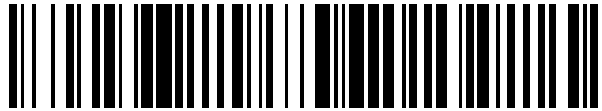


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 236 799**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.1997 E 97915628 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **20.11.2013 EP 0891420**

54 Título: **Procedimientos de replicación de virus de influenza en cultivo celular y virus de influenza obtenibles por el procedimiento**

30 Prioridad:

01.04.1996 DE 19612967

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

23.01.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS GMBH
(100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

GRÖNER, ALBRECHT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 236 799 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de replicación de virus de influenza en cultivo celular y virus de influenza obtenibles por el procedimiento

5 La presente invención se refiere a procedimientos de replicación de virus de influenza en cultivo de células a temperaturas reducidas, y a los virus de influenza obtenibles por el procedimiento descrito y a las vacunas que contienen virus de este tipo o constituyentes de los mismos.

10 Todas las vacunas para la influenza que han sido usadas desde los años 40 hasta el presente como vacunas permitidas para el tratamiento de seres humanos y animales están constituidas por una o más cepas del virus que han sido replicadas en huevos embrionados de gallina. Estos virus se aíslan del fluido alantoideo de los huevos de las gallinas infectadas y sus antígenos se usan como vacuna, como partículas de virus intactas o como partículas de virus desintegradas por detergentes y/o solventes – así llamadas vacunas fraccionadas– o como proteínas definidas del virus aisladas – así llamadas vacunas de subunidad. En todas las vacunas permitidas, los virus se inactivan por procedimientos conocidos por las personas expertas en la técnica. Aún la replicación de virus vivos atenuados, que se evalúan en vacunas experimentales, se lleva a cabo en huevos embrionados de gallina.

15 El uso de huevos embrionados de gallina, para la producción de vacunas demanda mucho tiempo, trabajo y resulta costoso. Los huevos de gallineros de gallinas sanas, controladas por veterinarios, se deben incubar antes de la infección, los huevos se deben seleccionar en relación a los embriones vivos, dado que sólo estos huevos son adecuados para la replicación del virus. Tras la infección, los huevos se incuban nuevamente, habitualmente durante 2 a 3 días. Los embriones aún vivos en este momento, se matan con frío y se obtiene el fluido alantoideo de cada huevo individualmente por aspiración. Mediante procedimientos laboriosos de purificación se separan sustancias de los huevos de las gallinas que llevan a efectos indeseados de las vacunas, de los virus, y éstos se concentran. Como los huevos no son estériles (libres de patógenos), es necesario también remover y/o inactivar pirógenos y todos los patógenos posiblemente presentes. Para aumentar el rendimiento de virus, la replicación de los virus de influenza en huevos de gallina, ésta se lleva a cabo por regla general a temperaturas reducidas (alrededor de 34 °C). Aún los virus que pueden provocar enfermedades respiratorias se pueden replicar en cultivo celular. También aquí, en algunos casos se usan temperaturas reducidas (alrededor de 33 °C), que sin embargo no afectan a la calidad de la vacuna obtenida, sólo favorecen la replicación.

20 Los virus de otras vacunas, como por ejemplo el virus de la rabia, paperas, sarampión y rubéola, polio y meningoencefalitis (FSME) se pueden replicar en cultivos celulares. Como los cultivos celulares originados de bancos de células evaluados están libres de patógenos, en contraste con los huevos de gallina, son un sistema definido de replicación que (teóricamente) está disponible en cantidades casi ilimitadas, hacen posible la replicación de virus de manera económica bajo ciertas circunstancias, aún en el caso de los virus de influenza. Es posible conseguir una producción económica de vacunas además por el hecho de que el aislamiento y purificación desde un medio estéril de un cultivo celular definido parece ser más simple que el realizado desde el fluido alantoideo, con su alto contenido proteico.

