

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 305 514**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2003 PCT/EP2003/009704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2004 WO04022729**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2003 E 03766057 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **19.12.2018 EP 1434858**

54 Título: **Método para la amplificación de un poxvirus en condiciones exentas de suero**

30 Prioridad:

05.09.2002 DK 200201302

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

14.06.2019

73 Titular/es:

**BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)
Hejreskovvej 10A
3490 Kvistgaard, DK**

72 Inventor/es:

**RÄTHE, INGMAR;
FELDER, EVA y
HELLER, KARL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 305 514 T5

DESCRIPCIÓN

Método para la amplificación de un poxvirus en condiciones exentas de suero

La presente invención se refiere a el método para la amplificación de un poxvirus como se caracteriza en las reivindicaciones.

5 **Antecedentes de la invención**

La mayoría de las vacunas virales tales como virus atenuados o recombinantes se fabrican a partir de sistemas de cultivo de células. Las células utilizadas para la producción de virus/vacunas pueden ser líneas de células, es decir células que se cultivan continuamente *in vivo*, sea como cultivo de suspensión de células simples en biorreactores o como una monocapa sobre una superficie de soporte de células de matraces de cultivo de tejidos o frascos rotativos. Algunos ejemplos de líneas de células utilizadas para la producción de virus son: la línea de células de pulmón fetal humano MRC-5 utilizada para la fabricación de poliovirus y la línea de células de pulmón fetal humano WI-38 utilizada para la fabricación de virus del sarampión, virus de las paperas y virus de la rubéola (NMR II) (Merk Sharp & Dohme).

No sólo líneas virus de la progenie de células sino también células animales primarias se utilizan para la fabricación de vacunas. Un ejemplo de células primarias que se utilizan para producción de virus son fibroblastos de embrión de pollo (células CEF). Estas células se utilizan para la producción de virus del sarampión y de la encefalitis japonesa (Pasteur Merieux), virus de las paperas (fabricado por Provacine), virus de la rabia (fabricado por Chiron Berhing GmbH & Co.), virus de la fiebre amarilla (fabricado por Aprilvax), virus de la gripe (fabricado por Wyeth Labs y SmithKline & Beecham) y virus Vaccinia modificado Ankara (MVA).

Las células CEF se utilizan a menudo dado que muchas vacunas de virus se fabrican por atenuación del virus virulento causante de la enfermedad por sometimiento a pasos seriados en células CEF. El virus atenuado no causa ya la enfermedad pero es capaz sin embargo de estimular una inmunidad protectora potente contra la forma virulenta del virus. Un ejemplo de este tipo de virus es MVA. Este virus se ve severamente restringido en su replicación en humanos y en la mayoría de los animales. MVA está siendo desarrollado como un vector de vacuna debido a que el mismo puede utilizarse para expresar antígenos derivados de una diversidad de agentes que causan enfermedades en humanos. Los virus atenuados, tales como MVA no se propagan preferiblemente en células humanas dado que existe la preocupación de que los virus pudieran de nuevo hacerse competentes en replicación en células de origen humano. Sin embargo, los virus que han recuperado la capacidad de replicarse en células humanas podían presentar un alto riesgo si se administraran a humanos, en particular si los individuos son inmunodeficientes. Por esta razón, algunos virus atenuados, tales como MVA, se fabrican estrictamente a partir de células CEF, si están destinados a uso humano.

Además, se utilizan células CEF para aquellos virus que crecen únicamente sobre dichas células. Ejemplos de tales virus son en particular virus de aves tales como virus avipox, en particular el poxvirus de los canarios, ALVAC, el poxvirus Fowl y NYVAC.

Las líneas de células y células primarias desarrolladas en condiciones de cultivo *in vitro* requieren un medio especial de crecimiento y mantenimiento que pueda soportar (I) la replicación celular en la fase logarítmica y (II) el mantenimiento celular una vez que las células ya no se están dividiendo, es decir, cuando las células se encuentran en la fase estacionaria. Los medios de cultivo de células utilizados comúnmente comprenden una solución salina rica que contiene vitaminas, aminoácidos, elementos traza esenciales y azúcares. Se añaden usualmente hormonas de crecimiento, coenzimas y proteínas biológicamente activas requeridas para soportar el crecimiento y mantenimiento celular, como suplemento al medio en la forma de un producto de suero derivado de sangre animal. Ejemplos de productos de suero derivados de sangre animal son suero de ternero fetal, suero de pollo, suero de caballo y suero de porcino. Estos sueros se derivan de sangre fraccionada, de la cual se han eliminado los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Las células primarias, tales como células CEF son aún más dependientes de fuentes de suero animales que otras líneas de células. Por ello, las células primarias se cultivan usualmente en medios de cultivo de células que comprenden 5 a 10% de suero, en la mayoría de los casos suero de ternero fetal (FCS).

Los sueros animales no sólo comprenden los factores que se requieren para el crecimiento de las células, sino también factores que se requieren para células que crecen naturalmente como células adherentes que se fijan a la superficie de soporte celular del recipiente de cultivo. Así pues, es crítico para las células adherentes que se añada suero suficiente al medio a fin de permitir que las mismas crezcan y formen una monocapa.

Lamentablemente, el suero de bovino/ternero fetal así como sueros de otros animales pueden contener agentes patógenos adventicios tales como virus. Existe un riesgo potencial de que estos agentes patógenos se transmitan al animal/humano a tratar o a vacunar con la vacuna o cualquier otro producto farmacéutico producido en cultivo de células. Esto es particularmente importante si se administran productos de cultivo de células a humanos inmunodeficientes. Uno de los muchos problemas potenciales importantes asociados con el suplemento de suero de bovino utilizado comúnmente es la posibilidad de transmitir el agente causante de la encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) a los animales/humanos que entran en contacto con los productos fabricados a partir de dicho cultivo de células.

Teniendo en cuenta el posible riesgo asociado con el uso de sueros animales en cultivo de células, ha quedado claro que son sumamente deseables procesos de fabricación exentos del uso de productos animales.

