

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 805**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

**C07K 14/10** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2007 E 12156030 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **17.02.2021 EP 2497495**

54 Título: **Fabricación de vacunas contra virus de la gripe sin usar huevos**

30 Prioridad:

**11.09.2006 US 843720 P**

**18.06.2007 US 936279 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente limitada:  
**21.10.2021**

73 Titular/es:

**SEQIRUS UK LIMITED (100.0%)**  
**Point, Level 3, 29 Market Street**  
**Maidenhead, Berkshire SL6 8AA, GB**

72 Inventor/es:

**TSAI, THEODORE F. y**  
**TRUSHEIM, HEIDI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**DESCRIPCIÓN**

Fabricación de vacunas contra virus de la gripe sin usar huevos

**5 CAMPO TECNICO**

Esta invención está en el campo de la fabricación de vacunas para proteger contra el virus de la gripe.

**10 ANTECEDENTES DE LA TECNICA**

El proceso actual para preparar vacunas estacionales contra infección de virus de gripe humana implica los pasos siguientes [1,2]: (a) aislamiento de cepas de virus circulantes; (b) análisis antigénico y genético de los virus aislados; (c) selección de cepas de siembra para su uso durante la próxima estación; (d) preparación de cepas de siembra de alto crecimiento por redistribución o el uso de genéticas inversas; (e) lanzamiento de cepas de siembra para los fabricantes de vacunas; (f) evaluación por los fabricantes de la idoneidad de la cepa para la producción industrial; y (g) cultivo de las cepas de siembra para producir virus de los que se fabrican las vacunas.

Los pasos (a) a (e) de este proceso se realizan por la FDA y centros para la gripe internacionales aprobados por el gobierno, típicamente bajo el patronazgo de la Organización Mundial de la Salud; los pasos (f) y (g) se realizan por los mismos fabricantes.

El paso (d) transiciona un virus de uno que está adaptado de forma natural para infectar humanos a uno que crecerá a títulos altos bajo condiciones de crecimiento industriales. Para el virus de la gripe A, este paso implica típicamente crear una cepa redistribuida 6:2 que incluye los segmentos de genoma que codifican Ha- y Na- para las cepas seleccionadas en (c) y los seis segmentos del genoma restantes de una cepa que crece eficientemente en huevos de gallina, y esta cepa es habitualmente la A/PR/8/34. El procedimiento de redistribución es seguido después por el paso repetido de la cepa en huevos embrionados para permitir la adaptación del huevo y la mejora del crecimiento. Para el virus de la gripe B, se obtienen cepas prototipo con buenas características de crecimiento por paso directo y repetido en huevos embrionados sin intentar generar redistribuciones.

Así los pasos realizados antes del lanzamiento a los fabricantes de vacunas implican pasar virus de la gripe por huevos. Incluso si los virus se cultivan por un fabricante en el paso (g) en un sustrato celular, en lugar de en huevos, el virus todavía habrá pasado a través de huevos en alguna etapa entre el aislamiento en el paso (a) y la recepción por un fabricante en el paso (e).

Por ejemplo, el paso (a) implica exponer un sustrato a una muestra del paciente, de tal manera que cualquier virus en la muestra infectará el sustrato. El sustrato puede entonces amplificar la cantidad de virus presente, y los virus amplificados están después disponibles para estudio adicional. Este paso puede tener lugar en huevos o en células mamíferas. Las células conocidas para su uso en aislamiento primario incluyen células MRC-5 [3], células Vero [4, 5], células MDCK [6], células HepG2 [7], células LLC-MK2 [8], etc. En general, sin embargo, los huevos de gallina continúan siendo usados para aislar cepas de referencia para la fabricación de vacunas contra la gripe. El uso de huevos es tan importante para los procedimientos actuales que en la estación 2003-04 la FDA rechazó el uso de la cepa H3N2 (A/Fujian/411/2002) más apropiada ya que no había sido aislada originalmente en huevos [2, 9] y no había disponibles cepas aisladas en huevos antigénicamente similares.

Se ha propuesto anteriormente eliminar el uso de huevos de varias etapas de la fabricación del virus de la gripe.

La referencia 10 propone que las vacunas deberían ser cultivadas en cultivo celular usando o una (i) cepa de alto crecimiento de un aislado clínico pasado o (ii) un redistribuido derivado de al menos una cepa del virus de la gripe mamífera de origen natural, siempre que el aislado o redistribuido no se haya pasado por huevos de ave. Así el proceso descrito en la referencia 10 empieza con un virus de siembra que ya ha sido seleccionado o manipulado para el crecimiento en el cultivo celular de elección.

La referencia 11 compara virus pasados a través de huevos con los pasados a través de células MDCK, pero selecciona específicamente los primeros para la fabricación de vacunas.

La referencia 12 sugiere que los virus de siembra para vacunas contra gripes pandémicas podrían prepararse propagando la cepa pandémica directamente en cultivo celular mamífero en lugar de a través de huevos embrionados, pero indica que el paso por el huevo era obligatorio para la fabricación inter-pandémica. La razón para este paso por el huevo obligatorio es que se ha creído que actúa como un "filtro" para agentes extraños: las agencias reguladoras han aceptado que un serie de pasos en un sistema aviar, entre el aislado clínico original de un humano y la vacuna final para la administración a humanos, evitará que se co-repliquen agentes extraños de tipo mamífero con el virus de la gripe.

La invención tiene por objeto proporcionar procedimientos adicionales útiles en la fabricación de vacunas contra la gripe, en los que se reduce el uso de huevos, y preferiblemente se evita del todo. En un aspecto particular, la invención tiene por objeto proporcionar procedimientos adicionales y mejorados útiles en el aislamiento del virus de la gripe.

## **DIVULGACION DE LA INVENCION**

Aunque se ha propuesto anteriormente eliminar el uso de huevos de varias etapas de la fabricación de virus de la gripe, la invención difiere de estas propuestas en varios aspectos.

La invención proporciona un método para aislar un virus de la gripe de una muestra del paciente, que comprende un paso en el que la muestra del paciente se incuba con células MDCK, que crecen en un cultivo en suspensión libre de suero.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un proceso para preparar un virus de siembra de la gripe para la fabricación de vacunas, que comprende los pasos de: (i) aislar un virus de gripe de una muestra de paciente de acuerdo con el método de la invención para producir una célula MDCK infectada; (ii) pasar del virus de la célula infectada obtenido en el paso (i) por lo menos una vez; (iii) cultivar la célula infectada en el paso (ii) para producir virus de la gripe para usar como virus de siembra y (iv) purificar el virus de la gripe producido en el paso (iii) para proporcionar un virus de siembra.

