observaron un efecto beneficioso similar de aumentar la entrada de potencia volumétrica durante la fase anterior del cultivo celular en una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa posterior implementada durante la fase siguiente de purificación del virus. En particular, los inventores observaron que un aumento de la entrada de potencia volumétrica aplicada a las células cultivadas permitió aumentar significativamente, en aproximadamente un factor de 2, la capacidad de carga del rotor usado en la etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Como consecuencia, el rendimiento mejorado del virus obtenido tras varias etapas de purificación condujo a un mejor rendimiento global del virus al final del procedimiento de producción del virus. Inesperadamente, los inventores observaron que una mayor entrada de potencia volumétrica no producía perjuicio o daño en las células.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención proporciona la ventaja de ser fácil de implementar, dado que no se requiere etapa extra o equipo adicional diferente de los usados normalmente de forma convencional para producir un virus en un cultivo celular.

"Capacidad de carga" es la cantidad de litros recogidos de virus durante la etapa c) del procedimiento de la invención que se cargan por litro de rotor de la centrifuga utilizada para la etapa de centrifugación en gradiente de sacarosa, o la cantidad "equivalente" de litros recogidos de virus cuando dicha recogida de virus se ha tratado antes de someterse a la etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, debido a las etapas de purificación anteriores. Por ejemplo, tal como se describe más adelante, tras haberse recogido, la cosecha de virus puede someterse a ultrafiltración/diafiltración antes de someterse a una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, donde la ultrafiltración/diafiltración da como resultado, de forma típica, la concentración de la cosecha de virus, es decir, la cantidad de litros recogidos de virus se reduce tras dicha etapa.

"Entrada de potencia volumétrica" es la cantidad de potencia por unidad de volumen, o la tasa de disipación de la energía media específica. En el cultivo celular, corresponde a la cantidad de potencia transferida a un volumen de cultivo celular a través del eje y los impulsores del agitador. Se expresa como W/m^3 . La fórmula empírica usada en la técnica para calcular los valores de la entrada de potencia es del siguiente modo: $P/V = (N_p \times n^3 \times d_i^5)/V$, donde N_p es la cantidad de potencia turbulenta para el impulsor, n es la velocidad de agitación medida como revoluciones del impulsor por segundo, d_i es el diámetro del impulsor medido en metros y V es el volumen de cultivo en metros cúbicos.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención es aplicable a cualquier tipo de células, ya sean células adherentes que crecen sobre microvehículos o bien células en suspensión. Por consiguiente, en el sentido de la presente invención, la expresión "suspensión celular" debe abarcar las células adherentes que crecen sobre microvehículos y las células capaces de crecer en suspensión, es decir, que no requieren ningún soporte adherente, tales como microvehículos, para crecer.

Normalmente, la entrada de potencia volumétrica se aplica mediante un movimiento mecánico a la suspensión celular. Dicho movimiento mecánico puede conseguirse por diferentes medios. Por ejemplo, el movimiento mecánico de la suspensión celular puede conseguirse por medio de un dispositivo de agitación, tales como impulsores.

La agitación se puede impartir como un flujo axial, un flujo radial, o una combinación de los dos, dependiendo del tipo de impulsor que se use. Normalmente, los impulsores pueden dividirse en los siguientes grupos basándose en su geometría y, en particular, la geometría de sus palas: (i) las turbinas de palas planas, denominadas también comúnmente impulsores Rushton o impulsores de tipo Rushton; (ii) los impulsores de palas inclinadas; y (iii) y los impulsores de palas marinas.

Las turbinas de palas planas, o impulsores Rushton, están constituidos por palas planas dispuestas verticalmente a lo largo del eje de agitación, produciendo así un flujo radial unidireccional. Estos tipos de impulsores se usan comúnmente en fermentaciones de líneas celulares que no se consideran sensibles a la cizalladura, tales como levaduras, bacterias y algunos hongos. Sin embargo, tal como se desvela en lo anterior, los inventores observaron que los impulsores Rushton pueden usarse también de forma adecuada con células animales de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Los impulsores de palas inclinadas están constituidos por palas planas dispuestas en un ángulo en relación con el eje de agitación, produciendo así un flujo axial y radial simultáneo. Dichos impulsores de palas inclinadas se usan a

menudo con líneas de células sensibles a la cizalladura que crecen en suspensión o con la ayuda de microvehículos. Estos impulsores se usan a menudo en cultivos por lotes o de alimentación discontinua, pero pueden utilizarse también para procedimientos continuos y procedimientos de perfusión.

5 La cara de impulsión de las palas de un impulsor de palas marinas puede ser plana o cóncava, mientras que sus lados posteriores son convexos, produciendo así un flujo axial unidireccional.

Se deben tener en cuenta diferentes factores al seleccionar los tipos adecuados de impulsores tales como, por ejemplo, el tipo de células, el tipo de sistemas de cultivo (sistema por lotes, de alimentación discontinua o sistema de cultivo por perfusión), el tipo de recipientes de cultivo, así como el nivel de entrada de potencia volumétrica que se desee. Está comprendido dentro de los conocimientos de la persona experta determinar y seleccionar el impulsor
10 adecuado a usar dependiendo de las condiciones específicas anteriores. La entrada de potencia volumétrica, en particular, la entrada de potencia volumétrica que varía de 30 a 120 W/m³, aplicada en el procedimiento descrito en el presente documento puede conseguirse con un impulsor de palas inclinadas. Como alternativa, la entrada de potencia volumétrica, en particular, una entrada de potencia volumétrica mayor de 120 W/m³, aplicada en el procedimiento descrito en el presente documento, puede conseguirse con un impulsor Rushton.

15 La entrada de potencia volumétrica aplicada sobre cultivos de células animales es normalmente mucho menor que en cultivos microbianos debido a la supuesta mayor fragilidad de las células animales que están desprovistas de una pared celular protectora, haciéndolas en particular más sensibles al estrés por cizalladura y a la formación de espuma que los cultivos microbianos. Sin embargo, como han observado los presentes inventores, la aplicación de una elevada entrada de potencia volumétrica, hasta cierto punto, a cultivos de células animales usados para producir un virus no perjudica a las células, favorece ventajosamente el rendimiento del virus durante la purificación del virus producido.
20

El procedimiento de acuerdo con la invención puede implementarse a una amplia gama de valores de entrada de potencia volumétrica. Por "valor máximo" se entiende la entrada de potencia volumétrica máxima que se puede aplicar en ausencia de un impacto negativo global sobre el rendimiento vírico. Un factor conocido por tener un impacto negativo posible sobre el rendimiento vírico es la integridad celular, tal como por ejemplo una viabilidad celular
25 disminuida. La persona experta sabe cómo controlar la viabilidad celular. Un ejemplo no limitante de procedimientos adecuados es la tinción celular (que permite discriminar las células vivas de las células muertas), tal como la tinción del azul tripán, o cualquier otra tinción adecuada conocida. Como alternativa, la viabilidad celular también se puede evaluar y medir por citometría de flujo, tal como, por ejemplo, FACS (clasificación celular activada por fluorescencia). También, cuando se define el valor máximo, puede tenerse en cuenta la productividad específica celular del virus. Por
30 "productividad específica celular", se entiende la capacidad de las células para producir virus, es decir, la cantidad de virus conseguida en la etapa de recogida c), antes de someterse a la purificación. La entrada de potencia volumétrica aplicada a las células cultivadas preferentemente no debe afectar de forma negativa a la productividad específica celular del virus.

Por "valor mínimo" de entrada de potencia volumétrica se entiende el valor mínimo que proporciona una mejora del
35 rendimiento vírico durante la fase de purificación del virus en comparación con el rendimiento vírico obtenido durante la fase de purificación del virus tanto si no se aplica una entrada de potencia volumétrica como si se aplica una entrada de potencia volumétrica baja a las células cultivadas. Se puede usar de forma adecuada cualquier procedimiento conocido en la técnica para medir el rendimiento vírico o la titulación vírica para ayudar a determinar los valores óptimos de entrada de potencia volumétrica a aplicarse en el procedimiento de la invención. Por ejemplo, se puede
40 medir el CPE (efecto citopático) controlando los cambios morfológicos que se producen en las células hospedadoras tras la inoculación del virus, incluyendo el redondeo celular, la desorientación, la hinchazón o la contracción, muerte, el despegue de la superficie. También, puede controlarse la detección de un antígeno vírico específico mediante técnicas convencionales de detección de proteínas, tal como un análisis por transferencia Western, en cualquier momento después de producirse la inoculación de las células con el virus de interés. En el caso particular del virus de
45 la gripe, el contenido de HA puede controlarse en cualquier momento tras la inoculación de las células con el virus, mediante el ensayo SRD (Wood, JM, y col. (1977). J. Biol. Standard. 5, 237-247), que es una técnica familiar para una persona experta en la materia. Adicionalmente, el ensayo SRD puede también usarse en cualquier momento durante la fase de purificación a fin de evaluar el rendimiento vírico antes y después de cualquier etapa de purificación. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el valor de la entrada de potencia volumétrica es de 30 W/m³.
50 Como alternativa, el valor de la entrada de potencia volumétrica usado en el procedimiento de acuerdo con la invención es de 120 W/m³.