25 El aislamiento y replicación de virus de influenza en huevos lleva a una selección de ciertos fenotipos, la mayoría de los cuales difieren del aislamiento clínico. En contraste con esto, en el aislamiento y replicación de virus en cultivos celulares no ocurre ninguna selección dependiente de las etapas (Oxford, J.S. y col., J. Gen. Virology 72 (1.991), 185 – 189; Robertson, J.S. y col., J. Gen. Virology 74 (1.993) 2.047 – 2.051). Por lo tanto, la replicación de virus en cultivos celulares es también preferente frente a aquella en huevos en relación a este aspecto, para obtener vacunas efectivas. Es sabido que los virus de influenza se pueden replicar en cultivos celulares. Frente a las células embrionadas de gallina y células de hámster (BHK21-F y HKCC), se ha descrito que las células MDBK, y en particular MDCK, son apropiadas para la replicación in vitro de virus de la influenza (Kilbourne, E. D., en: Influenza, páginas 89 – 110, Plenum Medical Book Company – New York and London, 1.987). Un requisito previo para una infección exitosa es el agregado de proteasas al medio de infección, preferentemente tripsina o serino proteasas similares, ya que estas proteasas fraccionan extracelularmente al precursor de hemaglutinina [HA₀] dando lugar a hemaglutinina activa [HA₁ y HA₂]. Solamente la hemaglutinina fraccionada lleva a la adsorción de los virus de influenza en las células con la subsecuente asimilación del virus dentro de la célula (Tobita, K. y col., Med. Microbiol. Immunol., 162 (1.975), 9 – 14; Lazarowitz, S.G. & Choppin, P.W., Virology, 68 (1.975) 440-454, Klenk, H. D. y col., Virology 68 (1975) 426 – 439) y de este modo a un posterior ciclo de replicación del virus en el cultivo celular.

30 La patente US 4.500.513 describe la replicación de virus de influenza en cultivos celulares de células de crecimiento adherente. Después de la proliferación celular, el medio nutritivo se elimina y se añade medio nutritivo fresco a las células, y la infección de las células con virus de influenza tiene lugar simultáneamente o apenas después. A un tiempo determinado después de la infección se agrega proteasa (por ejemplo tripsina) con el objeto de obtener una replicación viral óptima. Los virus se recolectan, purifican y procesan para obtener vacunas inactivadas o atenuadas. La replicación de manera económica del virus de la influenza como un requisito previo para la producción de vacunas no se puede cumplir, de cualquier manera, usando la metodología descrita en la mencionada patente, como el cambio de medio, la infección subsecuente, así como la adición de tripsina, que se lleva a cabo más tarde, requiere que los recipientes de cultivo celular se abran en varias oportunidades, lo que resulta una tarea muy laboriosa. Además, el peligro de contaminación del cultivo celular por microorganismos y virus indeseables aumenta

con cada manipulación de los recipientes de cultivo. Una alternativa más productiva en relación al costo es la proliferación celular en sistemas fermentadores conocidos por las personas expertas en la técnica, las células de crecimiento adherente en microportadores. El suero necesario para el crecimiento de las células en los microportadores (usualmente suero fetal de bovino), de cualquier manera, contiene inhibidores de tripsina, de manera tal que aún con este procedimiento de producción es necesario un cambio del medio por medio libre de suero para lograr el fraccionamiento de la hemaglutinina de influenza por la tripsina y de esta manera una replicación de virus adecuadamente alta. De este modo esta metodología también requiere la apertura de los recipientes de cultivo varias veces y así trae consigo el peligro aumentado de contaminación. En la patente US 4.500.513, la replicación viral se lleva a cabo a 34 – 37 °C. De manera similar, Mancini & Yano [Rev. Farm. Bioquím. Univ. S.Paulo (1.993) 29: 89-95] describen un procedimiento de cultivo celular para influenza en el que el virus es replicado a 35 °C. Estos autores usaron células MDCK cultivadas en un medio Eagle suplementado con suero fetal de bovino y neomicina. La tripsina se agregó a las células cultivadas después de la infección con el virus de influenza.