A este fin, medios específicos que no tienen que suplementarse con sueros animales han sido desarrollados para líneas de células que crecen continuamente y para la producción de virus en líneas de células que se encuentran en crecimiento continuo, respectivamente. Un ejemplo de un medio exento de suero de este tipo que puede utilizarse para cultivar líneas de células es VP-SFM, fabricado por Gibco BRL/Life Technologies. De acuerdo con la información de los fabricantes, VP-SFM está diseñado específicamente para el crecimiento de VERO, COS-7, MDBK, Hep2, BHK-21 y otras líneas de células importantes (Price, P. y Evege, E. Focus 1997, 19:67-69) y para la producción de virus en dichas líneas de células. No se dispone de ninguna información concerniente al cultivo de células primarias en dicho medio.

El documento US 5503582 describe el cultivo de células CEF en un medio que comprende 4% de suero de ternero seguido por la infección de las células con poxvirus Fowl en medio exento de suero. Spataro, A.C. et al., J. Cell. Sci. 1976; 21. 407-413 describe que pueden mantenerse células CEF en medio exento de suero durante 24 horas una vez que se ha formado una monocapa. Así pues, de acuerdo con ambas publicaciones los medios que se utilizan para el cultivo de las células después de la siembra comprenden suero. Únicamente para el mantenimiento de las células que están ya fijadas a la superficie y que han alcanzado la fase estacionaria se utilizó medio exento de suero. Si la siembra se realiza con medio convencional, tal como medio 199 o RPMI-1640 sin suero no se forma monocapa alguna y las células forman agregados no viables en el medio.

El documento WO 98/15614 hace referencia a un medio específico exento de suero para el cultivo in vitro de células animales. Las células que pueden cultivarse en medio que se describe en WO 98/15614 son las de origen animal, con inclusión de células obtenidas de mamíferos, aves, insectos o peces. Las células de mamífero pueden ser células primarias de origen humano. No se hace referencia alguna a células primarias de ave.

El documento US 5405772 describe un medio exento de suero para la proliferación y desarrollo de células. Las células son preferiblemente células hematopoyéticas y células estromáticas de médula ósea. No se mencionan células primarias de ave.

WO 98/04680 describe un medio exento de suero para el crecimiento de células de mamífero dependientes de anclaje, tales como las líneas de células BHK, Vero o MRC-5. WO 98/04680 no se refiere a células primarias ni a células de ave.

Pietrzkowski et al. Folia Histochemica et Cytobiologica 1988, 26:123-132 describe que el dextrano T-500 mejora la supervivencia y propagación de células de embrión de pollo en medio exento de suero. Sin embargo, Pietrzkowski et al. no hace referencia a la amplificación de virus.

US 4072565 describe el crecimiento de células en cultivo de tejidos y la producción de vacunas de virus en cultivo de tejidos en ausencia de suero. Sin embargo, US 4072565 guarda silencio en cuanto a la amplificación de poxvirus.

Objeto de la Invención

Es el objeto de la presente divulgación proporcionar un método que permite el cultivo de células primarias de ave en medio exento de suero, en donde el método permite (I) el crecimiento de las células durante la fase logarítmica y (II) el mantenimiento de las células en la fase estacionaria. Además, si las células son células adherentes, el medio puede permitir preferiblemente (III) la fijación de las células adherentes a la superficie del recipiente de cultivo de las células. Así pues, es el objeto de la presente invención proporcionar un método para la amplificación de poxvirus utilizando células primarias de ave en condiciones exentas de suero como se caracteriza en las reivindicaciones.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona el método de acuerdo con las reivindicaciones.

Células primarias de ave que crecen naturalmente como células adherentes se fijan a la superficie del recipiente del cultivo de células después de la siembra y crecen en una fase logarítmica hasta que se forma una monocapa y las células en reposo pueden mantenerse en el medio utilizado durante la fijación y el crecimiento logarítmico de las células.

El método descrito no está restringido a células que forman monocapas. De acuerdo con una realización alternativa, el método puede utilizarse para todos los restantes tipos de células primarias de ave, tales como células que crecen naturalmente en cultivo de suspensión (v.g. linfocitos u otros tipos de células de la sangre) o células que se desarrollarían naturalmente como células adherentes pero que se han adaptado a crecimiento en cultivo de suspensión.

Como se demuestra más adelante, las células primarias de ave pueden utilizarse también para la amplificación exenta de suero de poxvirus que podrían ser útiles como vacunas.

Resultó inesperado que células primarias de ave que crecen naturalmente como células adherentes (I) pueden fijarse eficazmente a la superficie del recipiente de cultivo de células sin formar cantidades inaceptables de agregados y

(II) pueden desarrollarse en la fase logarítmica en ausencia de suero, dado que se creía generalmente que las células primarias de ave son dependientes de una multitud de factores y componentes diferentes comprendidos en el suero. Además, se creía que las células adherentes forman agregados no viables que no se fijan a la superficie del recipiente de cultivo de células, cuando se cultivan en medio exento de suero. Así pues, resultó inesperado que sea suficiente añadir a medio exento de suero EGF y opcionalmente factores de fijación a fin de conseguir la fijación y el crecimiento de células de ave primarias adherentes. Además, fue también inesperado que las células primarias de ave cultivadas en cultivo de suspensión pueden desarrollarse con el medio utilizado en el método de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, fue sorprendente que las células primarias de ave, tales como Fibroblastos de Embrión de Pollo (CEF) pueden cultivarse para fijarse a la superficie de una recipiente de cultivo de células sin formar cantidades inaceptables de agregados en un medio exento de suero que comprende EGF y opcionalmente factores de fijación, dado que se sabía que las células de ave crecen extremadamente mal en medio exento de suero que no comprende factores de crecimiento o factores de fijación, es decir, fue inesperado que las deficientes propiedades de crecimiento de las células primarias de ave podían mejorarse significativamente por adición de EGF y opcionalmente factores de fijación a un medio exento de suero.

El término "células primarias" como se utiliza en la presente descripción, es bien conocido para las personas expertas en la técnica. Sin restringirse a la definición siguiente, el término "células primarias" se refiere generalmente a células que han sido aisladas recientemente de un tejido, órgano u organismo animal o humano, en donde las células no son capaces de replicarse continua e indefinidamente y dividirse. Usualmente, las células primarias se dividen en cultivo menos de 100 veces, a menudo menos de 50 veces, y con frecuencia menos de 25 veces. Así pues, las células primarias no se han sometido a un suceso de inmortalización. Ejemplo de células primarias son los linfocitos de cordón umbilical y fibroblastos humanos o animales. Ejemplos preferidos que ilustran la invención son fibroblastos de ave, muy preferiblemente Fibroblastos de Embrión de Pollo (CEF).