El procedimiento de acuerdo con la invención es aplicable a cualquier tipo de recipientes de cultivo, de cualquier tamaño, tal como por ejemplo, matraces, botellas rotativas, o biorreactores, siempre que dichos recipientes bien sean
55 adecuados para acomodar dispositivos de agitación, tales como por ejemplo, impulsores, o bien sean compatibles con el uso de un dispositivo de agitación diferente. No es necesario que el recipiente comprenda un dispositivo de agitación. El dispositivo de agitación puede ser diferente del propio recipiente. Por ejemplo, en el caso de biorreactores desechables, que consisten normalmente en bolsas de plástico, tales como biorreactores Wave™, la agitación de dichos biorreactores desechables puede conseguirse colocando los biorreactores en una mesa de agitación, ya sea un agitador orbital como un agitador axial. Los biorreactores pueden fabricarse de cualquier tipo de materiales, tales como por ejemplos vidrio o acero inoxidable para biorreactores no desechables, o plástico para biorreactores
60 desechables. También, los biorreactores pueden tener cualquier forma, tal como por ejemplo forma cilíndrica o cúbica.

Los biorreactores se usan normalmente para la escala intermedia, tal como de 1 a 10 l, y la producción a gran escala, tal como de 20 a 1000 l, y más. El procedimiento de acuerdo con la invención es aplicable a cualquier tipo de biorreactor de cualquier tamaño. En particular, el procedimiento de la invención es adecuado para biorreactores de 10 l, 200 l, 500 l, 1000 l o 10000 l. Un tipo particularmente adecuado de biorreactores para su uso en el procedimiento de la invención son los biorreactores de tanque agitado, que funcionan de modo tanto discontinuo como continuo. Los biorreactores desechables representan un tipo de biorreactores alternativamente adecuado para su uso en el procedimiento de la invención. Por ejemplo, las células usadas en el procedimiento de acuerdo con la presente invención pueden cultivarse en un biorreactor desechable de 200 l.

De acuerdo con la invención, las células pueden hacerse crecer de diversas maneras, tales como por ejemplo, usando sistemas discontinuos, sistemas de alimentación discontinua, o sistemas continuos, tales como sistemas de perfusión. La perfusión es particularmente ventajosa cuando se desea una alta densidad celular. Una alta densidad celular puede ser particularmente ventajosa para maximizar la cantidad de virus que se puede producir a partir de un tipo de célula dado. El procedimiento para producir un virus en un cultivo celular en el que se aplica una entrada de potencia volumétrica alta al cultivo celular de acuerdo con la presente invención es aplicable a cualquiera de los anteriores sistemas, tanto si las células se hacen crecer usando sistemas discontinuos, de alimentación discontinua, o sistemas continuos. Por ejemplo, las células usadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención pueden hacerse crecer de modo discontinuo.

El procedimiento de la invención es adaptable a una amplia gama de virus, cualquier virus que sea capaz de infectar células y usarlas para su replicación, incluyendo, aunque no de forma limitativa, adenovirus, hepadnavirus, virus del herpes, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, picornavirus, poxvirus, reovirus y retrovirus. En particular, el procedimiento de la invención es adecuado para virus con envoltura, tales como mixovirus. En una realización, los virus producidos mediante el procedimiento de la invención pertenecen a la familia de los ortomixovirus, en particular, virus de la gripe.

Los virus o antígenos víricos pueden derivarse de un Ortomixovirus, tales como el virus de la gripe. Se pueden seleccionar antígenos de ortomixovirus a partir de una o más de las proteínas víricas, incluyendo hemaglutininas (HA), neuraminidasas (NA), nucleoproteínas (NP), proteínas de matriz (M1), proteínas de membrana (M2), una o más de las transcriptasas (PB1, PB2 y PA). Los antígenos particularmente adecuados incluyen HA y NA, las dos glicoproteínas superficiales que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de la gripe.

El virus de la gripe puede seleccionarse del grupo del virus de la gripe humana, el virus de la gripe aviar, el virus de la gripe equina, el virus de la gripe porcina, el virus de la gripe felina. el virus de la gripe se selecciona más particularmente en las cepas A, B y C, preferentemente entre las cepas A y B.

Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas de la gripe intrapandémicas (anuales o estacionales). Como alternativa, los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas con el potencial para producir un brote pandémico (es decir, cepas de la gripe con hemaglutinina nueva en comparación con la hemaglutinina actualmente en circulación, o cepas de la gripe que son patógenas sujetos aviarios y que tienen el potencial de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de la gripe que son patógenas para seres humanos). Dependiendo de la estación concreta). Dependiendo de la estación concreta y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, los antígenos de la gripe pueden derivarse de uno o más de los siguientes subtipos de hemaglutinina: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Preferentemente, el virus de la gripe o los antígenos del mismo son de los subtipos H1, H2, H3, H5, H7 o H9. En una realización, los virus de la gripe o antígenos son de los subtipos H2, H5, H6, H7 o H9. En una realización, los virus de la gripe son de los subtipos H1, H3 o B.

Las células que se usan en el procedimiento de acuerdo pueden ser en principio cualquier tipo deseado de células animales que se pueden cultivar en un cultivo de células y que pueden soportar la replicación vírica. Pueden ser tanto células primarias como líneas de células continuas. Se prefieren las líneas de células genéticamente estables. Son particularmente adecuadas las células de mamíferos, por ejemplo, ser humano, hámster, de ganado bovino, de mono o de perro. Como alternativa, son también adecuadas las células de insectos, tales como, por ejemplo, células SF9 o células Hi-5

Se conocen en la técnica numerosas líneas de células de mamíferos e incluyen células PER.C6, células HEK, células de riñón embrionario humano (células 293), células HeLa, células CHO, células Vero y células MDCK.

Las células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde africano, tales como células de riñón y la línea de células Vero. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón como en la línea de células MDCK.

Las líneas de células de mamífero adecuadas para hacer crecer el virus de la gripe incluyen células MDCK, células Vero, o células PER.C6. Estas líneas de células están todas ampliamente disponibles, por ejemplo, de la American Type Cell Culture (ATCC) collection.

Por ejemplo, el procedimiento de la invención puede usar células MDCK. La línea de células MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero se pueden usar también derivados de esta línea de células, tales como las células MDCK adaptadas al crecimiento en suspensión (documentos WO 1997/37000).

Como alternativa, las líneas de células para su uso en la invención pueden derivarse de fuentes aviarias, tales como pollos, pato, ganso, codornices o faisanes. Las líneas de células aviarias pueden derivarse de una variedad de etapas de desarrollo que incluyen la embrionaria, de polluelo y de adulto. En particular, las líneas de células pueden derivarse de las células embrionarias, tales como fibroblastos embrionarios, células germinales, u órganos individuales, incluyendo los tejidos neuronales, cerebrales, retina, riñón, hígado, corazón, músculo, o tejidos extraembrionarios y membranas que protegen el embrión. se pueden usar fibroblastos de embriones de pollo (CEF). Los ejemplos de líneas de células aviarias incluyen embriocitoblastos de aves (documento WO01/85938) y células de retina de pato (documento WO05/042728). En particular, la línea de células EB66® derivada de embriocitoblastos de pato se contempla en la presente invención (documento WO08/129058). Otros embriocitoblastos de aves adecuados incluyen la línea de células EBx® derivada de embriocitoblastos de pollos, EB45, EB14 y EB14-074 (documento WO2006/108846). Esta línea de células EBx® presenta la ventaja de ser una línea de células estable cuyo establecimiento se ha producido naturalmente y no requiere ninguna modificación genética, química o vírica. Estas células aviarias son particularmente adecuadas para hacer crecer virus de la gripe.

Por ejemplo, el procedimiento de la invención puede usar células EB66®.

Las condiciones de cultivo celular (temperatura, densidad celular, valor de pH, etc...) son variables durante un intervalo muy amplio que pertenece a la idoneidad de las células empleadas y puede adaptarse a los requerimientos de los detalles concretos de las condiciones de crecimiento víricas. Está comprendido en las capacidades de las personas expertas en la materia determinar las condiciones de cultivo adecuadas, ya que el cultivo celular está extensamente documentado en la técnica (véase, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editores (1973), y R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, cuarta edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

Por ejemplo, las células usadas en el procedimiento descrito en la presente invención pueden cultivarse en un medio exento de suero y/o exento de proteínas. Un "medio exento de suero" (SFM) significa un medio de cultivo listo para el uso que no requiere adición de suero que permite la supervivencia celular y el crecimiento celular. No es necesario que este medio esté químicamente definido y puede contener hidrolizados de diverso origen, por ejemplo, de vegetales. Dicho medio exento de suero presenta la ventaja de que puede descartarse la contaminación con virus accidentales, micoplasmas o agentes infecciosos desconocidos. Se entiende que "exento de proteínas" significa cultivos en los que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas. Opcionalmente pueden añadirse tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para el crecimiento vírico durante la infección vírica. Las células que crecen en dichos cultivos contienen naturalmente proteínas propias.