El objeto de la presente invención es crear procedimientos disponibles que hagan posible la replicación del virus de influenza en cultivo celular simple y económica y que permita obtener vacunas altamente eficaces.

Este objeto se logra con la provisión de las formas de realización indicadas en las reivindicaciones de patente.

La invención, de esta manera, se refiere a un procedimiento para hacer una vacuna en cultivo celular, como se define en las reivindicaciones, en cuyas células MDCK 33016, que se pueden infectar por el virus de influenza, se cultivan en cultivo celular en suspensión en un medio libre de suero, las células se infectan con virus de influenza y después de la infección se cultivan a una temperatura en el intervalo de 30 a 36 °C para la replicación viral. Antes o durante la infección con el virus de influenza, se agrega una proteasa al cultivo celular. Mas detalles del tratamiento con proteasa se exponen a continuación.

En una forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo a la invención, el cultivo de las células infectadas para replicación viral se lleva a cabo de 32 a 34 °C y particularmente preferentemente a 33 °C.

Se ha encontrado, sorprendentemente, que replicando los virus de influenza en células infectadas a temperaturas reducidas, los virus obtenidos tienen una eficacia apreciablemente mayor como vacuna que aquellos virus que se obtienen por replicación a 37 °C. La replicación a 37 °C, la temperatura clásicamente usada para replicación de influenza en cultivo celular, lleva a rendimientos de virus comparativamente altos en un tiempo corto. De cualquier manera, los virus producidos de este modo tienen una eficacia baja como vacuna en comparación con los virus preparados por el procedimiento de acuerdo a la invención.

En el contexto de la presente invención se estableció una línea celular de la línea celular MDCK de riñón, que está adaptada al crecimiento en suspensión en un medio libre de suero y por ello hace posible un cultivo y una replicación viral particularmente simples y eficientes. Esta línea celular, MDCK 33016, se usa en el procedimiento de acuerdo con la invención. Se depositó bajo el número de depósito DSM ACC 2219 el 7 de junio de 1.995 de acuerdo a los requerimientos de la convención de Budapest de reconocimiento de depósito de microorganismos para los propósitos de patentamiento en la colección alemana de microorganismos (DSM) en Brunswick (República Federal Alemana), que se reconoce como un sitio de depósito internacional.

Para cultivar las células en el procedimiento con la invención, se pueden usar para el cultivo celular los procedimientos habituales conocidos por las personas expertas en el tema, en particular aquellos que ya son conocidos para la replicación de virus de influenza en cultivos celulares. El llevar a cabo los procedimientos de acuerdo con la invención usando células que crecen en suspensión, en medios libres de suero, hace posible una replicación de virus particularmente simple y eficiente. El cultivo de células en suspensión puede ser llevado a cabo en este caso en un procedimiento en lote o en un sistema de perfusión, por ejemplo en un recipiente fermentador agitado, usando los sistemas de retención celular conocidos por la persona experta en la técnica, como por ejemplo centrifugación, filtración, filtros spin y similares.

El cultivo de las células se lleva a cabo por regla general a un pH regulado preferentemente en el intervalo desde pH 6,6 hasta pH 7,8, en particular en el intervalo de pH 6,8 a pH 7,3.

Además, el valor de pO₂ puede ventajosamente ser regulado y es luego por regla general entre 25 % y 95 %, en particular entre 35 % y 60 % (basado en la saturación del aire).

La infección de las células cultivadas en suspensión es llevada a cabo, preferentemente, cuando las células en el procedimiento de lote han alcanzado una densidad celular de alrededor de 8 a 25 x 10⁵ células / ml o alrededor de 5 a 20 x 10⁶ células / ml en el sistema de perfusión.