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para preparar un virus de siembra de la gripe para la fabricación de vacunas, que comprende los pasos de: (i) aislar un virus de la gripe de una muestra de un paciente de acuerdo con el método de la invención para producir una célula MDCK infectada; (ii) preparar un ADNc de por lo menos un segmento de ARN viral de un virus de la gripe producido por la célula infectada obtenida en el paso (i), y usar el ADNc en un procedimiento de genética inversa para preparar un nuevo virus de la gripe con por lo menos un segmento de ARN viral en común con el virus de la gripe del paso (i); (iii) infectar una línea celular con el nuevo virus de la gripe, y luego cultivar la línea celular para producir el nuevo virus de la gripe para usar como un virus de siembra, y (iv) purificar el nuevo virus de la gripe producido en el paso (iii) para proporcionar un virus de siembra.

La invención también proporciona un proceso para fabricar una vacuna, que comprende antígenos de hemaglutinina (HA) de 2, 3, 4 o más cepas del virus de la gripe, donde las cepas son el virus de la gripe A y/o el virus de la gripe B, y el proceso comprende los pasos de (i) preparar un virus de siembra de la gripe de acuerdo con un proceso para preparar un virus de siembra de la gripe como se describió anteriormente, (ii) infectar una línea celular para el crecimiento con el virus de siembra de la gripe para proporcionar virus de gripe para la fabricación de vacunas, (iii) inactivación de los virus de la gripe proporcionados por la línea celular, y (iv) preparación de antígenos HA de los virus de gripe inactivados.

La invención también proporciona un proceso para preparar un antígeno del virus de la gripe para su uso en una vacuna, que comprende los pasos de: (i) aislar un virus de la gripe de una muestra de un paciente de acuerdo con el método de la invención, en el que las células MDCK son células MDCK 33016; (ii) infectar una línea celular con este virus de la gripe; (iii) cultivar las células infectadas del paso (ii) para producir el virus de la gripe, y (iv) preparar un antígeno del virus de la gripe para su uso en una vacuna del virus obtenido en el paso (iii).

### ***Preparación de virus de siembra***

Un primer aspecto de la divulgación proporciona un proceso para preparar un virus de siembra de la gripe para la fabricación de vacunas, que comprende los pasos de: (i) infectar una línea celular con un virus de la gripe obtenido o directamente de un paciente o de un aislado primario; (ii) pasar el virus de la línea celular infectada obtenida en el paso (i) al menos una vez; y (iii) cultivar las células infectadas del paso (ii) para producir el virus de la gripe. El virus de la gripe purificado a partir del cultivo de la etapa (iii) puede usarse como virus siembra.

Al contrario que la referencia 12, el virus de la gripe usado en el paso (i) es o un virus de la gripe B o un virus de la gripe A no pandémico, es decir, en el momento actual es una cepa H1N1 o H3N2 de la gripe A.

Ninguno de los pasos (i), (ii) o (iii) implica el crecimiento o el pase del virus en huevos. Preferiblemente, al menos dos de los pasos, e idealmente los tres pasos, tendrán lugar en el mismo tipo de célula, por ejemplo, todos en células MDCK.

El pase en el paso (ii) implicará generalmente: permitir que el virus de la gripe se replique en el cultivo celular; recoger el virus replicado, por ejemplo, del sobrenadante de cultivo; y transferir el virus replicado recogido a un cultivo celular no infectado. Este proceso se puede repetir. Después de al menos un pase, se permite que el virus se replique en el paso (iii) y se recoge el virus, pero el virus se usa como un virus de siembra en lugar de ser transferido a un cultivo no infectado para su posterior pase.

La línea celular usada con el primer aspecto preferiblemente no es una línea celular humana. Evitando el uso de células humanas, el "filtrado" de los agentes adventicios se puede mantener incluso sin el uso de huevos. Debido a la estrecha relación con los humanos, la línea celular tampoco es preferiblemente una línea celular de primate, por ejemplo, no es una línea celular Vero (derivada de riñón de mono). La Referencia 10 propone el uso de células Vero durante la fabricación de la vacuna, pero estas células son permisivas para muchos virus humanos, por lo que cualquier otro virus humano que esté presente en la muestra del virus de la gripe usada en el paso (i) podrá crecer en paralelo con el virus de la gripe, llevando a la contaminación del virus de siembra final.

Una línea celular preferida para su uso con el primer aspecto de la divulgación es una línea celular canina, como la línea celular MDCK (riñón canino Madin Darby), contrariamente a la enseñanza específica de la referencia 10. A continuación se proporcionan detalles adicionales de las células MDCK. Se ha descubierto ahora que las células MDCK muestran un efecto de "filtrado" contra los agentes adventicios que es equivalente al alcanzado por los huevos aviares. Por lo tanto, en base a este descubrimiento, las células MDCK se pueden usar en lugar de los huevos sin aumentar el riesgo regulatorio y, a pesar de los informes en la referencia 13 de que el pase de huevos en el virus de la gripe conlleva una ventaja de crecimiento durante el cultivo de MDCK, se evita el crecimiento de los huevos.

La Referencia 14 divulga que las cepas de gripe aisladas de pacientes humanos, sin pases en huevos o cultivos celulares, pueden crecer de manera eficiente en cultivos de células MDCK, incluso en cultivos libres de suero. Por tanto, la infección en el paso (i) puede usar un virus de la gripe de una muestra clínica (por ejemplo, de un hisopo faríngeo, etc.) obtenida directamente de un paciente, o puede usar un virus que ya haya sido sometido a aislamiento primario. En algunas circunstancias, el aislamiento primario antes del paso (i) puede haber tenido lugar en huevos, pero los aislados primarios preferidos para su uso con la presente divulgación son aquellos que se obtuvieron sin el uso de huevos, por ejemplo, en células de mamíferos. Las células conocidas para su uso en aislamiento primario incluyen, pero no están limitadas a, células MRC-5 [3], células Vero [4,5], células MDCK [6], células HepG2 [7], células LLC-MK2 [8], etc.

Cuando la presente divulgación usa aislados primarios en el paso (i), se prefiere que el aislamiento primario haya tenido lugar en el mismo tipo de célula que los pasos (i) a (iii). Se sabe que MDCK es adecuado tanto para el aislamiento primario, el pase como para el crecimiento de los virus de la gripe, pero las mejoras en el aislamiento de MDCK se describen a continuación.

Con el fin de maximizar el conocimiento del historial de un aislado del virus de la gripe, se prefiere usar un virus obtenido directamente de un aislado clínico en lugar de usar aislados primarios. Los sistemas de vigilancia de la gripe actuales implican el aislamiento primario en hospitales, enviando cepas de interés a los centros de gripe nacionales e internacionales. Además de usar una muestra de paciente para el aislamiento primario, es común que una parte se reserve y se almacene (por ejemplo, mediante congelación), de tal manera que sea posible volver al material original para el re-aislamiento. Cuando una muestra almacenada de este tipo está disponible, se puede usar en el paso (i) en lugar del aislado primario.