Los medios exentos de suero están comercialmente disponibles de numerosas fuentes, por ejemplo, VP SFM (Invitrogen n.º de Referencia 11681-020), Opti-Pro (Invitrogen, n.º de Referencia 12309-019), o EX-CELL (JHR Bioscience).

Antes de la infección con el virus, las células se cultivaron a unos 37 °C, de forma más adecuada a 36,5 °C, a un pH comprendido de 6,7 a 7,8, de forma adecuada alrededor de 6,8 a 7,5, y de forma más adecuada alrededor de 7,2. Cuando las células son células de insectos, la temperatura antes de la infección con el virus está comprendida normalmente de 25 °C a 29 °C, de forma adecuada es 27 °C.

De acuerdo con el procedimiento de producir un virus de la presente invención, la producción de virus basados en cultivos celulares incluye generalmente las etapas de a) proporcionar una población de células cultivadas en un medio de cultivo; b) inocular dichas células con el virus de interés que se va a producir, tal como para iniciar el proceso de infección de las células con el virus, e incubar o cultivar las células inoculadas durante un periodo de tiempo deseado para permitir la replicación y propagación vírica, y c) recoger el virus producido. La entrada de potencia volumétrica alta de acuerdo con la presente invención se aplica de forma adecuada durante al menos la etapa b), y de forma más adecuada durante las etapas a) y b). Por consiguiente, en el procedimiento de producir un virus de acuerdo con la presente invención, se aplica una entrada de potencia volumétrica de 30 W/m³ o 120 W/m³ a las células cultivadas durante las etapas a) y b).

Las expresiones "inocular/inoculación" y "células inoculadas" se deben entender en el sentido de la presente invención como el momento de la adición del virus de interés a las células, y a las células a las que se ha añadido el virus de interés, respectivamente. Las expresiones "después de la inoculación" se deben entender como la duración temporal tras la cual se añade el virus a las células. En el resto de la memoria descriptiva, el tiempo "después de la inoculación" se indica en minutos, horas o días, tal como por ejemplo, "2 h después de la inoculación", "el día 1 (D1) después de la inoculación". El día durante el cual se inoculan las células con el virus debe considerarse como el día 0 (D0). Debe entenderse que las tres etapas sucesivas de inoculación vírica, replicación vírica, y propagación vírica son parte de un proceso más amplio de la infección vírica. La entrada de potencia volumétrica alta como se ha definido en la presente invención puede aplicarse al cultivo celular durante cualquiera de las anteriores etapas. La entrada de potencia volumétrica alta en el sentido de la presente invención se puede aplicar de forma adecuada a las células mientras crecen y se cultivan antes de infectarse con el virus de interés. La entrada de potencia volumétrica alta en el sentido de la presente invención puede también aplicarse de forma adecuada a las células tras inocularse con el virus y/o mientras se dejan en incubación para permitir que el virus se replique y se propague. La alta potencia volumétrica

puede también aplicarse de forma adecuada a las células mientras crecen y se cultivan antes de infectarse, después de inocularse con el virus, y mientras se dejan en incubación para permitir que el virus se replique y se propague. Según el método de la invención, la entrada de potencia volumétrica alta se aplica a las células, mientras crecen y se cultivan antes de infectarse con el virus de interés, así como después de inocularse con dicho virus y hasta que se recoge el virus producido.

Para producir grandes cantidades de virus, puede ser ventajoso inocular las células con el virus de interés una vez que las células han alcanzado una densidad alta. Habitualmente, la inoculación se lleva a cabo cuando la densidad celular es de al menos aproximadamente 5×10^6 células/ml, de forma adecuada 6×10^6 células/ml, de forma más adecuada 7×10^6 células/ml, de forma más adecuada 8×10^6 células/ml, de forma más adecuada 9×10^6 células/ml, o incluso más, tal como 10×10^6 células/ml, 11×10^6 células/ml, 12×10^6 células/ml o 13×10^6 células/ml, o incluso más, tal como 20×10^6 células/ml, 25×10^6 células/ml, o 30×10^6 células/ml. Según el método de la invención, la densidad celular alcanzada antes de que tenga lugar la infección vírica es al menos de 8×10^6 células/ml, 9×10^6 células/ml, 10×10^6 células/ml, 11×10^6 células/ml, 12×10^6 células/ml o 13×10^6 células/ml. De manera adecuada, la densidad celular alcanzada antes de que tenga lugar la infección vírica puede ser al menos de 20×10^6 células/ml, 25×10^6 células/ml, o 30×10^6 células/ml. Dichos niveles de densidad alta pueden alcanzarse ventajosamente utilizando un sistema de perfusión para el cultivo celular. La densidad celular óptima para obtener la producción vírica más alta puede variar de acuerdo con el tipo de célula utilizada para la propagación vírica. Las técnicas convencionales de detección de proteínas, tales como el análisis de la transferencia Western, o el ensayo SRD para el virus de la gripe, o el CPE como se ha descrito anteriormente, también se pueden usar para determinar el intervalo de densidad celular óptima requerido para obtener un rendimiento vírico optimizado.

Para producir grandes cantidades de virus, puede ser también ventajoso implementar una fase de adsorción vírica. Por "fase de adsorción", se entiende que las células se inoculan con el virus a densidad alta, para favorecer la adsorción del virus en las membranas celulares, durante un corto periodo de tiempo, antes de que disminuya la densidad celular durante el resto del periodo de infección hasta que se recoge el virus. Por ejemplo, la inoculación de las células con el virus se lleva a cabo cuando la densidad celular es al menos de 8×10^6 células/ml, de forma adecuada al menos 9×10^6 células/ml, de forma adecuada al menos 10×10^6 células/ml, de forma adecuada al menos 11×10^6 células/ml, de forma adecuada al menos 12×10^6 células/ml, de forma más adecuada al menos 13×10^6 células/ml. De manera adecuada, la densidad celular puede ser incluso mayor, tal como 20×10^6 células/ml, 25×10^6 células/ml, o 30×10^6 células/ml. De forma adecuada 30 min, de forma más adecuada 45 min, de forma más adecuada 1 h, 1h30, o 2h después de la inoculación con el virus, las células inoculadas se pueden diluir por un factor comprendido de 2 a 5, de forma adecuada 3, durante el resto del proceso de infección, es decir para incubación adicional antes de que se recoja el virus producido. En una realización, 1h30 después de la inoculación con el virus, las células inoculadas se diluyeron por un factor comprendido de 2 a 5, y se mantuvo durante la incubación adicional. Como alternativa, al final de la fase de adsorción, las células inoculadas se pueden diluir para obtener una densidad celular final comprendida de 3 a 5×10^6 células/ml, de forma adecuada 4×10^6 células/ml, durante el resto del proceso de infección, es decir para incubación adicional antes de que se recoja el virus producido.

En una realización alternativa, cuando la densidad celular es al menos de 8×10^6 células/ml, al menos 9×10^6 células/ml, al menos 10×10^6 células/ml, al menos 11×10^6 células/ml, al menos 12×10^6 células/ml, al menos 13×10^6 células/ml, las células se inocularon con el virus, e inmediatamente después de la inoculación, se diluyeron las células inoculadas, bien por un factor comprendido de 2 a 5, o para obtener una densidad celular final que varía de 3 a 5×10^6 células/ml, durante el resto del proceso de infección, es decir para incubación adicional antes de que se recoja el virus producido.

Cuando se implementa una fase de adsorción, la entrada de potencia volumétrica puede mantenerse de manera adecuada a un nivel bajo, tal como, por ejemplo, a un valor que varía de 2 a 10 W/m^3 , de 4 a 8 W/m^3 , de forma adecuada a 7 W/m^3 , durante dicha fase, es decir, después que se inocularon las células con el virus de interés y antes de que se diluyeran las células inoculadas. De acuerdo con la invención, El procedimiento para producir un virus en un cultivo celular comprende al menos las etapas de a) proporcionar una población de células cultivadas en un medio de cultivo, b) infectar la población con el virus, inoculando la población con el virus cuando la densidad celular es al menos de 8×10^6 células/ml, al menos 9×10^6 células/ml, al menos 10×10^6 células/ml, al menos 11×10^6 células/ml, al menos 12×10^6 células/ml, o al menos 13×10^6 células/ml durante 1h30 y diluyendo a continuación las células inoculadas por un factor comprendido de 2 a 5 o alternativamente, para que la densidad celular final obtenida varíe de 3×10^6 células/ml a 5×10^6 células/ml y ii. incubar la población inoculada diluida para permitir que el virus se replique y propague, siendo la entrada de potencia volumétrica aplicada al cultivo celular de 30 W/m^3 o 120 W/m^3 , antes de que las células se inoculen con el virus y a continuación se reduzcan a 7 W/m^3 , después de que las células se inoculasen y antes de que las células inoculadas se diluyeran, y se aumentó a 30 W/m^3 o 120 W/m^3 después de que las células inoculadas se diluyeran y hasta que se recogió el virus producido. Como alternativa, la entrada de potencia volumétrica puede mantenerse a un valor constante a través de la fase de adsorción. Por consiguiente, la entrada de potencia volumétrica aplicada al cultivo celular puede mantenerse en al menos 15 W/m^3 , al menos 30 W/m^3 , al menos 60 W/m^3 , al menos 100 W/m^3 , o al menos 120 W/m^3 , a través de las etapas sucesivas de proporcionar una población de células cultivadas en un medio de cultivo celular, inoculando dicha población con el virus de interés durante 30 min, 45 min, 1 h, 1h30, o 2 h, diluyendo las células inoculadas de acuerdo con las anteriores condiciones, e incubando la población inoculada diluida.