La infección de las células con virus de influenza es llevada a cabo preferentemente a m.d.i. (multiplicidad de infección) de alrededor de 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 0,5.

El agregado de una proteasa para lograr dar el fraccionamiento de la proteína precursora de hemaglutinina [HA₀] y de esta manera permitir la adsorción de los virus a las células, puede ser llevado a cabo de acuerdo a la invención apenas antes o simultáneamente con la infección de las células con los virus de influenza. Si ese agregado se lleva

a cabo simultáneamente con la infección, la proteasa se puede agregar bien directamente al cultivo celular a infectar o, por ejemplo, como un concentrado junto con el inoculo de virus. La proteasa es preferentemente una serino proteasa, y particularmente preferentemente tripsina.

5 Si se usa tripsina, la concentración final agregada en el medio de cultivo es ventajosamente 1 a 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$, preferentemente 5 a 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y particularmente preferentemente 5 a 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Tras la infección, el cultivo celular infectado es cultivado para la replicación de los virus, en particular hasta que se pueda detectar una cantidad máxima o un efecto citopático máximo de antígeno viral.

10 En una forma de realización preferente del procedimiento, la recolección y el aislamiento de los virus de influenza replicados se llevan a cabo 2 a 10 días, preferentemente 3 a 7 días después de la infección. Para hacer esto, por ejemplo, las células o residuos celulares son separados del medio de cultivo por procedimientos conocidos por la persona experta en la técnica, por ejemplo, con separadores o filtros. Siguiendo a esto se lleva a cabo la concentración de los virus de influenza presentes en el medio de cultivo por procedimientos conocidos por la persona experta en la técnica, tales como, por ejemplo centrifugación en gradiente, filtración, precipitación y similares.

15 Los virus de influenza se formulan por técnicas conocidas para dar una vacuna para administración a seres humanos o animales. Como ya se ha explicado con anterioridad, los virus de influenza de éste tipo tienen una eficacia mayor como vacuna que los virus de influenza obtenidos por replicación en cultivo celular a 37 ° C.

20 La inmunogenicidad o eficacia de los virus de influenza obtenidos como vacuna puede ser determinada por procedimientos conocidos por personas expertas en la técnica, por ejemplo, por medio de la protección impartida en el experimento de exposición o como títulos de anticuerpo de anticuerpos neutralizantes del virus.

25 La determinación de la cantidad de virus o antígenos producido puede llevarse a cabo, por ejemplo, por la determinación de la cantidad de hemaglutinina por procedimientos conocidos por las personas expertas en el tema. Es sabido, por ejemplo, que la hemaglutinina fraccionada se une a los eritrocitos de varias especies, por ejemplo a los eritrocitos de gallina. Esto permite una cuantificación rápida y simple de los virus producidos o de los anticuerpos formados por procedimientos apropiados de detección.

30 Mediante la comparación de experimentos en modelos animales, se ha demostrado que los virus de influenza de acuerdo con la invención producen un título de anticuerpos neutralizantes apreciablemente mayor que los virus replicados a 37 ° C y por ello imparten una protección apreciablemente mejor contra la infección del virus de influenza. En experimentos con ratones como un modelo animal, el título de anticuerpos neutralizantes fue, por ejemplo, mayor por al menos un factor de 42 semanas después de la vacunación que el título de anticuerpos neutralizantes después de la inoculación con virus de influenza que habían sido replicados a 37 ° C. Cuatro semanas después de la inoculación, el título de anticuerpos neutralizantes fue mayor por al menos un factor de 17 y en algunos casos hasta 27 veces mayor. Si se llevaba a cabo una re vacunación, el título de anticuerpos neutralizantes podía ser mayor por un factor de más de 60 cuando se usaba virus de influenza de acuerdo con la invención en comparación con los virus de influenza que habían sido replicados a 37 ° C. En consecuencia, la tasa de supervivencia de animales en un experimento de exposición usando una administración de 1.000 DL_{50} (dosis letal 50 %) puede incrementarse de 1/10 a hasta al menos 8/10, preferentemente de 9/10 y particularmente preferentemente a 10/10 (100 %).