Las personas expertas en la técnica son bien conocedoras de métodos indicativos del modo en que pueden aislarse células primarias. Generalmente, los cultivos de células primarias se derivan directamente de tejidos, órganos o embriones. Los tejidos, órganos o embriones se someten a tratamiento con proteasas para obtener células simples. Las células primarias de ave se cultivan luego de acuerdo con el método conforme a la presente invención en condiciones de cultivo *in vitro*.

Más específicamente, las células CEF se obtienen a partir de embriones de pollo digeridos con proteasas. Las células CEF se desarrollan óptimamente como células adherentes fijadas a una superficie sólida de soporte de células. Las células inician la replicación y establecen una monocapa. Si las células CEF (después de la digestión del embrión) se cultivan *in vitro* con un medio de cultivo estándar sin suero animal, las células se fijarán ocasionalmente a la superficie sólida de soporte de las células, pero no se replicarán para formar una monocapa de células confluyente y con el tiempo se desprenderán lentamente de la superficie sólida de soporte del cultivo. En contraste, si las células CEF se cultivan de acuerdo con el método de la presente invención, las células se fijan al soporte sólido, crecen en la fase logarítmica hasta que se forma una monocapa y pueden mantenerse en la fase estacionaria durante varios días.

El término "cultivo de células" en un medio exento de suero en el contexto de células primarias adherentes hace referencia a la siembra de las células en el recipiente de cultivo en un medio exento de suero, al crecimiento de las células en un medio exento de suero en la fase logarítmica hasta que se forma una monocapa y/o al mantenimiento de las células en un medio exento de suero tan pronto como se forma la monocapa. El término "cultivo de células" en un medio exento de suero hace referencia a un método en el cual la totalidad de los pasos arriba mencionados se realizan con medio exento de suero, de tal manera que no está presente ningún producto de suero animal durante el proceso completo de cultivo de las células. Así pues, en un significado más general, el término "cultivo de células en un medio exento de suero" hace referencia al hecho de que todos los medios que conducen a la formación de una monocapa son medios exentos de suero. El medio utilizado en la totalidad de los pasos anteriores comprende EGF y opcionalmente factores de fijación.

El término "cultivo de células" en un medio exento de suero en el contexto de las células que crecen en cultivo de suspensión hace referencia a la siembra de las células en el recipiente de cultivo en un medio exento de suero, el crecimiento de las células en un medio exento de suero en la fase logarítmica y/o el mantenimiento de las células en medio exento de suero tan pronto como se alcanza la densidad de saturación a la cual ya no se produce replicación alguna. El término "cultivo de células" en un medio exento de suero se refiere a un método en el cual la totalidad de los pasos arriba mencionados se realizan con medio exento de suero, de tal manera que no está presente producto de suero animal alguno durante el cultivo completo de las células. El medio utilizado en la totalidad de los pasos anteriores comprende EGF.

Como se explica más adelante con mayor detalle, podía ser posible también cultivar células que crecen normalmente como células fijadas asimismo como células de cultivo en suspensión si se seleccionan condiciones de incubación apropiadas (v.g. por aplicación de incubación "por olas"). El método de acuerdo con la presente invención se aplica también para este tipo de incubación.

El término medio "exento de suero" hace referencia a cualquier medio de cultivo de células que no contiene sueros de origen animal o humano. Medios de cultivo de células adecuados son conocidos por las personas expertas en la

técnica. Estos medios comprenden sales, vitaminas, tampones, fuentes de energía, aminoácidos y otras sustancias. Un ejemplo de un medio adecuado para el cultivo exento de suero de células CEF es el medio 199 (Morgan, Morton y Parker, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 73, 1; obtenible, inter alia, de Life Technologies).

5 Los medios utilizados de acuerdo con el método de la presente invención, en particular los medios utilizados para células adherentes tales como células CEF, contienen EGF y, opcionalmente factores de fijación. Un ejemplo de un factor de fijación es fibronectina.

10 Para células que crecerían naturalmente como células adherentes, y que, sin embargo, se cultivan no obstante en cultivo de suspensión (lo cual es posible, v.g. para las células CEF), que comprende EGF. Ejemplos de las EGF son factor de crecimiento recombinante epidérmico (EGF) de bovino, ratón, pollo o humano. Es muy preferido el EGF recombinante humano (rh-EGF) (Chemicon Inc., número de catálogo GF001).

Para células que crecen naturalmente en cultivo de suspensión, el medio comprende EGF. Los factores de crecimiento adicionales para este tipo de células son factores específicos para células no adherentes. Ejemplos de tales factores de crecimiento son interleuquinas, GM-CSF, G-CSF y otros. Las personas expertas en la técnica pueden determinar fácilmente, por experimentación rutinaria, qué tipo de factor es adecuado para cada tipo de células.

15 EGF, en particular rh-EGF, se añade preferiblemente al medio en una concentración de 1 a 50 ng/ml, más preferiblemente 5 a 20 ng/ml. Sin embargo, las personas expertas en la técnica son sabedoras del hecho de que tipos diferentes de células pueden requerir una concentración algo diferente de EGF en el suero para resultados óptimos.

20 Si el factor de fijación añadido al medio exento de suero es fibronectina (v.g. Chemicon Int.; fibronectina de plasma humano; número de catálogo FC010), el mismo se añade preferiblemente al medio en una concentración de 1 a 50, más preferiblemente 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de superficie del recipiente de cultivo de células. No obstante, las personas expertas en la técnica son sabedoras del hecho de que diferentes tipos de células pueden requerir una concentración un tanto diferente de fibronectina en el suero para resultados óptimos.

25 De acuerdo con la presente invención, es suficiente añadir solamente EGF y opcionalmente factores de fijación al medio, en particular si las células son células adherentes. No obstante, es también posible añadir dos o más factores seleccionados de factores de crecimiento y factores de fijación al medio. El medio puede comprender preferiblemente EGF y fibronectina, preferiblemente en los intervalos de concentración arriba definidos, en particular si las células primarias son células adherentes tales como células CEF.

30 El medio puede comprender además uno o más aditivos seleccionados de extracto microbiano, extracto de plantas y extracto de un animal no mamífero. El extracto microbiano es preferiblemente extracto de levadura o ultrafiltrado "yeastolate". El extracto de plantas es preferiblemente extracto de arroz o extracto de soja. El extracto de animal no mamífero es preferiblemente extracto de peces.