La inoculación puede llevarse a cabo a una MOI (Multiplicidad de infección) de aproximadamente 10^{-1} a 10^{-7} , de forma adecuada aproximadamente 10^{-2} a 10^{-6} , y de forma más adecuada, aproximadamente 10^{-5} .

La temperatura y las condiciones del pH para la infección vírica pueden variar. La temperatura puede variar de 32 °C a 39 °C dependiendo del tipo de virus. Para la producción del virus de la gripe, la infección del cultivo celular puede variar dependiendo de la cepa que se produce. La infección con el virus de la gripe se lleva a cabo de forma adecuada a una temperatura comprendida de 32 °C a 35 °C, de forma adecuada a 33 °C. Por ejemplo, la infección por el virus puede producirse a 33 °C. Como alternativa, la infección por el virus puede tener lugar a 35 °C. Las proteasas, normalmente tripsina, pueden añadirse al cultivo celular dependiendo de la cepa del virus, para permitir la replicación vírica. La proteasa puede añadirse en cualquier etapa adecuada durante el cultivo. La tripsina es preferentemente de origen no animal, es decir, la proteasa no está purificada a partir de una fuente animal. se produce recombinantemente de manera adecuada en un microorganismo, tal como una bacteria, levadura o planta. Los ejemplos adecuados de tripsina recombinante son Trypzean, una tripsina recombinante producida en maíz (Prodigen, 101 Gateway Blvd, Suite 100 College Station, Texas 77845. Código del fabricante: TRY), o TrpLE (Invitrogen) que es una enzima similar a tripsina expresada en hongos (documento WO2004/020612). En una realización, se añade la tripsina al mismo tiempo que se inocula el virus a las células, es decir, se añade la tripsina en el día 0 (D0). En una realización adicional, se añade la tripsina adicionalmente en diferentes puntos temporales después de la inoculación, tal como, por ejemplo, en el día 1 (D1) y/o día 4 (D4) después de la inoculación. Como alternativa, se puede añadir la tripsina adicionalmente cada día después de la inoculación del virus hasta que se recoge el virus producido.

Una vez infectadas, las células pueden liberar en el medio de cultivo partículas víricas de nueva formación, debido a la lisis espontánea de las células hospedadoras, denominada también lisis pasiva. Por consiguiente, se puede proporcionar la cosecha vírica producida por células algún tiempo después de la inoculación vírica recogiendo el medio de cultivo celular. Este modo de recogida es particularmente adecuado cuando se desea recoger el virus producido por células en diferentes puntos temporales tras la inoculación del virus, y combinar las diferentes cosechas, si es necesario.

Como alternativa, tras la infección vírica, los virus basados en cultivos celulares pueden recogerse empleando factores externos para lisar las células hospedadoras, denominado también lisis activa. Sin embargo, al contrario que lo anterior, dicho modo de recogida requiere que la cosecha vírica derivada de células se recoja en un único punto temporal, ya que la lisis activa de las células terminará inmediatamente el cultivo celular.

El experto en la materia conoce los procedimientos que se pueden usar para activar la lisis celular. Los procedimientos útiles a este respecto son por ejemplo, congelación-descongelación, cizalladura sólida, lisis hipertónica y/o hipotónica, cizalladura líquida, extrusión a alta presión, lisis con detergentes, c cualquier combinación de los mismos.

Por ejemplo, se puede proporcionar la cosecha vírica basada en cultivos celulares algún tiempo después de la inoculación vírica recogiendo los sobrenadantes de cultivos celulares, lisando las células inoculadas o ambos.

Antes de la recogida, la infección celular puede durar durante 2 a 10 días. Por ejemplo, los sobrenadantes de cultivos de los días 3, 4 y 5 después de la inoculación pueden recogerse y combinarse para un procesamiento posterior adicional (aislamiento vírico o purificación vírica). En particular, el sobrenadante del cultivo celular puede recogerse a partir del día 5 después de la inoculación. El tiempo óptimo para recoger los virus producidos por células se basa usualmente en la determinación del pico de infección. Por ejemplo, el CPE (efecto citopático) se mide controlando los cambios morfológicos que se producen en las células hospedadoras después de la inoculación del virus, incluyendo el redondeo celular, la desorientación, la hinchazón o la contracción, muerte, el despegue de la superficie. Puede controlarse también la detección de un antígeno vírico específico mediante técnicas convencionales de detección de proteínas, tal como un análisis de transferencia Western. La recogida puede recogerse a continuación cuando se consigue el nivel de detección deseado. En el caso particular del virus de la gripe, el contenido de HA puede controlarse en cualquier momento tras la inoculación de las células con el virus, mediante el ensayo SRD (Wood, JM, y col. (1977). J. Biol. Standard. 5, 237-247), que es una técnica familiar para una persona experta en la materia. Adicionalmente, el ensayo SRD se puede usar también para determinar el intervalo de densidad celular óptima requerido para obtener un rendimiento vírico optimizado.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que la fase de cultivo celular abarca cualquier etapa que precede la etapa de recogida vírica, mientras que debe entenderse que la fase de purificación vírica abarca cualquier etapa que sigue a dicha etapa de recogida.

De acuerdo con la invención, tras la producción en cultivo celular, el virus se purifica. Cualquier etapa o técnica adecuada conocida en el campo de la purificación vírica puede implementarse de forma adecuada durante el procedimiento de la invención después que se recoge el virus producido. Por ejemplo, el procedimiento de la invención puede comprender al menos una etapa seleccionada entre clarificación de la recogida vírica, ultrafiltración/diafiltración, ultracentrifugación y cromatografía o cualquier combinación de las mismas. Dependiendo del nivel de pureza que se desee, las etapas anteriores pueden combinarse de cualquier manera.

De acuerdo con la invención, durante la fase de purificación del virus, el procedimiento de la invención comprende al menos una etapa de clarificación de la recogida vírica mediante microfiltración, y una etapa de ultracentrifugación en

gradiente de sacarosa.

Tras recoger el medio de cultivo celular que contiene el virus de las células infectadas, la recogida vírica proporcionada se clarifica normalmente a fin de separar el virus del material celular, tal como células intactas o desechos celulares. La clarificación puede llevarse a cabo mediante una etapa de filtración, normalmente una etapa de microfiltración, es decir, utilizando filtros que tienen un tamaño de poro entre 0,1 µm y 10 µm. Los filtros adecuados pueden utilizar filtros de celulosa, filtros de celulosa regenerados, fibras de celulosa combinadas con adyuvantes de filtros inorgánicos, filtros de celulosa combinados con adyuvantes de filtros inorgánicos y resinas orgánicas, o cualquier combinación de los mismos, y filtros poliméricos. Aunque no es necesario, se puede llevar a cabo un procedimiento de filtración múltiple, similar a un procedimiento en dos o tres etapas que consiste, por ejemplo, eliminar las impurezas de forma secuencial y progresiva según su tamaño, usando filtros con tamaño de poro nominal adecuado, en particular, filtros con tamaño de poro nominal decreciente, que permiten comenzar a retirar precipitados grandes y residuos celulares. Además, también se pueden usar operaciones de una sola etapa que emplean un filtro relativamente fino o centrifugación para la clarificación. Más generalmente, cualquier estrategia de clarificación que incluya, aunque no de forma limitativa, la filtración de flujo directo o filtración de "final obturado", filtración de profundidad, la filtración de flujo tangencial o la filtración de flujo cruzado, o centrifugación, que proporcionan un filtrado de claridad adecuada para no ensuciar la membrana y/o las resinas en posteriores etapas, será aceptable para usar en la etapa de clarificación de la presente invención. Por ejemplo, la etapa de clarificación vírica se puede llevar a cabo mediante filtración de lecho profundo, en particular, usando un tren de filtración en tres etapas compuesto, por ejemplo, de tres filtros de lecho profundo diferentes con porosidades nominales de 5 µm - 0,5 µm - 0,2 µm. De acuerdo con la invención, la recogida vírica se clarifica mediante microfiltración, precedida opcionalmente por una etapa de centrifugación como preclarificación. Se describen en el presente documento procedimientos para producir un virus, tales como el virus de la gripe, que comprende una etapa de clarificación por microfiltración durante la etapa d) de purificación, en el que el rendimiento vírico, tal como el rendimiento de HA para el virus de la gripe, obtenido después de dicha etapa de clarificación es al menos del 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 90 % o más.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, durante la fase de purificación del virus, la cosecha vírica también puede someterse a ultrafiltración (denominada algunas veces diafiltración cuando se usa para el intercambio de tampones), para concentrar el virus y/o el intercambio de tampones. Esta etapa es particularmente ventajosa cuando se diluye el virus que se va a purificar, como es el caso, por ejemplo, cuando se combina la cosecha vírica recogida por perfusión durante unos pocos días tras la inoculación. El procedimiento usado para concentrar el virus y/o el tampón de intercambio de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede incluir cualquier procedimiento de filtración donde la concentración del virus se aumenta forzando el diluyente que va a pasar a través de un filtro de tal manera que el diluyente se elimina de la suspensión del virus mientras que el virus es incapaz de pasar a través del filtro y permanece por tanto en forma concentrada en la preparación del virus.