Si el historial de un aislado no está claro, y en particular cuando se comienza con un virus que no proviene directamente de una muestra clínica, es posible usar genética inversa entre los pasos (i) y (iii) para generar una nueva cepa viral que tiene por lo menos un segmento de genoma viral del virus original. El uso de genética inversa entre los pasos (i) y (iii) separa los productos virales usados en el paso (i) de los productos virales usados en el paso (iii), por lo que puede actuar como un filtro contra agentes adventicios que pueden haberse introducido antes del paso (i). Además de ser usadas como un 'filtro' de esta manera, las técnicas de genética inversa también pueden usarse por otras razones, por ejemplo, para generar reordenes, para manipular secuencias de codificación, para reemplazar segmentos específicos, etc. A continuación se proporcionan detalles adicionales en relación con el segundo aspecto de la divulgación.

#### ***Uso de genética inversa junto con cultivo celular de virus de la gripe***

Un segundo aspecto de la divulgación proporciona un proceso para preparar un virus de siembra de la gripe para la fabricación de vacunas, que comprende los pasos de: (i) infectar una línea celular con un virus de la gripe obtenido o directamente de un paciente o de un aislado primario; (ii) preparar un ADNc de por lo menos un segmento de ARN viral de un virus de la gripe producido por la línea celular infectada obtenida en el paso (i), y usar el ADNc en un procedimiento de genética inversa para preparar un nuevo virus de la gripe con por lo menos un virus segmento viral de ARN en común con el virus de la gripe del paso (i); y (iii) infectar una línea celular con el nuevo virus de la gripe, y luego cultivar la línea celular para producir el nuevo virus de la gripe.

El virus usado en el paso (i) puede ser un virus de gripe A de cualquier subtipo, o puede ser un virus de gripe B. Los subtipos de virus de la gripe A preferidos son H1, H3 y H5.

Ninguno de los pasos (i), (ii) o (iii) implica el crecimiento o el pase del virus en huevos. Preferiblemente, todos tienen lugar en el mismo tipo de célula, por ejemplo, todos tienen lugar en células MDCK.

Características adicionales de este segundo aspecto de la divulgación son las descritas anteriormente para el primer aspecto. Por lo tanto, se prefiere el uso de células MDCK, etc.

5 Las técnicas de genética inversa se describen con más detalle a continuación. El segmento(s) del genoma transferido en el paso (ii) incluirá el segmento HA, y puede incluir el segmento NA y/o uno o más segmentos adicionales.

#### *Virus de siembra*

10 El primer y el segundo aspectos de la divulgación proporcionan virus de siembra. Estos virus de siembra se pueden usar de varias maneras.

15 Los virus de siembra se pueden caracterizar, por ejemplo, para secuenciar sus ácidos nucleicos y/o proteínas, para verificar su relación antigénica con otras cepas (por ejemplo, cepas circulantes), para verificar su inmunogenicidad, etc. La secuenciación del gen HA viral para revelar la secuencia de aminoácidos de HA es típica.

Pueden usarse virus de siembra para obtener anti-sueros.

20 Los virus de la siembra pueden distribuirse a fabricantes de vacunas.

Los virus de siembra pueden almacenarse para uso futuro.

25 Los virus de siembra pueden usarse para preparar lotes de siembra de trabajo. Este sistema permite el almacenamiento seguro del virus de siembra original, mientras que el uso diario se realiza con los lotes de siembra de trabajo. Las siembra de trabajo pueden congelarse hasta que se requiera. La preparación de un lote de siembra de trabajo puede implicar un paso de crecimiento viral en cultivo celular, preferiblemente en el mismo tipo de célula que se usa en la preparación del virus de siembra. El crecimiento en huevos no se usa para preparar lotes de siembra de trabajo.

30 Los virus de siembra pueden usarse para infectar líneas celulares para el crecimiento para proporcionar virus para la fabricación de vacunas o para su uso en la preparación de pruebas de diagnóstico.

35 Los virus de siembra de la presente divulgación comparten muchas de las características de los virus de siembra derivados de huevos actuales, pero pueden diferir de varias maneras.

Por ejemplo, los virus de siembra de la gripe A preferidos de la presente divulgación incluyen menos de 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4 o 5) segmentos virales de un virus de la gripe PR/8/34, como se describe con más detalle a continuación.

#### **Aislamiento del virus**

40 Como se ha mencionado anteriormente, existe un fuerte desplazamiento hacia el uso de huevos para el aislamiento del virus de la gripe. En su lugar, la invención usa células MDCK. Como se ha explicado anteriormente, la invención proporciona un método para aislar un virus de la gripe de una muestra de un paciente, que comprende un psoa en la cual la muestra de paciente se incuba con una célula MDCK, en donde la célula MDCK está creciendo en un cultivo en suspensión libre de suero.

50 Las células MDCK pueden ser no tumorigénicas. Las células MDCK no pueden crecer en presencia de un medio de recubrimiento.

La muestra del paciente puede incubarse con una célula MDCK, en donde la célula MDCK está creciendo en un cultivo en suspensión libre de proteínas.

55 La muestra del paciente puede incubarse con una célula MDCK no tumorigénica.

La divulgación también proporciona un virus de la gripe aislado por uno de estos métodos.

La invención también proporciona el uso de dicho virus en la fabricación de vacunas.

60 La incubación de la muestra del paciente y la célula MDCK generalmente da como resultado la infección de la célula MDCK por un virus de la gripe, como un virus de la gripe humana, y en particular un virus de la gripe A. El virus se puede replicar en las células, y el virus replicado se puede luego recolectar. Opcionalmente, se puede uizar en pasos de métodos descendentes, por ejemplo, detección, caracterización, análisis, preparación de virus de siembra, manipulación, etc.

65

Después del aislamiento en células MDCK, un virus también puede pasarse y/o cultivarse en células MDCK. Como alternativa, puede pasarse y/o cultivarse en células que no son MDCK, o en huevos, o en otro sustrato.

5 La invención implica el uso de líneas celulares MDCK. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC, pero la invención usa derivados de esta línea celular. Como se muestra a continuación, se ha demostrado que el aislamiento en estos derivados es superior al aislamiento en la línea celular MDCK original. Las células MDCK adecuadas y sus características se tratan con más detalle a continuación.

10 Por ejemplo, algunas realizaciones usan una línea celular MDCK que puede replicarse espontáneamente en un cultivo en suspensión. La referencia 30 divulga una línea celular MDCK que se adaptó para el crecimiento en cultivo en suspensión, y esta línea celular ('MDCK 33016') es particularmente útil para los métodos de la invención. La MDCK 33016 puede crecer en cultivo libre de suero, y puede crecer sin necesidad de un medio de recubrimiento. Otra línea celular MDCK que puede crecer en cultivo en suspensión, incluso en cultivo libre de suero, es la línea celular 'B-702' [36; ver más adelante].