35 Puede añadirse asparagina al medio exento de suero disponible comercialmente al que se han añadido EGF y opcionalmente factores de fijación. Más preferiblemente, se añade asparagina al medio que se utiliza durante la infección con virus (véase más adelante). Los medios comerciales exentos de suero comprenden usualmente asparagina en un intervalo de concentración de 0,3 a 1,0 mM. Cantidades preferidas de asparagina para suplementar el medio están comprendidas en el intervalo de 0,5 a 1,5 mM. Es muy preferido un suplemento de asparagina 1 mM. La concentración total de asparagina en el medio es preferiblemente menor que 2 mM, y más preferiblemente está comprendida en un intervalo de 0,8 a 1,8 mM. La concentración más preferida de asparagina en el medio es 1,3 mM.

40 Además, puede añadirse preferiblemente glutamina al medio. Más preferiblemente, se añade glutamina al medio que se utiliza durante la infección con virus (véase más adelante). Cantidades preferidas de glutamina para suplementar el medio están comprendidas en un intervalo de 1 a 5 mM, más preferiblemente en un intervalo de 2 a 4 mM. Los intervalos indicados corresponden también a las concentraciones totales preferidas en el medio, dado que la mayoría de los medios disponibles comercialmente no contienen glutamina.

45 La invención se refiere a un método para la amplificación de un poxvirus que comprende los pasos siguientes: en el primer paso, se cultivan células primarias de ave de acuerdo con el método arriba descrito, es decir se cultivan células primarias de ave en un medio exento de suero que comprende EGF y opcionalmente factores de fijación, dependiendo del tipo de células. Todas las condiciones, definiciones, realizaciones preferidas y también el orden de realizaciones preferidas a muy preferidas dadas anteriormente para la descripción del método para el cultivo de células primarias de ave, se aplican para la definición del primer paso del método para la amplificación de poxvirus de acuerdo con la presente invención. En un segundo paso, las células primarias de ave se infectan con el poxvirus en medio exento de suero con EGF. En el tercer paso, las células infectadas se incuban en medio exento de suero con EGF hasta que se produce el virus progenie.

55 El término "amplificación de un poxvirus" se utiliza para dejar claro que el método de acuerdo con la presente invención se utiliza preferiblemente para aumentar la cantidad de virus debida a una replicación viral productiva del virus en las células infectadas. Dicho de otro modo, la relación de virus de salida a virus de entrada debe ser preferiblemente superior a 1. Así pues, de acuerdo con la presente invención, dichas células primarias de ave se seleccionan para un poxvirus específico, en el cual el virus es capaz de replicarse productivamente. El término "replicación re-

productiva" hace referencia al hecho de que el virus específico se replica en la célula primaria de ave específica en tal grado que se produce virus infeccioso progenie, en donde la relación de virus de salida a virus de entrada es superior a 1.

5 Las personas expertas en la técnica saben qué virus pueden replicarse productivamente en cada tipo de células primarias. Generalmente, las células primarias pueden ser fibroblastos de prepucio humano si el virus a amplificar es el citomegalovirus humano; las células primarias pueden ser células CEF si el virus a amplificar es el virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rabia, virus de la encefalitis japonesa, virus de la fiebre amarilla, virus de la gripe o, de acuerdo con la invención, un poxvirus tal como el virus Vaccinia, en particular el virus Vaccinia modificado Ankara (MVA).

10 La infección de células primarias de ave de acuerdo con el segundo paso de la presente invención es conocida por las personas expertas en la técnica. A modo de ejemplo, el virus puede añadirse simplemente al medio. Alternativamente, el medio puede eliminarse y el virus puede añadirse a medio nuevo, el cual se añade a su vez a las células. Para obtener una infección eficiente, la cantidad de la suspensión virus/medio debería ser lo más baja posible a fin de obtener una alta concentración de virus. Después de la fijación del virus, puede añadirse medio adicional.

15 En el tercer paso de la invención, las células se cultivan en medio exento de suero con EGF hasta que se produce el virus progenie.

El medio exento de suero que se utiliza en el segundo y el tercer pasos del método para la amplificación de un poxvirus de acuerdo con las reivindicaciones, es el mismo medio que se ha utilizado ya anteriormente, es decir un medio exento de suero que comprende EGF y opcionalmente factores de fijación, dependiendo del tipo de células.

20 Durante todas las etapas, el medio puede complementarse con asparagina y/o glutamina como se ha expuesto anteriormente, siendo la concentración total de asparagina en el medio preferiblemente como se ha definido arriba.

El virus progenie puede concentrarse y purificarse de acuerdo con métodos conocidos por las personas expertas en la técnica.

25 Resultó inesperado que pueden amplificarse poxvirus en células cultivadas en condiciones exentas de suero, dado que las células crecen muy deficientemente con el medio exento de suero conocido. Así pues, era de esperar que el estrés adicional asociado con una infección de poxvirus podría matar las células ya estresadas antes que se alcanzara una amplificación significativa del poxvirus.

El poxvirus es preferiblemente un ortopoxvirus. Ejemplos de ortopoxvirus son poxvirus de aves y virus Vaccinia.

30 El término "poxvirus de aves" hace referencia a cualquier poxvirus de ave, tal como el poxvirus Fowl, poxvirus de los canarios, un copoxvirus, poxvirus Mynah, poxvirus de paloma, poxvirus de la psitacosis, poxvirus de codorniz, poxvirus de pavo real, poxvirus de pingüino, poxvirus de gorrión, poxvirus de estornino y poxvirus de pavo común. Poxvirus de ave preferidos son el poxvirus de los canarios y el poxvirus Fowl.

35 Un ejemplo de un poxvirus de canario es la cepa Rentschler. Una cepa de poxvirus de canario purificada en placas, denominada ALVAC, documento US 5766598) fue depositada de acuerdo con los términos del tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), número de acceso VR-2547. Otra cepa de poxvirus de canario es la cepa de la vacuna de poxvirus de canario comercial designada LF2 CEP 525 24 10 75, disponible del Institute Merieux, Inc.