Si se usan membranas o filtros que no son neutros, pero que están cargados positivamente, puede ser útil implementar una etapa adicional de enjuagar dicha membrana o filtro con un tampón de enjuague que comprende sales para eluir la fracción vírica que puede haberse retenido debido a las interacciones iónicas con la membrana o el filtro. Un ejemplo de sal adecuada que se puede incluir en el tampón de enjuague es cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente a una concentración que varía de 0,1 M a 2 M, en particular, de 0,5 M a 1,5 M, de forma adecuada 1 M. Por ejemplo, cuando la clarificación se lleva a cabo mediante filtración de membrana, ya sea como preclarificación o clarificación, dicha clarificación comprende una etapa de enjuagado de la membrana con un tampón que comprende NaCl, en particular, NaCl 1 M.

La ultrafiltración puede comprender la diafiltración, que es una manera ideal para la eliminación y el intercambio de sales, azúcares, disolventes no acuosos, eliminación de material de bajo peso molecular, de cambio rápido de entornos iónicos y/o de pH. Los microsolutos se eliminan más eficazmente añadiendo disolvente a la solución que se está ultrafiltrando a una tasa igual a la tasa de ultrafiltración. Esto lava las microespecies de la solución a un volumen constante, aislando el virus retenido. La diafiltración es particularmente ventajosa cuando una etapa posterior requiere que se use un tampón específico a fin de conseguir una reacción óptima. Por ejemplo, implementar una etapa de diafiltración antes de degradar los ácidos nucleicos de las células hospedadoras con una endonucleasa puede permitir realizar la reacción de la endonucleasa en un tampón específico y óptimo para esta endonucleasa. Se pueden implementar también la concentración y la diafiltración en cualquier etapa adecuada del procedimiento de purificación, cuando se desea eliminar compuestos indeseables, tales como sacarosa, tras una centrifugación en gradiente de sacarosa, o tal como formaldehído, tras una etapa de inactivación vírica con formaldehído. El sistema está compuesto de tres corrientes de proceso distintas: la solución de alimentación (que comprende el virus), el permeato y el retentato. Dependiendo de la aplicación, se pueden usar filtros con diferentes tamaños de poro. En la presente invención, el retentato contiene el virus y se puede usar para etapas de purificación adicionales, si se desea. La composición de membrana puede ser, aunque no de forma limitativa, celulosa regenerada, polietersulfona, polisulfona o derivados de las mismas. Las membranas pueden ser láminas planas (denominadas también tamices planos) o fibras huecas.

Por ejemplo, la fase de purificación vírica del procedimiento de la invención puede comprender al menos una etapa de ultrafiltración/diafiltración, de forma adecuada al menos dos etapas de ultrafiltración/diafiltración.

Dependiendo de cuál sea la aplicación para la que se ha producido el virus producido a partir del cultivo celular

purificado, puede ser también necesario eliminar de la cosecha vírica los ácidos nucleicos contaminantes víricos de las células hospedadoras. En particular, cuando el virus purificado es para incluirse en una vacuna, los ácidos nucleicos de células hospedadoras deben degradarse y eliminarse de los virus purificados. La degradación de los ácidos nucleicos se produce frecuentemente a través del uso de nucleasas que se dirigen al ARN y ADN. Un ejemplo no limitante de una nucleasa adecuada para degradar ácidos nucleicos de células hospedadoras es Benzonase™. Benzonase™, o cualquier otra nucleasa adecuada, puede añadirse a cualquier etapa adecuada de un procedimiento de purificación vírica. Por ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender una etapa de degradación con nucleasa, de forma adecuada, un tratamiento con Benzonase™. Por ejemplo, se puede añadir una nucleasa al retentato añadido tras la ultrafiltración de un medio de cultivo de células que contiene el virus clarificado. Como alternativa, se puede conseguir la degradación de los ácidos nucleicos de células hospedadoras mediante una etapa de inactivación vírica con beta-propiolactona.

Si se desea, el virus obtenido de acuerdo con la presente invención puede purificarse adicionalmente usando técnicas convencionales empleadas para la purificación vírica tal como centrifugación en gradiente de densidad, por ejemplo, ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y/o cromatografía, tal como cromatografía de intercambio iónico. Por consiguiente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende al menos una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. La fase de purificación del procedimiento de la invención puede comprender también al menos una etapa de clarificación, tal como por ejemplo, una etapa de centrifugación seguida por una etapa de microfiltración, al menos una etapa de ultrafiltración y una etapa de centrifugación en gradiente de sacarosa. Por ejemplo, en la que el procedimiento de producir un virus, tal como el virus de la gripe, de acuerdo con la invención, comprende al menos una etapa de centrifugación en gradiente de sacarosa durante la etapa d) de purificación, la capacidad de carga en el rotor de la centrífuga es al menos 40, al menos 50, al menos 60, o más, litros de recogida vírica, o la cantidad "equivalente", por litro de rotor, y el rendimiento vírico, tal como el rendimiento de HA para el virus de la gripe, obtenido después de dicha etapa de centrifugación en gradiente de sacarosa es al menos del 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 90 % o más.

Según el método de la invención, puede ser posible combinar una etapa de purificación, tal como ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, con una etapa de división vírica. En particular, se puede añadir un agente de división al gradiente de sacarosa. Esto es particularmente adecuado, cuando se desea minimizar el número total de etapas del procedimiento de la invención, de forma que permita, en una operación única, purificar y dividir el virus. Por lo tanto, cuando se implementa al menos una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, el gradiente de sacarosa puede comprender adicionalmente un agente de división.

Como alternativa, La etapa división vírica del procedimiento de la presente invención, cuando se implementa, puede llevarse a cabo de forma discontinua.

Al final de la fase de purificación vírica, la preparación vírica obtenida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede someterse de forma adecuada a esterilización por filtración, como es habitual en procedimientos para materiales de calidad farmacéutica, tales como composiciones inmunógenas o vacunas, y conocidas por las personas expertas en la materia. Dicha esterilización por filtración puede por ejemplo llevarse a cabo de forma adecuada filtrando la preparación a través de un filtro de 0,22 µm. Tras una preparación estéril, el virus o los antígenos víricos están listos para el uso clínico, si se desea.

Las composiciones inmunógenas, en particular, las vacunas, pueden generalmente formularse en forma de subviriones, por ejemplo, en la forma de un virus dividido, donde la envoltura lipídica se ha disuelto o alterado, o está en la forma de una o más proteínas víricas purificadas (vacuna subunitaria). Como alternativa, las composiciones inmunógenas pueden incluir un virus completo, por ejemplo, un virus completo atenuado vivo, o un virus completo inactivado.

Los procedimientos de dividir virus, tales como el virus de la gripe, se conocen bien en la técnica (documento WO02/28422). La división de los virus se lleva a cabo alterando o fragmentando el virus completo tanto infeccioso (natural o atenuado) como no infeccioso (inactivado) con una concentración de alteración de un agente de división. Los agentes de división incluyen generalmente agentes capaces de romper y disolver membranas lipídicas. Tradicionalmente, la división del virus de la gripe se produjo usando un tratamiento con disolvente/detergente, tal como tri-n-butil fosfato, o dietiléter en combinación con Tween™ (conocido como divisor "Tween-éter") y este procedimiento se usa todavía en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de división empleados ahora incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliars, por ejemplo, desoxicolato de sodio. Los detergentes que se pueden usar como agentes de división incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, lauril sulfato de sodio (SLS), taurodesoxicolato, o detergentes iónicos tales como Tween o Triton X-100, o una combinación de cualquiera de dos o más detergentes.

Por ejemplo, el agente de división puede ser desoxicolato. Como alternativa, el agente de división puede ser Triton X-100 o puede usar una combinación de Triton X-100 y lauril sulfato de sodio como agentes de división.

El proceso de división puede llevarse a cabo como un procedimiento discontinuo, continuo o semicontinuo. Cuando se implementa de forma discontinua, el virus dividido puede requerir una etapa adicional de purificación, tal como una etapa de cromatografía. No es necesario implementar una etapa de división como tal, ya que es posible llevar a cabo

la división simultáneamente con una etapa de purificación. Por ejemplo, se puede añadir un detergente al gradiente de sacarosa destinado a purificar las proteínas víricas mediante ultracentrifugación, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender una etapa de división llevada a cabo de forma discontinua con un detergente, en particular, Triton X-100, además de al menos una etapa de homogeneización.