15 Las líneas celulares MDCK no tumorigénicas para su uso con la invención incluyen las divulgadas en la referencia 37, como 'MDCK-S', 'MDCK-SF101', 'MDCK-SF102' y 'MDCK-SF103' (ver más adelante).

20 En algunas realizaciones de la invención, las células MDCK crecen en medio de cultivo libre de suero y/o medio libre de proteínas.

A diferencia de ciertos métodos de la técnica anterior, la invención puede evitar la necesidad de usar un medio de recubrimiento durante el aislamiento del virus de la gripe.

25 Se prefiere que un virus no crezca en huevos antes de exponerse a las células MDCK como se describe anteriormente. También se puede preferir que el virus que crece en células MDCK, como se describe anteriormente, no se haga crecer posteriormente en huevos.

30 Para la muestra de paciente usada en la invención, las muestras clínicas usadas en el aislamiento del virus de la gripe pueden tomar varias formas, pero típicamente comprenden secreciones respiratorias, incluyendo pero no limitadas a: aspirados directos; gárgaras; lavados nasales; hisopos nasales; hisopos de garganta; hisopos de faríngeos; etc. Estos se toman generalmente de un paciente que se sospecha tiene una infección por el virus de la gripe, incluyendo pacientes que pueden ser portadores de una nueva cepa de virus de la gripe.

35 Los virus de gripe aislados por los métodos de la invención pueden usarse para preparar un virus de siembra de la gripe para la fabricación de vacunas. Por tanto, un método de la invención puede incluir un paso adicional para pasar el virus de una línea celular MDCK infectada al menos una vez. El método puede incluir luego un paso de cultivo de las células infectadas para producir el virus de la gripe. El virus de la gripe purificado después de este paso de cultivo puede usarse como un virus de siembra, como se describe en otra parte en la presente.

40 Un virus aislado de acuerdo con la invención también puede usarse como fuente para técnicas de genética inversa. De este modo, el ADNc puede prepararse a partir de por lo menos un segmento de ARN viral de un virus de la gripe aislado de acuerdo con la invención. El ADNc puede usarse luego en un procedimiento de genética inversa para preparar un nuevo virus de la gripe que tenga por lo menos un segmento de ARN viral en común con el virus de la gripe aislado. Este nuevo virus de la gripe puede usarse para infectar una línea celular, por ejemplo, para cultivo adicional.

45 La invención puede usarse para aislar cualquier virus de la gripe adecuado, incluyendo los virus de la gripe humana. Estos pueden ser virus de la gripe A, virus de la gripe B o virus de la gripe C. Los virus de la gripe A son típicos, y los subtipos útiles de virus de la gripe A son H1, H3 y H5.

50 En el período interpandémico actual, las vacunas suelen incluir dos cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de la gripe B. La invención puede usarse para aislar tales cepas, o para aislar cepas virales pandémicas, como cepas de subtipo H2, H5, H7 o H9. En general, la invención puede usarse para aislar un virus de gripe A que tiene uno de los subtipos HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

55 Los virus de la gripe aislados de acuerdo con la invención pueden incluir hemaglutinina con una preferencia de unión por oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,6)Gal en comparación con oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,3)Gal. Ventajosamente, se ha descubierto que los métodos de aislamiento de la invención ayudan a la retención estable de una secuencia de HA del virus, y por tanto su preferencia de oligosacáridos.

60 Los virus aislados de acuerdo con la invención pueden usarse en la fabricación de vacunas y en los métodos de tratamiento. Por tanto, la divulgación también proporciona el uso de un antígeno preparado a partir de un virus aislado de acuerdo con la invención, en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un paciente.

65

**Enlace de Receptores**

5 Los virus de la gripe humana enlazan con los oligosacáridos receptores que tienen un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal (ácido siálico  $\alpha$ 2,6 enlazado con galactosa), pero los huevos en cambio tienen oligosacáridos receptores con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal. El cultivo de virus de la gripe humana en huevos proporciona presión de selección en hemaglutinina lejos del enlace Sia( $\alpha$ 2,6)Gal hacia el enlace Sia( $\alpha$ 2,3)Gal

10 Como los huevos, las células Vero expresan predominantemente receptores Sia( $\alpha$ 2,3)Gal [15]. Por el contrario las células MDCK y las células PER.C6 expresan ambas Sia( $\alpha$ 2,3)Gal y Sia( $\alpha$ 2,6)Gal. La referencia 16 informa de la transfección de células MDCK para sobre-expresar  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa para favorecer la selección del enlace Sia( $\alpha$ 2,6)Gal. Incluso sin dichas manipulaciones, sin embargo, es posible cultivar virus de la gripe en células MDCK sin desplazarlas hacia el enlace Sia( $\alpha$ 2,3)Gal. Por lo tanto la invención puede usar células que expresan tanto Sia( $\alpha$ 2,3)Gal como Sia( $\alpha$ 2,6)Gal, pero puede producir virus de la gripe que tienen una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal

20 En realizaciones preferidas del primer y segundo aspectos de la invención, los virus de la gripe usados para la infección en el paso (i) tienen una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal. Esta preferencia de enlace se mantiene durante el paso (ii) y el paso (iii), de tal manera que el virus de la gripe producido en el paso (iii) tiene una preferencia para oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal.

25 En realizaciones preferidas del tercer y cuarto aspectos de la invención, los virus de la gripe usados para la infección en el paso (ii) tienen una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal. Esta preferencia de enlace se mantiene durante el paso (iii) y el paso (iv), de tal manera que el virus de la gripe producido en el paso (iv) tiene una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal.

30 Para determinar si un virus tiene una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal se pueden usar varios ensayos. Por ejemplo, la referencia 13 describe un ensayo ligado a enzimas en fase sólida para la actividad de enlace el receptor del virus de la gripe que da mediciones de sensibilidad y cuantitativas de las constantes de afinidad. La referencia 14 usó un ensayo en fase sólida en el que se evaluó el enlace de los virus de dos sialilglicoproteínas (ovomucoide, con determinantes Sia( $\alpha$ 2,3)Gal; y  $\alpha$ 2-macroglobulina de cerdo, con determinantes Sia( $\alpha$ 2,6)Gal), y también describe un ensayo en el que el enlace de los virus se evaluó contra dos análogos de receptores: ácido siálico libre (Neu5Ac) y 3'-sialilactosa (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc). La referencia 15 informa de un ensayo usando una matriz de glicano que fue capaz de diferenciar con claridad las preferencias del receptor para ligamientos  $\alpha$ 2,3 o  $\alpha$ 2,6. La referencia 16 informa de un ensayo basado en la aglutinación de eritrocitos humanos modificados enzimáticamente para contener o Sia( $\alpha$ 2,6)Gal o Sia( $\alpha$ 2,3)Gal. Dependiendo del tipo de ensayo, se puede realizar directamente con el mismo virus, o puede ser realizado indirectamente con hemaglutinina purificada del virus.