40 Ejemplos de un poxvirus Fowl son las cepas FP-1, FP-5 y TROVAC (US 5768598). FP-1 es una cepa Duvette modificada para ser utilizada como vacuna en pollos de un solo día. La cepa es una cepa de vacuna del poxvirus Fowl comercial designada 0 DCEP 25/CEP67/2309 octubre 1980, y está disponible del Institute Merieux, Inc. FP-5 es una cepa de vacuna de poxvirus Fowl comercial procedente de embrión de pollo, disponible de American Scientific Laboratories (Division of Schering Corp.) Madison, Wisconsin, licencia veterinaria de los Estados Unidos No. 165, No. de serie 30.321.

45 Ejemplos de cepas de virus Vaccinia son las cepas Temple of Heaven, Copenhague, París, Budapest, Dairén, Gam, MRIVP, Per, Tashkent, TBK, Tom, Berna, Patwadangar, BIEM, B-15, Lister, EM-63, New York City Board of Health, Elstree, Ikeda y WR. La invención se lleva a cabo preferiblemente con el virus Vaccinia modificado Ankara (MVA) (Sutter, G. et al. Vaccine 12:1032-40). Una cepa típica de MVA es MVA 575, que ha sido depositada en la European Collection of Animal Cell Cultures bajo el número de depósito ECACC V00120707. Es muy preferida MVA-BN o un derivado de la misma, que ha sido descrito en la solicitud PCT PCT/EP01/13628 presentada en la Oficina Europea de Patentes en fecha 22 de noviembre de 2001, titulada "Modified Vaccinia Ankara Virus Variant". MVA-BN ha sido depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales con el número de depósito ECACC V00083008. Las características de MVA-BN, la descripción de los ensayos biológicos que permiten evaluar si un MVA es MVA-BN o un derivado del mismo y métodos que permiten obtener MVA-BN o un derivado del mismo se describen en la Solicitud PCT a que se ha hecho referencia arriba.

50

El virus a amplificar de acuerdo con el método de la presente invención puede ser un virus de tipo salvaje, un virus atenuado o un virus recombinante.

El término "virus recombinante" hace referencia a cualquier virus que tenga insertado en el genoma viral un gen heterólogo que no forma parte naturalmente del genoma viral. Un gen heterólogo puede ser un gen terapéutico; un gen que codifica un péptido que comprende al menos un epítipo para inducir una respuesta inmunológica, una casete de expresión antisentido o un gen de ribozima. Métodos para construir virus recombinantes son conocidos por las personas expertas en la técnica. El vector de poxvirus más preferido es MVA, en particular MVA 575 y MVA-BN (véase arriba).

Un "virus atenuado" es un virus originario de un virus patógeno pero que, después de la infección del organismo hospedador, conduce a una mortalidad y/o morbilidad menores comparado con el virus parental no atenuado. Ejemplos de poxvirus atenuados son conocidos por las personas expertas en la técnica. Un ejemplo de un virus Vaccinia atenuado es la cepa MVA, en particular la cepa que ha sido depositada en la ECACC con el número de depósito V00083008 (véase arriba).

Como se ha indicado anteriormente, para poxvirus las células primarias de ave pueden ser preferiblemente células CEF o fibroblastos primarios de embrión de pato. De nuevo, las personas expertas en la técnica son sabedoras de qué células primarias de ave son adecuadas para la amplificación de cualesquiera poxvirus. Las células CEF son particularmente preferidas para la amplificación de MVA. Para amplificación de MVA en células CEF, una realización preferida consiste en seleccionar uno o dos de los factores seleccionados de EGF y fibronectina.

Si el método de acuerdo con la presente invención se utiliza para la amplificación de MVA en células CEF, se prefiere que el pH inicial del medio esté comprendido en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5. Es particularmente preferido un pH inicial de 7,0.

De acuerdo con el método de la presente invención, los poxvirus, en particular los virus Vaccinia, muy preferiblemente cepas MVA tales como MVA-BN, se obtienen en condiciones exentas de suero.

Debido al método de amplificación del virus, las composiciones que comprenden el poxvirus están exentas de cualesquiera productos y/o agentes infecciosos comprendidos en sueros animales. En contraste, las composiciones que comprenden virus producidos de acuerdo con los métodos convencionales comprenden compuestos residuales derivados de suero animal. Éste es especialmente el caso para las composiciones que comprenden poxvirus tales como cepas de virus Vaccinia, en particular cepas de MVA tales como MVA-BN.

Si el poxvirus es un virus de tipo salvaje o un virus atenuado, el poxvirus puede utilizarse para la vacunación contra el virus como tal. Para este propósito son particularmente preferidos los virus atenuados. Si el virus es un virus recombinante que expresa proteínas expresadas por genes heterólogos al genoma viral, es posible vacunar contra el virus como tal y/o contra la proteína heteróloga expresada. Si el virus recombinante expresa un gen terapéutico tal como un RNA antisentido o una ribozima, el virus puede utilizarse como medicamento.

Ejemplos

Si no se indica otra cosa en los ejemplos que siguen, el medio exento de suero es medio 199 (Life Technologies). El EGF añadido es usualmente EGF humano recombinante obtenido de Chemicon. La fibronectina (FN) se obtuvo de Chemicon.

Ejemplo 1: Preparación de Células Fibroblasto de Embrión de Pollo (CEF)

Se mantuvieron huevos fertilizados exentos de patógenos específicos (SPF) no más de 12 días a 4°C. Los huevos se pusieron en una incubadora y se incubaron durante 10-12 días a 37,8°C ± 8°C. Se preparó una cápsula Petri para un máximo de 11 huevos con 10-20 ml de PBS. Los huevos se pusieron en una caja de huevos exclusiva y se trataron extensamente con Bacillol para esterilizar el exterior de la cáscara del huevo. Después del secado, se practicó un orificio en los huevos y se eliminó cuidadosamente la cáscara. Se puso aparte la membrana corioalantoica. Los embriones se levantaron por las patas y se cortaron sus cabezas. Los embriones se transfirieron luego a las cápsulas de Petri preparadas. Después de separar las patas, los troncos se lavaron de nuevo con PBS. Se pusieron un máximo de 11 troncos en una jeringuilla de plástico de 20 ml y se exprimieron en un matraz Erlenmeyer. Se añadieron 5 ml de solución Tripsina/EDTA precalentada (37°C) por tronco y la solución se agitó durante 15 minutos con medio exento de suero a la temperatura ambiente utilizando un agitador magnético. Las células tripsinizadas se vertieron a través de una capa de tela metálica en un vaso de precipitados. Se transfirieron todas las células a un solo tubo de centrifuga de 225 ml y se centrifugaron a 20°C, 470 x g durante 7 minutos en una centrifuga de sobremesa. Después de desechar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 1 ml de medio de crecimiento nuevo precalentado (37°C) exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF por tronco mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo concienzudamente. Se añadió medio de crecimiento nuevo precalentado (37°C) exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF a un volumen total de 150 ml. Se repitió el paso de centrifugación. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió como se ha descrito arriba. Se añadió medio de crecimiento nuevo precalentado (37°C) exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF hasta un volumen total de 100 ml. Se sometieron a recuento las células como se describe en la sección siguiente. Las cantidades requeridas de células se sembraron