40 Las vacunas obtenibles por el procedimiento de acuerdo con la invención pueden contener opcionalmente los aditivos usuales para vacunas, en particular sustancias que incrementan la respuesta inmune, por ejemplo, los llamados adyuvantes, por ej. hidróxidos de varios metales, constituyentes de paredes celulares bacterianas, aceites o saponinas, y además los excipientes farmacéuticamente tolerables usuales.

45 Los virus pueden estar presentes en las vacunas como partículas virales intactas, en particular como virus vivo atenuado. Para este propósito, los concentrados virales son ajustados al título deseado y liofilizados o estabilizados en forma líquida.

50 En otra forma de realización preferente, las vacunas pueden contener virus desintegrados, es decir inactivados, o virus intactos pero inactivados. Para este propósito, la infectividad del virus es destruida por medio de procedimientos químicos o físicos (por ej. con detergentes o formaldehído). La vacuna es luego ajustada a la cantidad deseada de antígeno y después de la posible mezcla con adyuvantes o después de la formulación de la vacuna, dispensada, por ej. como liposomas, microesferas o formulaciones de liberación lenta.

En otra forma de realización preferente, las vacunas pueden finalmente presentarse como vacunas de subunidad, por ej. puede contener constituyentes virales definidos, aislados, preferentemente proteínas aisladas del virus de influenza. Estos constituyentes pueden ser aislados de los virus de influenza por procedimientos conocidos por la persona experta en la técnica.

55 Los ejemplos ilustran la invención

Ejemplo 1 [ejemplo de referencia]**Replicación de virus de influenza en células MDCK a 33 °C**

Se replicaron células MDCK (ATCC CCL 34) en botellas de cultivo (Eagle's MEM [EMEM] usando FCS 2%, incubación a 37 °C durante 4 días). La monocapa celular resultante fue extraída de la pared del recipiente usando una solución de tripsina, las células fueron aisladas y el concentrado celular resuspendido en un medio conteniendo suero. Las células fueron inoculadas en botellas rotatorias de 200 ml (botellas roller) a una densidad celular de 5×10^5 células/ml e incubadas a 37 °C a 4 rpm. Luego de 2 días, las células fueron infectadas con virus de influenza. Para hacer esto, se descartó el medio sobrenadante de monocapa celular y se lo reemplazó por EMEM libre de suero. Se agregó al medio el virus de influenza A/PR/8/34 con una m.d.i. (multiplicidad de infección) de 0,1 y tripsina en una concentración final de 25 µg/ml. Se incubaron en cada caso dos botellas roller, a 37 °C ó a 33 °C. La replicación viral fue determinada como cantidad de antígeno (medido como unidades de hemaglutinina) y como infectividad (medida con la prueba CC DI₅₀) y es mostrada en la Tabla 1.

Tabla 1

Replicación de virus de influenza A/PR/8/34 en botellas roller (línea celular MDCK) luego de incubación a 37 °C y 33 °C, medida como contenido de antígeno (unidades de HA e infectividad (CC DI₅₀))				
	Contenido de HA			CC DI ₅₀ /ml
	2 ddi	3 ddi	4 ddi	[log ₁₀]
37 °C	1:128	1:512	1:1.024	6,4
33 °C	1:64	1:256	1:1.024	5,7
ddi = días después de la infección				

Las proporciones indicadas significan que una dilución 1:X del virus obtenido aún tiene propiedades hemaglutinantes. Las propiedades hemaglutinantes pueden ser determinadas, por ej., como se describe en Mayer y col., *Virologische Arbeitsmethoden*, Volumen 1 (1.974), páginas 260 – 261 o en Grist, *Diagnostic Methods in Clinical Virology*, páginas 72 – 75.