45 ***Virus (incluyendo virus de siembra) preparados o aislados por técnicas de la invención***

50 Los virus de la gripe A preferidos (incluyendo virus de siembra, virus aislados de muestras de pacientes usando células MDCK, virus redistribuidos, etc.) incluyen menos de 6 (es decir 0, 1, 2, 3, 4 ó 5) segmentos víricos de un virus de la gripe PR/8/34. Preferiblemente no incluyen segmentos de PR/8/34. Si hay presente cualquier segmento de PR/8/34 entonces estos no incluirán el segmento PR/8/34 HA y habitualmente no incluirán el segmento PR/8/34 NA. Así los virus preferidos son aquellos en los que al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del PR/8/34. Más preferiblemente, al menos uno de los segmentos NP, M, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del PR/8/34. Por lo tanto la invención puede mejorar sobre las vacunas existentes añadiendo a los antígenos de HA y NA normales uno o más antígenos que contienen epítomos que son representativos de una cepa circulante.

60 De manera similar, los virus de la gripe A preferidos incluyen menos de 6 (es decir (0, 1, 2, 3, 4 ó 5) segmentos víricos de un virus de la gripe AA/6/60 (A/Ann Arbor/6/60). Preferiblemente no incluyen segmentos de AA/6/60. Si hay presente algún segmento de AA/6/60 estos no incluirán el segmento AA/6/60 HA y habitualmente no incluirán el segmento AA/6/60 NA. Por lo tanto los virus preferidos son aquellos en los que al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/6/60. Más preferiblemente, al menos uno de los segmentos NP, M, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/6/60.

65 Los virus de la gripe B preferidos incluyen menos de 6 (es decir 0, 1, 2, 3, 4 ó 5) segmentos virales de un

virus de la gripe AA/1/66 (B/Ann Arbor/1/66). Preferiblemente no incluyen segmentos de AA/1/66. Si hay presente algún segmento de AA/1/66 estos no incluirán el segmento AA/1/66 HA y habitualmente no incluirán el segmento AA/1/66 NA. Por lo tanto los virus preferidos son aquellos en los que al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/1/66. Más preferiblemente, al menos uno de los segmentos NP, M, PA, PB1 y/o PB2 no está derivado del AA/1/66.

Los virus de la gripe preferidos de la invención (incluyendo virus de siembra, virus aislados de muestras de pacientes usando células MDCK, virus redistribuidos, etc.) incluyen hemaglutinina con una preferencia de enlace para oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,6)Gal terminal en comparación con oligosacáridos con un disacárido Sia( $\alpha$ 2,3)Gal terminal. Esta preferencia de enlace se trata con más detalle anteriormente.

Los virus de la gripe preferidos de la invención (incluyendo virus de siembra, virus aislados de muestras de pacientes usando células MDCK, virus redistribuidos, etc.) incluyen glicoproteínas (incluyendo hemaglutinina) con un patrón de glicosilación diferente de los virus derivados de huevos. Por lo tanto las glicoproteínas comprenderán glicofomas que no se ven en virus cultivados en huevos de gallina, por ejemplo pueden tener ligamientos de azúcar no aviares, incluyendo ligamientos de azúcar mamíferos.

### **Líneas celulares**

La invención implica el uso de líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe, y evita el uso de huevos. La línea celular será típicamente de origen mamífero. Las células de origen mamíferas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluyendo humanos y monos) y perro, aunque no se prefiere el uso de células de primate. Se pueden usar varios tipos de células, como células de riñón, fibroblastos, células de la retina, células pulmonares, etc. Ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuadas son, por ejemplo células de mono verde africano, como las células de riñón como en la línea celular Vero [21-23]. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo células de riñón, como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

Por lo tanto las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, MDCK; CHO; CLDK; HKCC; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6 [24]; FRhL2; WI-38; etc. Las líneas celulares adecuadas están ampliamente disponibles, por ejemplo de la colección American Type Cell Culture (ATCC) [25], de la Coriell Cell Repositories [26], o de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Por ejemplo la ATCC suministra varias células Vero diferentes bajo los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK bajo el número de catálogo CCL-34. La PER.C6 está disponible de la ECACC bajo el número de depósito 96022940. Cualquiera de estos tipos celulares puede ser usado para el cultivo, redistribución y/o paso de acuerdo con la invención.

Las líneas celulares más preferidas son aquellas con glicosilación tipo mamífero. Como una alternativa menos preferida a las líneas celulares mamíferas, los virus pueden ser cultivados en líneas celulares aviares [por ejemplo refs. 27-29], incluyendo líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas, por ejemplo fibroblastos de embrión de pollo (CEF), etc., pero el uso de células mamíferas implica que las vacunas pueden estar libres de ADN aviar y proteínas de huevo (como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo de esta manera la alergenicidad.

Las líneas celulares más preferidas para cultivar virus de la gripe son las líneas celulares MDCK [30-33], derivadas de riñón canino de Madin Darby. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también se pueden usar varios derivados de esta línea celular. Por ejemplo, la referencia 30 divulga una línea celular MDCK que se adaptó para el cultivo en suspensión ('MDCK 33016' o '33016-PF', depositada como DSM ACC 2219, ver también las refs. 34 y 35). De manera similar, la referencia 36 divulga una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo libre de suero ('B-702', depositado como FERM BP-7449). La referencia 37 divulga células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y MDCK-SF103' (ATCC PTA-6503). La referencia 38 divulga líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Cualquiera de estas líneas celulares MDCK se puede usar con la invención.

Los virus pueden ser cultivados en células en cultivo adherente o en suspensión. También se pueden usar cultivos de microportadores. En algunas realizaciones, las células pueden ser por lo tanto adaptadas para el cultivo en suspensión.

Las líneas celulares son cultivadas preferiblemente en medio de cultivo libre de suero y/o medio libre de proteínas. En el contexto de la presente invención un medio es referido como medio libre de suero cuando no tiene aditivos de suero de origen humano o animal. Las células que crecen en dichos cultivos contienen de manera natural proteínas por ellas mismas, pero se entiende que un medio libre de proteínas significa uno en el que la multiplicación de las células tiene lugar con exclusión de (sin la adición al medio de cultivo de) proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero puede incluir opcionalmente (en el medio de cultivo)



proteínas como tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para el crecimiento vírico.

Las líneas celulares que soportan la replicación de virus de la gripe se cultivan preferiblemente por debajo de 37° C [39] (por ejemplo 30-36° C, o a alrededor de 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C) durante la replicación vírica. Por ejemplo, en el sexto aspecto, las células MDCK pueden cultivarse (antes, durante o después del paso de aislamiento) a estas temperaturas, particularmente durante la replicación vírica.