en frascos rotativos con medio de crecimiento exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF y se incubaron a 37°C. Las células estaban listas para la infección de virus el día 4 después de la siembra.

Ejemplo 2: Recuento de la Densidad de Células

5 Se tomó una muestra de la suspensión de células (véase la sección preparación de CEF) y se mezcló con un volumen de azul Tripán, dando como resultado un recuento final de células de 20 a 100 células por 16 cuadrados pequeños de un hemocitómetro suministrado por Fuchs-Rosenthal bajo el nombre de Hemocitómetro Fast Read 102 (dilución 1:2-1:10). La muestra se tomó inmediatamente después de la resuspensión de las células a fin de impedir la reagregación/sedimentación de las células. Después de unos cuantos minutos de tiempo de incubación con azul Tripán a fin de obtener el tinte adecuadamente en las células muertas, se añadieron 10 µl de la suspensión de células al hemocitómetro. Únicamente se contaron las células vivas blancas bajo un microscopio óptico utilizando un objetivo 10x. En total, se contaron 3 cuadrados grandes representativos constituidos por 3 x 16 cuadrados pequeños. De cada cuadrado grande se incluyeron en el recuento únicamente 2 bordes en forma de L. Se tomó el promedio de células contadas y se calculó la concentración final de células utilizando la fórmula siguiente: Número medio de células x dilución x 10⁴ = células/ml. Finalmente, se diluyó la suspensión de células a la concentración de trabajo deseada.

Ejemplo 3: Efecto de la dilución de un factor seleccionado de factores de crecimiento y fibronectina a un medio de cultivo exento de suero sobre la formación de una monocapa CEF

20 En experimentos preliminares, los inventores han demostrado que las células CEF no se fijan a la superficie de recipiente s de cultivo de células si se utiliza medio 199 que no comprende FCS. Además, no se forma monocapa alguna. Se observa la formación de monocapas normales si se utiliza medio 199 que contiene 7% de FCS. Se investigó si se puede lograr la fijación y el crecimiento de las células CEF en medio exento de suero 199 si se añaden aditivos al medio.

Los aditivos sometidos al test comprenden Factor de Crecimiento Epidérmico Recombinante (r-hEGF) y fibronectina (FN).

25 Para los experimentos, se cultivaron células CEF en medio 199 con los diferentes aditivos solos o en combinación. Como control negativo sirvieron células que crecían en medio 199 sin aditivo alguno. Como control positivo sirvieron células cultivadas en medio 199 que comprendía 7% de FCS. Todos los experimentos se condujeron en placas de cultivo de células de 6 pocillos con 3 ml de medio. Los aditivos se trataron de acuerdo con las hojas de datos del suministrador antes de ser utilizados para el cultivo de células. Se dejó que se adsorbiera la fibronectina a la superficie de las placas de cultivo de células durante 25 minutos antes de su utilización. Se utilizó fibronectina en una concentración de 3 µg/cm² y se utilizó EGF en una concentración de 10 ng/ml. Antes de añadir cualesquiera células, las placas de cultivo de células se pusieron en contacto con el medio que contenía fibronectina durante 25 minutos.

30 Cada medio de cultivo más los aditivos a someter al test se cultivó por duplicado. Las placas de cultivo de células de 6 pocillos se incubaron durante 4 días a 37°C. Desde el día 1 al 4, se evaluó la fijación y el crecimiento de las células utilizando un microscopio.

Para el control positivo, se ha observado una fijación y crecimiento normales de las células CEF. Para el medio 199 sin aditivos no pudo observarse prácticamente fijación alguna de las células CEF.

40 Se observó una mejora crucial en la formación de una monocapa por el uso de EGF añadido a medio 199 comparado con medio 199 sin aditivos. Se encontró que las células se fijaban y formaban la morfología típica de los fibroblastos. Adicionalmente, pudo observarse un crecimiento continuo a lo largo de todo el periodo de 4 días.

Se logró también una mejora de fijación de las células por adición de fibronectina al medio de cultivo. La adición de ambos, EGF y fibronectina dio como resultado una leve mejora comparada con la adición de EGF sólo y fibronectina sólo.

45 En suma, debe deducirse que la formación de monocapas de células CEF en el medio 199 exento de suero puede ser soporta por el uso de los aditivos EGF y fibronectina.

Además, en series de experimentos paralelas se sembraron 1 x 10⁷ células CEF en medio que comprendía 10% de FCS, medio que no comprendía FCS pero comprendía EGF. El número de células se contó dos días después de la siembra. El número de células ascendía a 42%, 6% y 44%, respectivamente, del número de células utilizado para la siembra. Así pues, los resultados para las células sembradas en medio exento de suero que comprendía EGF eran tan satisfactorios como los resultados obtenidos con medio FCS y significativamente mejores que con medio que no contenía suero ni EGF. Adicionalmente, el medio que comprendía EGF se comparó con diversos medios estándar exentos de suero, tales como DMEM, Opti-Mem o 293-SFM. A este fin, se sembraron 1 x 10⁷ células CEF en los diversos medios exentos de suero y se cultivaron durante 4 días. El número de células cultivadas en el medio que comprendía EGF era 24, 5 y 12 veces mayor que el número de células cultivadas en DMEM, Opti.Mem y 293-SFM exentos de suero, respectivamente.