La determinación del valor de CC DI₅₀ puede llevarse a cabo, por ej., de acuerdo con el procedimiento que es descrito en Paul, *Zell- und Gewebekultur [Cultivo celular y tisular]* (1.980), pág. 395.

Ejemplo 2**Preparación de una línea celular adaptada al crecimiento en suspensión y que puede ser infectada por virus de influenza.**

Se seleccionó una línea celular, la cual es adecuada para el crecimiento en suspensión y que puede ser infectada por virus de influenza, partiendo de células MDCK (ATCC CCL34 MDCK NBL-2), las que han sido proliferadas por medio de unos pocos pasajes o a través de varios meses en el laboratorio. Esta selección se llevó a cabo por proliferación de las células en botellas roller, las que fueron rotadas a 16 rpm (en lugar de alrededor de 3 rpm como es habitual para botellas en las que se cultivan células en crecimiento adherente). Luego de varios pasajes de las células en suspensión en el medio, se obtuvieron las cepas celulares de crecimiento en suspensión. Estas cepas celulares fueron infectadas con virus de influenza y se seleccionaron las cepas que produjeron un mayor rendimiento de virus. Se alcanzó un incremento en la tasa de células de crecimiento en suspensión durante los primeros pasajes a 16 rpm a través de 1 a 3 pasajes por la adición de sistemas de selección conocidos por la persona experta en la técnica, tales como hipoxantina, aminopterina y timidina, o alanosina y adenina, individualmente o en combinación. La selección de células de crecimiento en suspensión también es posible en otros sistemas de cultivo celular con agitación conocidos por la persona experta en la técnica, tal como frascos en agitación. Un ejemplo de células que están adaptadas a crecimiento en suspensión y pueden ser infectadas por virus de influenza es la línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219).

Ejemplo 3**Replicación de virus de influenza en células MDCK 33016 a 33 °C.**

La línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219) con crecimiento en suspensión fue replicada a 37 °C en medio Iscove con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces a la semana en una botella rotatoria con rotación a 16 rpm 4 días después de la transferencia, se obtuvo un recuento celular de aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml.

Simultáneamente con la infección del cultivo celular, el cual ahora lleva 4 días de cultivo, con la cepa del virus de influenza A/PR/8/34 (m.d.i. = 0,1), el cultivo celular fue tratado con tripsina (concentración final 25 µg/ml), incubado a 37 °C ó a 33 °C y la replicación viral fue determinada a lo largo de 3 días (tabla II).

Tabla II

Replicación del virus A/PR/8/64, medido como contenido de antígeno (unidades HA) en botellas roller (línea celular MDCK 33016) tras la infección del cultivo celular sin cambio de medio a una temperatura de incubación de 37 °C ó 33 °C.			
Contenido de HA luego de los días después de la infección (ddi)			
	1 ddi	2 ddi	3 ddi
37 °C	1:64	1:512	1:1.024
33 °C	1:16	1:128	1:1.024

5 **Ejemplo 4**

Replicación de varias cepas de virus de influenza en células MDCK 33016 (DSM ACC2219) a 33 °C

10 La línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219) fue proliferada a 37 °C en medio Iscove con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces a la semana en una botella rotatoria con rotación a 16 rpm 4 días después de la transferencia, se obtuvo un recuento celular de aproximadamente $7,0 \times 10^5$ a 10×10^5 células/ ml. Simultáneamente con la infección del cultivo celular. Simultáneamente con la infección del cultivo celular, el cual ahora lleva 4 días de cultivo, con varias cepas de influenza (m.d.i. \cong 0,1) el cultivo celular fue tratado con tripsina (concentración final 25 µg/ml), incubado a 33 °C, y la replicación viral fue determinada en el 5 ° día después de la infección (Tabla III).