Los métodos para propagar virus de la gripe en células cultivadas (por ejemplo para cultivar virus de la gripe en células MDCK cultivadas de acuerdo con el sexto aspecto) incluyen generalmente los pasos de inocular un cultivo de células con un inóculo de la cepa a ser cultivada, cultivar las células infectadas para un periodo de tiempo deseado para la propagación del virus, como por ejemplo como se determina por el título del virus o la expresión del antígeno (por ejemplo entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recoger el virus propagado. Las células cultivadas son inoculadas con un virus (medido por PFU o TCIP<sub>50</sub>) a la proporción celular de 1:500 a 1:1, preferiblemente de 1:100 a 1:5, más preferiblemente de 1:50 a 1:10. El virus se añade a una suspensión de las células o se aplica a una monocapa de las células, y el virus es absorbido en las células durante al menos 60 minutos pero habitualmente menos de 300 minutos, preferiblemente entre 90 y 240 minutos a de 25° C a 40° C, preferiblemente de 28° C a 37° C. El cultivo celular infectado (por ejemplo monocapas) puede ser retirado o por congelación-descongelación o por acción enzimática para aumentar el contenido vírico de los sobrenadantes del cultivo recolectados. Los fluidos recolectados son después o inactivados o almacenados congelados. Las células cultivadas pueden ser infectadas a una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de alrededor de 0,0001 a 10, preferiblemente de 0,002 a 5, más preferiblemente de 0,001 a 2. Todavía más preferiblemente, las células son recolectadas a una m.o.i. de alrededor de 0,01. Las células infectadas pueden ser recolectadas de 60 a 60 horas después de la infección. Preferiblemente, las células se recolectan de 34 a 48 horas después de la infección. Todavía más preferiblemente, las células se recolectan de 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (típicamente tripsina) se añaden generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación vírica, y las proteasas se pueden añadir en cualquier etapa adecuada durante el cultivo, por ejemplo antes de la inoculación, al mismo tiempo que la inoculación o después de la inoculación [39].

En las realizaciones preferidas, particularmente con células MDCK, una línea celular no se pasa de un banco de células de trabajo maestro más allá de 40 niveles de duplicación de la población.

El inóculo vírico y el cultivo vírico están preferiblemente libres de (es decir, se habrán probado para y habrán dado un resultado negativo de contaminación por) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus paragripe 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y/o parvovirus [40]. De manera similar, las líneas celulares MDCK preferidas usadas con el sexto aspecto están libres de (es decir, se habrán probado para y habrán dado un resultado negativo de infección por) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus paragripe 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y/o parvovirus. Se prefiere particularmente la ausencia del virus del herpes simple.

Una línea celular MDCK usada con la invención preferiblemente no contiene marcador para resistencia a G418 (véase la referencia 16). Así la línea celular puede ser sensible a tratamiento con G418.

La línea celular usada con la invención preferiblemente no contiene plásmidos exógenos (véase la referencia 16), excepto por cualquiera que se pueda requerir para técnicas genéticas inversas.

#### *Técnicas de genética inversa*

Como se ha mencionado anteriormente, la invención puede usarse directamente con aislados clínicos o aislados primarios. Además, sin embargo, la invención puede usarse con cepas reordenadas, incluyendo las generadas usando técnicas genéticas inversas [por ejemplo, 41-45]. Las técnicas de genética inversa pueden usar la manipulación *in vitro* de plásmidos para generar combinaciones de segmentos virales, para facilitar la manipulación de secuencias codificantes o no codificantes en los segmentos virales, para introducir mutaciones, etc. Las técnicas pueden usarse tanto para virus de la gripe A como la gripe B.

La genética inversa normalmente implica expresar (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN viral deseadas, por ejemplo, de promotores polI, promotores de ARN polimerasa bacteriana, promotores de polimerasa de bacteriófagos, etc. y (b) moléculas de ADN que codifican proteínas virales, por ejemplo, de promotores polII, de tal manera que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula lleva al ensamblaje de un virión infeccioso intacto completo. El ADN proporciona preferiblemente todo el ARN viral y las proteínas, pero también es posible usar un virus auxiliar para proporcionar algo del ARN y las proteínas. Se prefieren los métodos basados en plásmidos que usan plásmidos separados para producir cada ARN viral [46-48], y estos métodos también implicarán el uso de plásmidos para expresar todos o algunos (por ejemplo, solo proteínas PB1, PB2, PA y NP) de las proteínas virales, con 12 plásmidos usados en algunos métodos.

Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque reciente [49] combina una pluralidad de

casetes de transcripción de ARN polimerasa I (para síntesis de ARN viral) en el mismo plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos ARNV de la gripe A), y una pluralidad de regiones codificantes de proteínas con promotores de ARN polimerasa II en otro plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o las 8 transcripciones de ARNm de la gripe A). Los aspectos preferidos del método de la referencia 49 implican: (a) las regiones codificantes de ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos codificantes de ARNV en un solo plásmido. Incluir los segmentos NA y HA en un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido también puede facilitar las cosas.

Debido a la especificidad de especies de los promotores poll, el promotor poll canino [50] puede usarse cuando se realiza una genética inversa en células MDCK. Como una alternativa al uso de promotores de sondeo para codificar los segmentos de ARN viral, es posible usar promotores de bacteriófagos polimerasa [51]. Por ejemplo, pueden usarse convenientemente los promotores para las polimerasas SP6, T3 o T7. Debido a la especificidad de especies de los promotores de sondeo, los promotores de bacteriófagos polimerasa pueden ser más convenientes para muchos tipos de células (por ejemplo, MDCK), aunque una célula también debe transfectarse con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas, es posible usar promotores de poll y pollI duales para codificar simultáneamente los ARN virales y los ARNm expresables a partir de una única plantilla [52, 53].

Mientras que las cepas usadas para el crecimiento en huevos incluyen habitualmente seis segmentos de ARN de un virus de gripe A PR/8/34 (con segmentos de HA y N de una cepa de vacuna, es decir, una reclasificación 6:2), evitar los huevos con la invención significa que pueden omitirse los segmentos de PR/8/34. Los virus de la gripe A pueden incluir menos de 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4 o 5) segmentos virales de un virus de gripe PR/8/34. Por tanto, los virus preferidos son aquellos en los que por lo menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 no se deriva de PR/8/34. Un virus puede incluir un segmento NS que se originó en un virus de gripe aviar.