Ejemplo 4: Infección de células CEF con MVA (Ejemplo de Referencia)

Se infectaron células CEF cuatro días después de la siembra en frascos rotativos. En dicho momento, las células han crecido hasta una monocapa adecuada. Las células se infectaron con una MOI de 1 ó 0,1 MVA. Para la infección, el medio de crecimiento se retiró de los frascos. La cantidad deseada de virus por frasco rotativo se diluyó en 20 ml del medio de crecimiento apropiado sin suero. En esta etapa, el medio exento de suero puede comprender o no un factor seleccionado de factores de crecimiento y fibronectina. Se incubaron las células con el virus durante 1 hora a 37°C a 0,3-0,5 rpm en una incubadora de frascos rotativos. Después de una hora, los frascos rotativos se llenaron con el medio de crecimiento exento de suero apropiado hasta un volumen total de 200 ml por frasco rotativo. En esta etapa, el medio exento de suero puede comprender o no un factor seleccionador de factores de crecimiento y fibronectina. La replicación del virus cesó después de 48 ó 72 horas por congelación de los frascos rotativos a -20°C.

Ejemplo 5: Preparación de extractos virales a partir de células CEF infectadas y titulación de MVA

Los frascos rotativos congelados se descongelaron a la temperatura ambiente. Durante el proceso de descongelación, las células se desprenden de la superficie de los frascos rotativos y pueden retirarse mecánicamente por agitación de los frascos mediante sacudidas. La suspensión virus/células se recogió y se dividió en partes alícuotas a volúmenes menores. Para liberar el virus de las células infectadas, las suspensiones virus/células se congelaron/descongelaron 3 veces. Las muestras de virus procedentes de la congelación/descongelación se utilizaron para la titulación.

Las titulaciones se realizaron sobre células CEF procedentes de la primera pasada en placas de 96 pocillos, utilizando diluciones de 10 veces de la suspensión viral y 8 réplicas por dilución. Después de la infección, las células infectadas se visualizaron con un anticuerpo anti-virus Vaccinia y una solución de tinción apropiada.

En detalle, el día cero del ensayo, las células CEF primarias (véase la sección "preparación de células Fibroblasto de Embrión de Pollo (ECF)") se tripsinizaron y se contaron como se describe en la sección "recuento de la densidad de células". Las células se diluyeron a 1×10^5 células/ml en medio RPMI con 7% FCS. Después de esta dilución, se sembraron 100 µl en cada pocillo de las placas de 96 pocillos utilizando una pipeta multicanal. Las células se incubaron durante una noche a 37°C y 5% de CO₂. Las muestras de virus a titular (véase la sección "preparación de extractos virales a partir de células CEF infectadas") se diluyeron serialmente en pasos de 10 veces de 10^{-1} - 10^{-12} utilizando RPMI sin suero. Esta dilución seriada se lleva a cabo añadiendo 900 µl de RPMI a todos los pocillos de una placa de 96 pocillos profundos. Se añadieron 100 µl de la muestra de virus a todos los pocillos de la primera fila y se mezclaron. Después de ello, se transfirieron 100 µl de cada muestra a la fila siguiente de pocillos utilizando una pipeta multicanal. Las placas de 96 pocillos profundos se mantuvieron en hielo mientras se realizaban las diluciones. Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C y 5% CO₂ para permitir el progreso de la infección. Después de 5 días, se tiñeron inmunohistoquímicamente las células con un anticuerpo específico del virus Vaccinia. Para la tinción, se retiró el medio de cultivo volcando la placa de 96 pocillos sobre un recipiente. Las células se fijaron con 100 µl/pocillo de mezcla metanol/acetona (1:1) durante 10 minutos a la temperatura ambiente. La solución de fijación se retiró y se secaron las placas al aire. Después del secado, se lavaron las células una sola vez con PBS y se incubaron durante una hora a la temperatura ambiente con el anticuerpo del virus Vaccinia (anticuerpo Anti-virus Vaccinia, policlonal de conejo, fracción IgG (Quartett, Berlín, Alemania #9503-2057) diluido a 1:1000 en PBS con 3% de FCS. Después de retirar el anticuerpo, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-conejo acoplado a HRP (par de Peroxidasa de Rábano Picante) (anticuerpo anti-IgG de conejo, policlonal de cabra acoplado a HRP (Promega, Mannheim, Alemania #W4011) diluido hasta 1:1000 en PBS con 3% FCS. Una vez más, se lavaron las placas con PBS y se tiñeron con o-dianisidina o TMB. Para utilización del método de tinción con o-dianisidina, las células se incubaron con 100 µl/pocillo de solución de tinción constituida por 5 mg de o-dianisidina y 180 µl de H₂O₂ al 30% por 60 ml de tampón fosfato-citrato 50 mM. Las células se incubaron a la temperatura ambiente hasta que se tiñeron de color pardo. Las células infectadas eran claramente visibles al cabo de 1-3 horas. Utilizando el método de tinción con TMB, se incubaron las células con 30 µl/pocillo de TMB 1,2 mM (Seramun Diagnostica GmbH). Después de 15 minutos de tiempo de incubación, la solución de TMB se retiró y las células se lavaron una sola vez con PBS. Las células infectadas aparecen de color azul oscuro. Se registraron las placas respecto a células infectadas. Se calculó el título de virus utilizando la fórmula de Spearman y Kaerber. Para el cálculo del valor TCID₅₀, cada pocillo que contenía células pardas o azules se marcó como positivo. Dado que los parámetros de ensayo se mantienen constantes, se utilizó la fórmula simplificada siguiente:

a = factor de dilución de la última columna, en la cual la totalidad de los 8 pocillos son positivos

X_a = número de pocillos positivos en la columna a+1

55 X_b = número de pocillos positivos en la columna a+2

X_c = número de pocillos positivos en la columna a+3

Ejemplo 6: Densidad óptima de siembra para células CEF en medio exento de suero y cantidad óptima de MVA para infección de las células CEF

Se determinó una densidad óptima de siembra de células de $7,5 \times 10^7$ células/850 cm² (superficie de un frasco rotativo) para el crecimiento de CEF exentas de suero. Las células eran capaces de construir una monocapa satisfactoria sin que se formaran grumos de gran tamaño el día 4 después de la siembra y podían infectarse en este momento.

Se realizaron experimentos para determinar el nivel óptimo de inoculación viral y el grado de la infección para la producción máxima de MVA a partir de células CEF cultivadas en un proceso exento de suero. Las células CEF se sembraron a una densidad de $7,5 \times 10^7$ células/850 cm² en medio de acuerdo con la presente invención. El día 4 después de la siembra, se infectaron las células con cantidades diferentes de MVA en el intervalo de 0,05 a 1,0 TCID₅₀/célula de MVA. Los resultados óptimos se obtuvieron con 0,1 TCID₅₀/célula de MVA.