Para la seguridad de las vacunas, puede ser necesario reducir la infectividad de la suspensión vírica a lo largo de diferentes etapas del procedimiento de purificación. La infectividad de un virus se determina por su capacidad de replicarse en una línea de células. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención, opcionalmente, puede incluir al menos una etapa de inactivación vírica. La inactivación puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, beta-propiolactona (BPL), formaldehído, o UV, o cualquier combinación de los mismos, en cualquier etapa adecuada del procedimiento. En una realización específica, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende además al menos una etapa de tratamiento BPL. Como alternativa, el procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender además al menos una etapa de tratamiento BPL y al menos una etapa de tratamiento con formaldehído. Formaldehído y BPL se pueden usar secuencialmente, en cualquier orden, por ejemplo, formaldehído se usa después del BPL. Por ejemplo, el tratamiento con formaldehído puede ir seguido de al menos una etapa de homogeneización. Cuando se use, en particular, UV como el procedimiento de inactivación, implementar la homogeneización de la preparación del virus antes de la irradiación UV, puede ayudar a mejorar la eficacia de la inactivación vírica. Los virus, o parte de los virus, que estarían presentes en el interior de agregados, ya sean agregados víricos o agregados de virus/células, pueden escapar a la irradiación debido al soterramiento en dichos agregados y, por tanto, a la no accesibilidad de algunos virus o parte de virus al agente de inactivación. Por ejemplo, la preparación vírica obtenida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede inactivarse, por ejemplo, mediante irradiación UV, y realizarse la homogeneización inmediatamente antes de dicha inactivación. Las condiciones de inactivación vírica pueden variar y se determinarán, en particular, evaluando la infectividad del virus residual midiendo la Dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID₅₀/ml).

Las composiciones inmunógenas de la presente invención, incluyendo vacunas, pueden contener opcionalmente los aditivos habituales para las vacunas, en particular, sustancias que aumentan la respuesta inmunitaria estimulada en un paciente que recibe la composición, es decir, los denominados adyuvantes.

Se pueden contemplar composiciones inmunógenas, que comprenden un virus o antígeno vírico de la presente invención premezclado con un vehículo farmacéutico adecuado. Pueden comprender un adyuvante.

Las composiciones adyuvantes pueden comprender una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable y un agente emulsionante. Para que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para su administración a un ser humano, la fase oleosa del sistema de emulsión ha de comprender un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable se puede definir como 'poder transformarse mediante metabolismo' (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25^a Edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y pueda transformarse mediante metabolismo. Frutos secos, semillas, y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos son también parte de la presente invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros.

Un aceite metabolizable particularmente adecuado es escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en cantidades inferiores en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levadura, y es un aceite particularmente preferido para su uso en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable porque es un intermedio en la biosíntesis del colesterol (Índice Merrck, 10^a edición, n.º de entrada 8619). Por ejemplo, el aceite metabolizable puede estar presente en la composición inmunógena en una cantidad de 0,5 % a 10 % (v/v) del volumen total de la composición.

La emulsión de aceite en agua puede comprender además un agente emulsionante. El agente emulsionante puede ser de forma adecuada monoleato de sorbitán polioxietileno. Adicionalmente, dicho agente emulsionante puede estar presente de forma adecuada en la vacuna o composición inmunógena de 0,125 a 4 % (v/v) del volumen total de la composición.

La emulsión de aceite en agua puede comprender opcionalmente un tocol. Los tocoles son bien conocidos en la técnica, y se describen en el documento EP0382271. Un tocol que puede ser adecuado es el alfa tocoferol o un derivado del mismo como el succinato de alfa tocoferol (conocido también como succinato de vitamina E). Dicho tocol puede, de forma adecuada, estar presente en la composición adyuvante en una cantidad de 0,25 % a 10 % (v/v) del volumen total de la composición inmunógena.

El procedimiento de producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido para la persona experta en la materia. De manera habitual, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa (que comprende opcionalmente un tocol) con un tensioactivo tal como una solución de PBS/TWEEN80™, seguido por la homogeneización usando un homogeneizador, será evidente para un experto en la materia que un procedimiento que comprende pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringuilla sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido.

Igualmente, el experto en la materia podría adaptar el proceso de emulsión en un microfluidizador (equipo M110S Microfluidics, máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares) para producir volúmenes más pequeños o más grandes de emulsión. La adaptación podría conseguirse mediante experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión de la emulsión resultante hasta que se consiguió una preparación con gotículas de aceite del diámetro requerido.

En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante están en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

En particular, los sistemas de emulsión de aceite en agua de la presente invención tienen un tamaño de gotículas de aceite pequeños en el intervalo de los submicrómetros. De forma adecuada, los tamaños de gotículas estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, más particularmente, tamaños de 120 a 600 nm de diámetro. Aun más particularmente, la emulsión de aceite en agua contiene gotículas de aceite del cual al menos un 70 % en intensidad son menores de 500 nm de diámetro, de forma más concreta, al menos 80 % en intensidad son menores de 300 nm de diámetro, de forma más concreta, al menos 90 % en intensidad están en el intervalo de 120 a 200 nm de diámetro.

El tamaño de la gotícula de aceite, es decir, el diámetro, de acuerdo con la presente invención se proporciona por la intensidad. Existen varias maneras de determinar el diámetro del tamaño de las gotículas de aceite mediante la intensidad. La intensidad se mide mediante el uso de un instrumento de dimensionamiento, de forma adecuada, mediante la dispersión de luz dinámica tal como el Malvern Zetasizer 4000 o de forma adecuada el Malvern Zetasizer 3000HS. Se proporciona un procedimiento detallado en el Ejemplo II.2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro promedio z ZAD mediante dispersión de luz dinámica (PCS-Espectroscopía de correlación de fotones); este procedimiento proporciona adicionalmente el índice de polidispersidad (PDI) y el ZAD y el PDI se calculan con el algoritmo de acumuladores. Estos valores no requieren el conocimiento del índice de refracción de partículas. Un segundo medio es calcular el diámetro de la gotícula de aceite determinando la distribución del tamaño de partículas completo mediante otro algoritmo, ya sea el Contin, o el NNLS, o el aparato "Malvern" one (el algoritmo por defecto proporcionado por un instrumento de dimensionamiento). La mayoría del tiempo, dado que el índice de refracción de partículas de una composición compleja es desconocido, solo se tiene en consideración la distribución de la intensidad, y si es necesario, la media de la intensidad que se origina a partir de esta distribución.

Las composiciones adyuvantes pueden comprender además un agonista 4 del receptor de tipo Toll. Por "agonista TLR4" se entiende un componente que es capaz de producir una respuesta de señalización a través de una ruta de señalización de TLR4, ya sea un ligando directo o indirectamente a través de la generación de un ligando endógeno o exógeno (Sabroe y col, JI 2003 p1630-5). El TLR 4 puede ser un derivado del lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más concretamente monofosforil lípido A 3 desacilado (3 D - MPL).

3D-MPL está disponible bajo la marca comercial MPL® de GlaxoSmithKline Biologicals North America y promueve principalmente las respuestas de los linfocitos T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Se puede producir de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En particular, en las composiciones adyuvantes de la presente invención se usa 3 D-MPL de partícula pequeña. 3 D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partículas de tal manera que puede esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,22 μ m. Dichas preparaciones se describen en la solicitud de patente internacional n.º WO 94/21292. Se conocen derivados sintéticos del lípido A y se cree que son agonistas TLR 4 que incluyen, pero sin limitación:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-o-fosfono- β -D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- α -D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO 95/14026)

OM 294 DP (3S, 9 R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (Documentos WO99 /64301 y WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127)

Otros ligandos de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquil glucosaminida (AGP) tales como los desvelados en los documentos WO9850399 o US6303347 (se desvelan también los procedimientos para la preparación de AGP), o las sales farmacéuticamente aceptables de los AGP como los desvelados en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes. Además, además, se desvelan agonistas TLR-4 adecuados en los documentos US2003/0153532 y US2205/0164988.

La invención es particularmente adecuada para preparar composiciones inmunógenas del virus de la gripe, incluyendo vacunas. Están actualmente disponibles varias formas del virus de la gripe. Se basan generalmente tanto en el virus vivo como en el virus inactivado. Las vacunas inactivadas pueden basarse en viriones completos, viriones en división o antígenos superficiales purificados (incluyendo HA). Se pueden presentar también antígenos de la gripe en la forma de virosomas (partículas liposómicas de tipo vírico exentas de ácidos nucleicos).

Se han descrito anteriormente procedimientos de inactivación y procedimientos de división de virus y son aplicables al virus de la gripe.

5 Cepas del virus de la gripe para su uso en el cambio de estación a estación. En el periodo interpandémico actual, las vacunas normalmente incluyen dos cepas de gripe A y una cepa de gripe B. Son típicas las vacunas trivalentes, pero una valencia mayor, tal como cuadrivalencia, se contempla también en la presente invención. La invención puede usar también HA de cepas pandémicas (es decir, cepas a las cuales el receptor de vacuna y la población humana general no han estado inmunitariamente expuestas previamente), y las vacunas de la gripe para las cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal suplementada por una cepa pandémica.