Tabla III

La replicación de las cepas de influenza en botellas roller (línea celular MDCK 33016) después de la infección de un cultivo celular sin cambio de medio, medido como contenido de antígeno (unidades HA)	
Cepa de Influenza	Contenido de HA 5 días después de la infección
A/Singapore	1: 1.024
A/Sichuan	1: 256
A/Shanghai	1: 256
A/Guizhou	1: 128
A/Beijing	1: 512
B/Beijing	1: 256
B/Yamagata	1: 512
A/PR/8/34	1: 1.024
A/Equi 1/Prague	1: 512
A/Equi 2/Miami	1: 256
A/Equi 2/Fontainebleau	1: 128
A/Swine/Ghent	1: 512
A/Swine/Iowa	1: 1.024
A/Swine/Arnsberg	1: 512

Ejemplo 5

Preparación de una vacuna experimental para influenza

Tras la inoculación en ratones, los virus de influenza patogénicos para el ser humano usualmente no conducen a procesos patológicos con su infección, de manera que los experimentos de protección con ratones son muy difíciles de construir experimentalmente. La cepa de virus de influenza A/PR/8/34, de cualquier manera, está adaptada a ratones y luego de la administración intranasal causa mortalidad dosis dependiente en ratones.

Se preparó una vacuna experimental del virus de influenza A/PR/8/34 del Ejemplo 3 (A/PR/8 replicado a 37 °C ó 33 °C). Los virus de influenza en medio de cultivo celular fueron separados de las células y los fragmentos celulares por centrifugación a baja velocidad (2.000 g, 20 minutos, 4 °C) y purificados con una centrifugación en gradiente de sucrosa (10 a 50 %) (peso / peso) de gradiente de sucrosa lineal, 30.000 g, 2 hs, 4 °C). Se obtuvo la capa que contiene al virus de influenza, se diluyó 1:10 con solución tampón fosfato (PBS) a pH 7,2, y se sedimentó a 20.000 rpm, y el precipitado fue resuspendido en PBS (volumen: 50 % del medio de cultivo celular original). Los virus de influenza fueron inactivados con formaldehído (se adicionó dos veces solución de formaldehído al 0,025 % de una solución al 35 % en un intervalo de 24 hs, incubación a 20 °C con agitación).

Se inocularon 10 ratones NMRI, cada uno con un peso entre 18 y 20 g, con 0,3 ml de cada una de las vacunas experimentales inactivadas en el día 0 y el día 28 por inyección subcutánea. Se extrajo sangre de los animales para determinar el título de los anticuerpos neutralizantes contra A/PR/8/34 2 y 4 semanas después de la inoculación y también 1 y 2 semanas después de la revacunación. Para determinar la tasa de protección, los ratones fueron expuestos dos semanas después de la revacunación (6 semanas después del inicio del experimento) por administración intranasal de 1.000 DL₅₀ (dosis letal 50 %). Los resultados del experimento se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV

Eficacia de las vacunas experimentales: para la vacuna A el virus de influenza A/PR/8/34 fue replicado a 37 °C y para la vacuna B a 33 °C. Los títulos de anticuerpos neutralizantes contra A/PR/8 y también fue investigada la tasa de protección de los ratones tras la exposición.					
	Título de anticuerpos neutralizantes / ml*				Tasa de protección Número de sobrevivientes / total
	2 s dvac	4 s dvac	1 s drevac	2 s drevac	
37 °C	< 28	56	676	1.620	1/10
33 °C	112	1.549	44.670	112.200	9/10

* Semanas después de la vacunación (s dvac) y semanas después de la revacunación (s drevac).

Los experimentos confirman que los virus de influenza que han sido replicados a 37 °C en cultivo celular con un rendimiento de antígeno alto (título HA) sólo indujeron a bajos títulos de anticuerpos neutralizantes en el ratón y apenas proporcionaron protección, mientras que los virus de influenza que han sido replicados a 33 °C en cultivo celular también con un rendimiento alto de antígeno (título HA) indujeron muy altos títulos de anticuerpos neutralizantes en el ratón y brindaron una protección muy buena.