Ejemplo 7: pH óptimo del medio exento de suero para cultivo e infección con MVA

MVA y otras infecciones de poxvirus son sensibles a pH inferior a 7,0. Los poxvirus no son estables en pH ácido y se recomienda que los poxvirus purificados se guarden en una solución tamponada por encima de pH 7,0 para asegurar la estabilidad e integridad viral durante el almacenamiento como una preparación viral líquida. Se realizaron experimentos para determinar el efecto sobre la producción de virus cuando se realizó la infección a pH inicial diferente. Se sembraron frascos rotativos con células CEF de la manera usual en medio exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF más L-glutamina 4 mM y se cultivaron durante 4 días. Las células se infectaron con MVA a 0,1 TCID₅₀/célula en medio exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF más L-glutamina y asparagina 1 mM a valores de pH diferentes comprendidos entre 6,5 y 9,0. A las 72 horas después de la infección, se midió el pH del medio y se determinaron los rendimientos de virus por titulación de extractos de células de la manera usual. Los resultados se presentan en la Tabla siguiente, que muestra el efecto del pH inicial del medio al comienzo de la infección sobre la producción de virus.

	Medio exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF	
pH inicial	pH a las 72 h p.l.	Título [TCID ₅₀ /ml]
6,5	7,05	$0,56 \times 10^7$
7,0	7,34	$10,0 \times 10^7$
7,5	7,53	$5,60 \times 10^7$
8,0	7,68	$8,60 \times 10^7$
8,5	7,75	$7,80 \times 10^7$
9,0	8,03	$0,65 \times 10^7$

Para las infecciones realizadas en medio exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF suplementado con L-glutamina y asparagina, la producción viral era relativamente constante con un pH inicial de 7,0 a 8,5, pero las producciones virales eran bajas al pH inicial de 6,5 y 9,0. El rendimiento óptimo se obtuvo a pH inicial de 7,0. Los medios estándar exentos de suero disponibles comercialmente tienen por lo general un pH de 7,4. Por tanto, el ajuste del pH del medio exento de suero a 7,0 puede contribuir a mejorar la producción de virus.

Ejemplo 8: Efecto de la adición de asparagina al medio exento de suero

Experimentos preliminares han revelado que la cantidad de asparagina puede limitarse durante el cultivo de células CEF y la infección de las células CEF con MVA. Para resolver el empobrecimiento de asparagina en medio exento de suero durante el proceso de cultivo e infección, se añadió asparagina adicional al medio como suplemento antes de infectar las células CEF. Para determinar la cantidad óptima de asparagina a fin de suplementar el medio con la misma, se sembraron frascos rotativos con células CEF ($7,5 \times 10^7$ células/850 cm²) en medio exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF más L-glutamina 4 mM. Cuatro días después de la siembra, se infectaron las células con MVA a 0,1 TCID₅₀/célula en medio exento de suero que comprendía 10 ng/ml de EGF más L-glutamina 4 mM

5 suplementado con concentraciones diferentes de asparagina (0,5, 1,0 y 1,5 mM). La replicación viral se paró a las 72 horas después de la infección y se determinaron los títulos de virus. Los resultados se muestran en la tabla siguiente que demuestra la producción de MVA a partir de células CEF suplementadas con niveles diferentes de asparagina durante la etapa de infección. Los títulos representan los valores medios de 3 frascos rotativos para cada suplementación de asparagina.

Suplemento de asparagina	Títulos de virus después de 72 horas de infección [TCID ₅₀ /ml]
0,0 mM	1,8 x 10 ⁸
0,5 mM	1,3 x 10 ⁸
1,0 mM	6,8 x 10 ⁸
1,5 mM	1,0 x 10 ⁸

Los resultados demuestran que la suplementación del medio exento de suero que comprendía 10 ng/ml de medio EGF con asparagina podía aumentar la producción de virus y que la suplementación hasta 1 mM durante el proceso de infección era óptima.

REIVINDICACIONES

- 1.Método para la amplificación de un poxvirus que comprende los pasos siguientes:
- (a) cultivo de células primarias de ave en un medio exento de suero;
 - (b) infección de las células primarias de ave con el poxvirus; y
- 5 (c) cultivo de las células infectadas en medio exento de suero hasta que se produce el poxvirus progenie, en donde las células primarias de ave son células que permiten la replicación productiva del poxvirus, y en donde el medio exento de suero de las etapas (a) a (c) comprende el factor de crecimiento epidérmico (EGF).
- 2.Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células primarias de ave son fibroblastos de embrión de pollo (CEF).
- 10 3.Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el EGF es EGF recombinante humano.
- 4.Método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la concentración de EGF está comprendida en un intervalo de 5 a 20 ng/ml de medio.
- 15 5.Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho medio exento de suero de las etapas (a) a (c) comprende además un factor de fijación, preferiblemente fibronectina.
- 6.Método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la concentración de fibronectina está comprendida en el intervalo de 1 a 10 µg/cm² de superficie del recipiente de cultivo de células.
- 7.Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en donde el medio comprende dos o más factores seleccionados de factores de crecimiento y factores de fijación.
- 20 8.Método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el medio comprende EGF y fibronectina en los intervalos de concentración que se definen en las reivindicaciones 4 y 6.
- 9.Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el medio comprende adicionalmente uno o más aditivos seleccionados de extracto microbiano, extracto de plantas y extracto de un animal no mamífero.
- 25 10.Método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el extracto microbiano es extracto de levadura o ultrafiltrado "yeastolate".
- 11.Método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el extracto de plantas es extracto de arroz o extracto de soja.
- 12.Método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el extracto de animal no mamífero es extracto de peces.
- 30 13.Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el poxvirus es un ortopoxvirus.
- 14.Método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el ortopoxvirus es un virus Vaccinia.
- 15.Método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el virus Vaccinia es virus Vaccinia modificado Ankara.
- 16.Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el poxvirus es un virus atenuado o un virus recombinante.
- 35 17.Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde a continuación del paso de cultivo de las células infectadas en medio exento de suero hasta que se produce el virus progenie, se realizan uno o más pasos de purificación.