10 Las composiciones pueden incluir uno o varios antígenos procedentes de una o más cepas del virus de la gripe, incluyendo el virus de la gripe A y/o el virus de la gripe B. En particular, se describe una vacuna trivalente que incluye antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B en la presente divulgación. Como alternativa, se describe también en el presente documento una vacuna cuadrivalente que incluye antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y dos cepas del virus de la gripe B.

15 Las composiciones pueden no estar restringidas a composiciones monovalentes, es decir, que incluyen solo un tipo de cepa, es decir, solo cepas estacionales o solo cepas pandémicas. La divulgación describe también composiciones multivalentes que comprenden una combinación de cepas estacionales y/o de cepas pandémicas. En particular, una composición cuadrivalente, que puede ser adyuvada, que comprende tres cepas estacionales y una cepa pandémica que se encuentran comprendidas en el ámbito de la invención. Otras composiciones descritas en el presente documento son una composición trivalente que comprende dos cepas A y una cepa B, tal como H1N1, cepas H3N2 y B, y una composición cuadrivalente que comprende dos cepas A y dos cepas B de un linaje diferente, tal como H1N1, H3N2, B/Victoria y B/Yamagata.

25 HA es el principal inmunógeno de las vacunas de la gripe inactivadas actuales, y las dosis de vacunas están normalizadas por referencia a los niveles de HA, medidos normalmente mediante SRD. Las vacunas existentes contienen normalmente aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque se pueden usar dosis más bajas, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas, o cuando se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionadas tales como una mitad (es decir, 7,5 µg HA por cepa) o un cuarto, que tienen dosis superiores, en particular, 3x o 9x dosis. Por tanto, las composiciones inmunógenas de la presente invención pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, particularmente, entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Las dosis concretas incluyen aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5 µg por cepa, aproximadamente 3,8 µg por cepa y aproximadamente 1,9 µg por cepa.

Una vez que un virus de la gripe se ha purificado para una cepa concreta, puede combinarse con virus de otras cepas para preparar una vacuna trivalente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Es más adecuado tratar dicha cepa por separado mezclar volúmenes monovalentes para dar una mezcla multivalente final, más bien que mezcla virus y degradar el ADN y purificar este a partir de una mezcla multivalente.

35 La invención se describirá adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo I: Producción de virus de la gripe usando una potencia volumétrica alta

- Se sembraron células EB66® en un biorreactor desechable de 200 l (Cultibag STR de Sartorius AG que incluye un impulsor de pala inclinada, o una turbina Rushton, lo que sea adecuado) a una densidad de aproximadamente $0,4 \times 10^6$ células/ml en un volumen total de 65 l, y crecieron en suspensión en modo discontinuo a 36,5 °C a una velocidad de agitación de 105 rpm que corresponde a la aplicación de una entrada de potencia volumétrica de al menos 30 W/m^3 (N.º 039, N.º 048, N.º 052, N.º 058, N.º 044, N.º 046, y N.º 043), o 135 rpm que corresponde a la aplicación de una entrada de potencia volumétrica de al menos 120 W/m^3 (N.º 053 y N.º 057), o 65 rpm que corresponde a la aplicación de una entrada de potencia volumétrica de al menos 7 W/m^3 (No. 025, N.º 026, N.º 027 y 031). Se consiguió la entrada de potencia volumétrica de al menos 30 W/m^3 usando el biorreactor desechable que incluye un impulsor de pala inclinada, mientras que se consiguió una entrada de potencia de al menos 120 W/m^3 usando el biorreactor desechable incluyendo una turbina Rushton.
- Después de 3 días de crecimiento, la densidad celular alcanzó al menos 9×10^6 células/ml. En ese momento, las células se inocularon con una solución que comprendía el virus de la gripe H5N1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1×10^{-5} y tripsina (30 mrPu/ml TrpLE de Invitrogen), que se consideró el Día 0 (D0) y la temperatura se cambió a 35 °C. 1h30 después de la inoculación, la suspensión celular inoculada se sometió a una dilución por un factor de 3 añadiendo medio nuevo hasta un volumen total de 200 l. Durante el periodo de tiempo de 1h30 anterior, la entrada de potencia volumétrica se redujo a 7 W/m^3 (N.º 039, N.º 048, N.º 052, N.º 058, N.º 044, N.º 046, N.º 043, N.º 053 y N.º 057) o se mantuvo 7 W/m^3 (No. 025, N.º 026, N.º 027 y 031).
- Inmediatamente después de que se diluyeran las células inoculadas, se aumentó de nuevo la entrada de potencia volumétrica hasta al menos 30 W/m^3 (N.º 039, N.º 048, N.º 052, N.º 058, N.º 044, N.º 046, y N.º 043), o al menos 120 W/m^3 (N.º 053 y N.º 057) y se mantuvo a dichos niveles o se mantuvo a 7 W/m^3 (N.º 025, N.º 026, N.º 027 y N.º 031), hasta que se recogió el medio de cultivo que contenía el virus, 5 días después de la inoculación del virus, produciendo por tanto la cosecha vírica. Se añadió adicionalmente tripsina (10 mrPu/ml TrpLE de Invitrogen) en el Día 1 (D1) y el Día 4 (D4) después de la inoculación del virus.

- A continuación se purificó la cosecha vírica como se describe a continuación.

Ejemplo II: Efecto de una potencia volumétrica alta sobre la microfiltración

- Una vez recogida, la cosecha vírica se preclarificó mediante centrifugación continua a 10500 rpm a 90 l/h, produciendo de esta forma la cosecha vírica preclarificada.
- 5 - La cosecha preclarificada se sometió a continuación a una etapa de microfiltración usando una membrana de lámina plana de 0.45 μm (Sartorius AG), a TMP constante (Presión transmembrana) y un caudal de alimentación (3 psi y 600 l/m²/h, respectivamente), produciendo de esta forma la cosecha vírica clarificada.
- Se evaluó el rendimiento vírico de la gripe en la etapa de microfiltración midiendo el contenido de HA y después de dicha etapa de acuerdo con el ensayo SRD, como se describe más adelante en el Ejemplo IV. Se presentaron los resultados en la Tabla 1 en forma de porcentajes que se van a comparar con el valor 100 % del control que representa la cantidad total de HA presente en el material de partida, es decir, presente en la cosecha vírica preclarificada antes de la microfiltración.

Tabla 1 - Rendimiento de HA después de la microfiltración - potencia volumétrica baja frente a potencia volumétrica alta

Experimento N.º	Entrada de potencia volumétrica	Célula Densidad en la inoculación vírica	Producción vírica a D5 pi *	Rendimiento de HA de la microfiltración
	V/ m ³	X 10 ⁶ células/ml	μg HA/ml	%
039	30	12	67	71
052	30	12,6	92	82
058	30	11	82	81
Promedio			80	78
** Desv. Est.				6
053	120	12,6	88	70
057	120	11	79	63
Promedio			84	67
** Desv. Est.				5
025	7	13	75	41
26	7	11	57	91
27	7	9,3	82	77
031	7	13	81	44
Promedio			74	63
** Desv. Est.				25

* pi: inoculación postvírica

** Desv. Est.: Desviación estándar

Resultados- Conclusiones

Aunque el aumento de la entrada de potencia volumétrica durante la fase de cultivo celular (30 W/m³ frente a 7 W/m³) no tubo impacto sobre el rendimiento de HA presente en la cosecha vírica recogida (véase la Tabla 1, cuarta columna "Producción vírica a D5 pi"), se observó un impacto positivo en el rendimiento de HA conseguido en la etapa de microfiltración posterior. No solo es el rendimiento de HA obtenido tras la microfiltración superior cuando la entrada de potencia volumétrica es superior (véanse las filas *promedio* respectivas), sino que los valores obtenidos de un experimento a otro son también más consistentes y menos variables (véanse las filas de Desv. Est. respectivas - 6 frente a 25 cuando la entrada de potencia volumétrica es 30 o 7, respectivamente). Estos resultados indican que una entrada volumétrica superior durante la fase de cultivo celular anterior da como resultado rendimientos de HA mejorados y más consistentes durante la fase de purificación vírica posterior.

Ejemplo III: Efecto de la potencia volumétrica alta sobre la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

- Se hicieron crecer las células y se infectaron con virus de la gripe H5N1, y se recogió el virus como se ha descrito

en el Ejemplo I anterior.