Cuando la invención usa genética inversa, permite que un segmento de ARN viral de un virus de la gripe de origen se transfiera al genoma de un virus de la gripe de destino. Estos dos virus tendrán, por tanto, por lo menos un segmento de ARN viral en común. El término "en común" significa aquí una copia idéntica del segmento completo, pero también puede extenderse para significar una copia modificada del segmento con modificaciones en las regiones codificantes y/o no codificantes. Cuando se realizan modificaciones en la región codificante, éstas no cambiarán sustancialmente la inmunogenicidad y/o actividad de la proteína codificada. Por tanto, un segmento HA puede manipularse alrededor del sitio de escisión de HA1/HA2 sin cambiar su capacidad para obtener anticuerpos anti-HA eficaces cuando se administra a un paciente. Por tanto, la genética inversa puede usarse para modificar la HA natural de un virus aislado de acuerdo con los métodos de la invención, por ejemplo, para eliminar determinantes (por ejemplo, regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión HA1/HA2) que hacen que un virus sea altamente patógeno en especies aviares.

#### *Preparación de la vacuna*

Actualmente hay disponibles varias formas de vacuna para el virus de la gripe (por ejemplo, ver los capítulos 17 y 18 de la referencia 54). Las vacunas se basan generalmente o en virus vivos o en virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden basarse en viriones completos, viriones "divididos" o en antígenos de superficie purificados. Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas. La invención puede usarse cuando se fabrica cualquiera de estos tipos de vacuna.

Los virus vivos incluyen el producto FLUMIST™ de MedImmune (virus vivo trivalente). La vacuna se prepara mediante un proceso que comprende cultivar el virus en un sustrato adecuado y luego purificar viriones de líquidos que contienen viriones. Por ejemplo, los fluidos pueden clarificarse mediante centrifugación, y estabilizarse con un tampón (por ejemplo, que contiene sacarosa, fosfato de potasio y glutamato monosódico).

Cuando se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender viriones completos, viriones divididos o antígenos de superficie purificados (incluyendo la hemaglutinina y, habitualmente, también la neuraminidasa). Los medios químicos para inactivar un virus incluyen el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído,  $\beta$ -propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxialquileo (C60), etilamina binaria, acetil etilenimina, o combinaciones de los mismos. Los métodos no químicos de inactivación viral son conocidos en la técnica, como por ejemplo, luz UV o radiación gamma.

Los viriones pueden recogerse de fluidos que contienen virus por varios métodos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar la centrifugación zonal usando una solución de gradiente de sacarosa lineal que incluye detergente para interrumpir los viriones. Los antígenos pueden purificarse, después de una dilución opcional, por diafiltración.

Los viriones divididos se obtienen tratando viriones purificados con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-*N*-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol

NP9, etc.) para producir preparaciones de subviriones, Incluyendo el proceso de división 'Tween-ether'. Los métodos para dividir los virus de la gripe son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ver las refs. 55-60, etc. La división del virus se lleva a cabo típicamente mediante la interrupción o fragmentación del virus completo, ya sea infeccioso o no infeccioso con una concentración disruptiva de un agente de división. La interrupción da como resultado una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, lo que altera la integridad del virus. Los agentes de división preferidos son surfactantes no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo, alquilglicosidos, alquiltioglicosidos, acil azúcares, sulfobetainas, betainas, polioxietilenealquiléteres, N,N-dialquil-Glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, NP9, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTABs (bromuros de cetil trimetil amonio), fosfato de tri-N-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los polioxietanoles de octil- o nonilfenoxi (por ejemplo, los surfactantes Triton como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietileno sorbitán (los surfactantes Tween), polioxietilen éteres, polioxietileno ésteres, etc. Un procedimiento de división útil usa los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y el formaldehído, y la división puede tener lugar durante la purificación inicial del virión (por ejemplo, en una solución de gradiente de densidad de sacarosa). Por tanto, un proceso de división puede implicar la clarificación del material que contiene el virión (para eliminar el material que no contiene virión), la concentración de los viriones recolectados (por ejemplo, usando un método de adsorción, como adsorción de  $\text{CaHPO}_4$ ), la separación de viriones completos de material no virión, la división de los viriones usando un agente de división en un paso de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de división como desoxicolato de sodio), y luego filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar materiales no deseados. Los viriones partidos pueden resuspenderse útilmente en solución de cloruro de sodio isotónica tamponada con fosfato de sodio. Los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas divididas.

Las vacunas de antígenos de superficie purificadas comprenden los antígenos de superficie de la gripe hemaglutinina y, típicamente, también la neuraminidasa. Los procesos para preparar estas proteínas en forma purificada son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™ son vacunas subunitarias.

Otra forma de antígeno de la gripe inactivado es el virosoma [61] (partículas liposomales similares a virus libres de ácido nucleico). Los virosomas se pueden preparar mediante la solubilización del virus de la gripe con un detergente, seguido por la eliminación de la nucleocápside y la reconstitución de la membrana que contiene las glicoproteínas virales. Un método alternativo para preparar virosomas implica añadir glicoproteínas de membrana virales en cantidades excesivas de fosfolípidos, para dar liposomas con proteínas virales en su membrana. La invención puede usarse para almacenar virosomas en masa, como en los productos INFLEXAL V™ e INVAVAC™.

El virus de la gripe puede estar atenuado. El virus de la gripe puede ser sensible a la temperatura. El virus de la gripe puede estar adaptado al frío. Estas tres características son particularmente útiles cuando se usa un virus vivo como un antígeno.

El HA es el inmunógeno principal en las vacunas de la gripe inactivadas actuales, y las dosis de la vacuna se estandarizan por referencia a los niveles de HA, típicamente medidos por SRID. Las vacunas existentes contienen típicamente 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 fraccionarias, como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅓ [81,82], ya que tienen dosis más altas (por ejemplo dosis de 3x o 9x [62,63]). Por tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, preferiblemente 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 particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. por cepa.

Para las vacunas vivas, la dosis se mide por medio de la dosis infecciosa de cultivo tisular mediana ( $\text{TCID}_{50}$ ) en lugar del contenido de HA, y es típico un  $\text{TCID}_{50}$  de entre  $10^6$  y  $10^8$  (preferiblemente entre  $10^{6,5}$  -  $10^{7,5}$ ) por cepa.

Las cepas usadas con la invención pueden tener un HA natural como el que se encuentra en un virus de tipo salvaje, o un HA modificado. Por ejemplo, se sabe que la modificación de HA para eliminar determinantes (por ejemplo, regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión HA1/HA2) hace que un virus sea altamente patógeno en especies aviares.

Las cepas del virus de la gripe para su uso en vacunas cambian de una estación a otra. En el actual período interpandémico, las vacunas incluyen típicamente dos cepas de gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de gripe B, y son típicas las vacunas trivalentes. La invención también puede usar cepas virales pandémicas (es decir, cepas a las que el receptor de la vacuna y la población humana en general son inmunológicamente vírgenes, en particular del virus de la gripe A), como las cepas de subtipo H2, H5, H7 o H9, y las vacunas de la gripe para cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden basarse en una vacuna trivalente normal complementada por una cepa pandémica. Sin embargo, dependiendo de la estación y la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, la

invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos NA de virus de la gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9.