Ejemplo 6 [ejemplo de referencia]

Replicación de virus de influenza en células MDCK a 33 °C y eficacia de la vacuna obtenida.

La línea celular MDCK (ATCC CL34) fue replicada a 37 °C en botellas de cultivo celular en medio MEM de Eagle (EMEM) con FCS 2% con una tasa de división de 1:8 a 1:12 dos veces a la semana. El resultado 4 días después de la transformación fue una densa capa celular. Luego de cambiar el medio por un EMEM libre de suero, el cultivo celular fue infectado con influenza B/Beijing (m.d.i. = 0,1), se agregó tripsina al medio en una concentración final de 25 µg/ml y las botellas con el cultivo celular infectado fueron incubadas, bien a 37 °C o a 33 °C. El contenido de HA, 4 días después de la infección, fue en ambos lotes experimentales de 256 unidades HA. Después de una centrifugación a baja velocidad para remover células / residuos celulares, los virus en el sobrenadante fueron inactivados con formaldehído (se adicionó dos veces solución de formaldehído al 0,025 % de una solución al 35 % en un intervalo de 24 hs, incubación a 20 °C con agitación). En cada sección experimental, el adyuvante agregado fue hidróxido de aluminio (concentración final 10 %, de una solución al 2 % de Al(OH)₃). Usando estas vacunas experimentales, en cada caso por cada sección experimental, 3 cobayos fueron vacunados por vía intraplantar con 0,2 ml y se los revacunó 4 semanas después con la misma vacuna. Para investigar la eficacia de la vacuna, se tomaron muestras de sangre 2, 4 y 6 semanas después de la inoculación y se realizó la prueba de inhibición de hemaglutinación y la prueba de neutralización de suero (cfr. Tabla V).

Tabla V

Eficacia de las vacunas experimentales obtenidas con influenza B/Beijing luego de la replicación del virus a 37 °C y a 33 °C en cultivo celular: se investigaron los parámetros serológicos inhibición de hemaglutinación y anticuerpos neutralizantes (valores promedio de 3 cobayas).						
Inhibición de hemaglutinación				Anticuerpos neutralizantes		
	Título			Título		
	2 s dvac*	4 s dvac*	6 s dvac	2 s dvac	4 s dvac	6 s dvac
37 °C	85	341	1.024	851	1.290	6.760
33 °C	85	341	853	3.890	22.400	117.490

* s dvac = semanas después de la inoculación (6 s dvac = 2 semanas después de la revacunación).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de una vacuna para la administración a seres humanos o a animales que comprende:
 - 5 (a) la replicación de virus de influenza en cultivo celular, en la que las células MDCK 33016 (DSM ACC 2219) se cultivan en cultivo celular en suspensión en un medio libre de suero, las células son infectadas con virus de influenza y después de la infección se cultivan a una temperatura en el intervalo de 30 °C a 36 °C para la replicación viral, en el que se agrega una proteasa a las células cultivadas antes o durante la infección con los virus de influenza.
 - (b) formulación de los virus de influenza replicados para dar la vacuna
- 10 2. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que las células son cultivadas con virus de influenza a una temperatura en el intervalo de 32 °C a 34 °C después de la infección para la replicación viral.
3. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 2, en el que las células son cultivadas con virus de influenza a 33 °C después de la infección para la replicación viral.
- 15 4. El procedimiento como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteasa es una serino proteasa.
5. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que la serino proteasa es tripsina.
6. El procedimiento como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la recolección y el aislamiento de los virus de influenza tiene lugar 2 a 10 días después de la infección.
- 20 7. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 6, en el que la recolección y el aislamiento de los virus de influenza tiene lugar 2 a 7 días después de la infección.