- Se preclarificó la cosecha vírica, y la cosecha preclarificada se sometió a microfiltración como se describe en el Ejemplo II.
- A continuación se concentró la cosecha vírica clarificada 10 veces mediante ultrafiltración con una membrana de fibra hueca de 750 kD fabricada de polisulfona y se diafiltró contra 5 volúmenes de PBS que contenían citrato 125 mM pH 7,4 a TMP constante (Presión Transmembrana) y un caudal de alimentación (3 psi y 35 l/m²/h, respectivamente).
- El retentato de ultrafiltración se sometió a continuación a una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, en la que el virus y los contaminantes migran hacia el gradiente hasta alcanzar su densidad respectiva. El virus de la gripe tiene una densidad de aproximadamente 1,19 g/cm³ y por tanto sedimentará en el gradiente donde la concentración de sacarosa iguale la densidad del virus (aproximadamente 43 % de sacarosa). Tras la formación de un gradiente lineal continuo de 0 a 55 % de sacarosa en el rotor de la centrifuga, se cargó el retentato de la ultrafiltración en dicho rotor a una capacidad de carga del equivalente de retentato correspondiente a 30 l de cosecha por l de rotor (N.º 039, N.º 043, N.º 032, N.º 033, N.º 028 y N.º 029), o 50-60 l de cosecha por l de rotor (N.º 044A, N.º 044B, N.º 046, N.º 048, N.º 025, N.º 026, N.º 027, N.º 031), como se indica en las Tablas 2 y 3. Cuando se cargó la muestra completa, un tiempo de distribución en bandas de 1 h permitió al virus alcanzar su densidad y concentrarse en el gradiente de sacarosa antes que se detuviera la centrifuga y se descargara y fraccionara el gradiente de sacarosa. Las partículas víricas se concentraron en unas pocas fracciones. Las fracciones de producto se introdujeron en PBS, pH 7,4 que contenía citrato 125 mM y sacarosa. El virión completo purificado se combinó a partir del porcentaje de sacarosa comprendido de aproximadamente 30 a 50 %. Este intervalo se ha determinado sobre la base de perfiles de SDS-PAGE y del análisis por transferencia Western usando anticuerpos anti-HA.
- Se evaluó el rendimiento del virus de la gripe en la etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa midiendo el contenido de HA antes y después de dicha etapa de acuerdo con el ensayo SRD, como se describe más adelante en el Ejemplo IV. Se presentaron los resultados en la 2 y la Tabla 3 en forma de porcentajes que se van a comparar con el valor 100 % del control que representa la cantidad total de HA presente en el material de partida, es decir, presente en el retentato de ultrafiltración antes de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

Tabla 2 - Rendimiento de HA y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa a una capacidad de carga de 30 l de cosecha por l de rotor

Experimento N.º	Entrada de potencia volumétrica	Volumen del rotor	Capacidad de carga	Rendimiento de HA
	V/m ³	L	L Cosecha/l rotor	%
039	30	3,2	30	54
043A	30	3,2	30	70
043B	30	1,6	30	69
Promedio				72
* Desv. Est				17
032	7	3,2	30	95

30

033	7	3,2	30	78
028	7	3,2	30	87
029	7	3,2	30	67
Promedio				82
* Desv. Est				12

* Desv. Est.: Desviación estándar

La capacidad de carga indicada (30) corresponde a equivalente del retentado de ultrafiltración de los litros recogidos de virus durante la etapa c) del procedimiento de la invención cargados por litro de rotor de la centrífuga.

Resultados- Conclusiones

5 Para una capacidad de carga de 30 l de cosecha por l de rotor, el promedio del rendimiento de HA conseguido tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa está comprendido en el mismo intervalo aceptable, es decir, 72-82 %, cuando la entrada de potencia volumétrica es de 7 V/m³ o 30 V/m³.

Tabla 3 - Rendimiento de HA después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa a una capacidad de carga de 50-60 l de cosecha por l de rotor

Experimento N.º	Potencia volumétrica	Volumen del rotor	Capacidad de carga	Rendimiento de HA
	V/m ³	L	L Cosecha/l rotor	%
044A	30	1,6	60	75
044B	30	1,6	60	72
046	30	3,2	50	63
048	30	1,6	50	74
Promedio				71
* Desv. Est				5
025	7	3,2	60	12
026	7	3,2	60	29
027	7	1,6	60	35
031	7	1,6	60	50
Promedio				31
* Desv. Est				15

* Desv. Est.: Desviación estándar

10 La capacidad de carga indicada (50 o 60) corresponde a equivalente del retentado de ultrafiltración de los litros recogidos de virus durante la etapa c) del procedimiento de la invención cargados por litro de rotor de la centrífuga.

Resultados- Conclusiones

15 Para una capacidad de carga superior de 50 o 60 l de cosecha por l de rotor, cuando la entrada de potencia volumétrica es de 7 V/m³, es decir, a una entrada de potencia volumétrica baja, el promedio del rendimiento de HA conseguido tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa disminuyó significativamente (véase la Tabla 3, 31 %), al contrario

que el rendimiento de HA conseguido a una capacidad de carga de 30 l de cosecha por l de rotor con una entrada de potencia volumétrica baja similar (véase la Tabla 2, 82 %). Por el contrario, cuando la entrada de potencia volumétrica se aumentó a 30 V/m³, el promedio del rendimiento de HA conseguido tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en la capacidad de carga superior de 50-60 l de cosecha por l de rotor se mantuvo en el mismo intervalo aceptable (véase la Tabla 3, 71 %). Esto indica que el aumento de entrada de potencia volumétrica, durante la fase de cultivo celular (30 W/m³ frente a 7 W/m³) permite cargar dos veces más de volumen de cosecha, o equivalente de volumen de cosecha, sobre el rotor usado para la etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa manteniendo a la vez el mismo intervalo aceptable de rendimiento de HA. La capacidad de carga de una centrifuga afecta directamente al número de centrifugas requerido para funcionar a gran escala. Cuanto mayor es la capacidad de carga, menor será el número de centrifugas necesarias.

Ejemplo IV: Procedimiento SRD utilizado para medir el contenido de HA

Se revistieron placas de vidrio (12,4 - 10 cm) con un gel de agarosa que contenía una concentración de suero de HA contra la gripe que está recomendado por el NIBSC. Después que el gel haya gelificado, se punzaron pocillos de 72 muestras (3 mm de diámetro) en la agarosa. 10 µl de diluciones adecuadas de la referencia y la muestra se introdujeron en los pocillos. Se incubaron las placas durante 24 horas a temperatura ambiente (20 to 25 °C) en una cámara de humedad. Después, las placas se humedecieron durante la noche con solución de NaCl y se lavaron brevemente en agua destilada. A continuación el gel se presionó y se secó. Cuando estuvo completamente seco, las placas se tñieron con una solución de azul de Coomassie brillante durante 10 minutos y se destñieron dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que las zonas teñidas claramente definidas llegaron a ser visibles. Tras secar las placas, se midió el diámetro de las zonas teñidas que rodeaban el antígeno en dos direcciones en ángulos rectos. Como alternativa, se puede usar equipo para medir la superficie. Se construyeron las curvas de respuesta a la dosis de diluciones de antígenos contra la superficie y se calcularon los resultados de acuerdo con los procedimientos de ensayo e relación de pendiente convencionales (Finney, D.J. (1952). *Statistical Methods in Biological Assay*. Londres: Griffin, Citado en: Wood, JM, y col (1977). *J. Biol. Standard*. 5, 237-247).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un virus en un cultivo de células que comprende al menos las etapas de:
 - a) proporcionar una población de células en un medio de cultivo celular, en el que es aplicado a las células una entrada de potencia volumétrica de 30 W/m^3 o 120 W/m^3 , hasta que la densidad celular de las células alcanza al menos 8×10^6 células/ml, al menos 9×10^6 células/ml, al menos 10×10^6 células/ml, al menos 11×10^6 células/ml, al menos 12×10^6 células/ml, o al menos 13×10^6 células/ml,
 - b) infectar la población de células:
 - i. inocular a la población con el virus durante 1h30 min, en el que la entrada de potencia volumétrica es reducida a 7 W/m^3 y
 - ii. incubar la población inoculada con el fin de permitir que el virus se replique y propague, en el que la entrada de potencia volumétrica es aumentada de nuevo a 30 W/m^3 o 120 W/m^3 ,
 - c) recoger el virus producido, proporcionando de esta forma una cosecha de virus, y
 - d) purificar el virus, en el que la cosecha de virus es clarificada mediante microfiltración y es purificada adicionalmente mediante al menos una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al final de la etapa b) las células inoculadas son diluidas por un factor comprendido de 2 a 5, dejándose para incubación adicional.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al final de la etapa b) i. las células inoculadas son diluidas para obtener una densidad celular comprendida de 3×10^6 células/ml a 5×10^6 células/ml, dejándose reposar para incubación adicional.
4. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que es añadida tripsina a las células durante la etapa b).
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que es añadida tripsina al mismo tiempo que la inoculación con el virus.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que es añadida tripsina adicionalmente en el día D1 y/o el día D4 después de la inoculación.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que es añadida tripsina adicionalmente cada día después de la inoculación con el virus hasta que se recoge el virus producido en la etapa c).
8. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en el que el virus producido de la etapa c) es recogido entre 2 y 10 días después de la inoculación con el virus.
9. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de purificación del virus d) comprende una etapa de inactivación del virus.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la etapa de inactivación del virus es realizada con beta-propiolactona.
11. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa de purificación del virus d) comprende una etapa de división.
12. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, en el que el virus es el virus de la gripe.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el virus de la gripe es de un subtipo H2, H5, H6, H7 o H9.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el virus de la gripe es de un subtipo H1, H3 o B.
15. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, en las que las células son células de mamífero o aviares.
16. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15, en el que las células son cultivadas en suspensión.
17. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 16, en el que las células son embriocitoblastos aviares.
18. Un procedimiento de preparación de una vacuna que comprende las etapas de llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 17 y premezclar el virus purificado en la etapa d) con un vehículo farmacéuticamente aceptable.