Además de ser adecuadas para inmunizar contra cepas interpandémicas, las composiciones de la divulgación son particularmente útiles para inmunizar contra cepas pandémicas. Las características de una cepa de gripe que le dan el potencial de provocar un brote pandémico son: (a) contiene una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en las cepas humanas que circulan actualmente, es decir, una que no ha sido evidente en la población humana durante más de una década (por ejemplo, H2), o que no se ha visto en absoluto en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que generalmente se han encontrado solo en poblaciones de aves), de tal manera que la población humana será inmunológicamente virgen a la hemaglutinina de la cepa; (b) es capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana; y (c) es patógeno para los humanos. Se prefiere un virus con hemaglutinina tipo H5 para inmunizar contra la gripe pandémica, como una cepa H5N1. Otras posibles cepas incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y cualquier otra cepa potencialmente pandémica emergente. Dentro del subtipo H5, un virus puede caer en HA clade 1, HA clade 1', HA clade 2 o HA clade 3 [64], y los clades 1 y 3 son particularmente relevantes.

Otras cepas cuyos antígenos pueden incluirse útilmente en las composiciones son cepas que son resistentes a la terapia antiviral (por ejemplo, resistentes al oseltamivir [65] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [66].

Las composiciones de la divulgación pueden incluir por tanto antígenos de una o más cepas del virus de la gripe (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más), incluyendo el virus de la gripe A y/o el virus de la gripe B. Cuando una vacuna incluye más de una cepa de gripe, las diferentes cepas se cultivan por separado y se mezclan una vez que se han recogido los virus y se han preparado los antígenos. Por tanto, un proceso de la invención puede incluir el paso de mezclar antígenos de más de una cepa de gripe. Se prefiere una vacuna trivalente, que incluye los antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir antígeno de una sola cepa de la gripe A. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir antígeno de dos cepas de la gripe A, siempre que estas dos cepas no sean H1N1 y H3N2. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir antígeno de más de dos cepas de la gripe A.

La divulgación proporciona un proceso para preparar un antígeno del virus de la gripe para su uso en una vacuna, que comprende los pasos de: (i) recibir un virus de la gripe; (ii) infectar una línea celular con este virus de gripe; y (iii) cultivar las células infectadas del paso (ii) para producir el virus de la gripe. El virus obtenido en el paso (iii) puede usarse para preparar vacunas, por ejemplo, mediante métodos que implican inactivación, formulación, etc. El virus de la gripe recibido en el paso (i) tendrá una o más de las siguientes características: (a) nunca se ha propagado en un sustrato de huevo; (b) se aisló en una célula MDCK, como una célula MDCK 33016 y/o una célula MDCK cultivada en medio libre de suero; (c) nunca se ha propagado sobre un sustrato cultivado en un medio que contiene suero; (d) se generó utilizando técnicas de genética inversa; (e) es un virus de la gripe A con menos de 6 segmentos virales de un virus de gripe PR/8/34 y/o menos de 6 segmentos virales de un virus de gripe AA/6/60 o es un virus de gripe B con menos de 6 segmentos virales de un virus de gripe AA/1/66; (f) incluye hemaglutinina con una preferencia de unión para oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,6)Gal en comparación con oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,3) Gal; y/o (g) tiene glicoproteínas (incluyendo la hemaglutinina) con un patrón de glicosilación diferente de los virus derivados de huevo. Por tanto, el virus de la gripe recibido en el paso (i) puede haberse obtenido como se describe en otra parte en la presente.

#### **ADN de la célula huésped**

Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces es una práctica estándar minimizar la cantidad de ADN de línea celular residual en la vacuna final, para minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN.

Por lo tanto, una composición de vacuna preparada de acuerdo con la invención contiene preferiblemente menos de 10 g (preferiblemente menos de 1 ng, y más preferiblemente menos de 100 pg) de ADN de célula huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades traza de ADN de la célula huésped.

Se prefieren las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por 15  $\mu$ g de hemaglutinina, ya que son las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por 0,25 ml de volumen. Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por 50  $\mu$ g de hemaglutinina son las más preferidas, ya que son las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por 0,5 ml de volumen.

Se prefiere que la longitud media de cualquier ADN de la célula huésped residual sea menor que 500 pb, por ejemplo, menor que 400 pb, menor que 300 pb, menor que 200 pb, menor que 100 pb, etc.

El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación estándar, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación del ADN de la célula huésped residual puede mejorarse mediante el tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando una DNasa. Un método conveniente para reducir la contaminación del ADN de la célula huésped se divulga en las referencias 67 y 68, que implican un tratamiento de dos pasos, primero usando una DNasa (por ejemplo, Benzonasa), que se puede usar durante el crecimiento viral, y luego un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede ser usado durante la interrupción del virión. El tratamiento con un agente alquilante, como la  $\beta$ -propiolactona, también puede usarse para eliminar el ADN de la célula huésped, y ventajosamente también puede usarse para inactivar los viriones [69].

La medición del ADN de la célula huésped residual es ahora un requisito regulatorio rutinario para los productos biológicos y se encuentra dentro de las capacidades normales del experto en la técnica. El ensayo usado para medir el ADN será típicamente un ensayo validado [70,71]. Las características de rendimiento de un ensayo validado pueden describirse en términos matemáticos y cuantificables, y se habrán identificado sus posibles fuentes de error. El ensayo generalmente se habrá probado para características como exactitud, precisión, especificidad. Una vez que se ha calibrado un ensayo (por ejemplo, frente a cantidades estándar conocidas de ADN de la célula huésped) y analizado, se pueden realizar mediciones cuantitativas de ADN de forma rutinaria. Se pueden usar tres técnicas principales para la cuantificación de ADN: métodos de hibridación, como transferencias Southern o transferencias de ranura [72]; métodos de inmunoensayo, como el sistema Threshold™ [73]; y PCR cuantitativa [74]. Estos métodos son todos familiares para los expertos en la técnica, aunque las características precisas de cada método pueden depender de la célula huésped en cuestión, por ejemplo, la elección de las sondas para la hibridación, la elección de los cebadores y/o las sondas para la amplificación, etc. El sistema Threshold™ de Molecular Devices es un ensayo cuantitativo para los niveles de picogramas del ADN total, y se ha usado para monitorizar los niveles de ADN contaminante en productos biofarmacéuticos [73]. Un ensayo típico implica la formación no específica de secuencias de un complejo de reacción entre una proteína de unión a ADNmc biotinilada, un anticuerpo anti-ADNmc conjugado con ureasa y ADN. Todos los componentes del ensayo están incluidos en el kit de análisis de ADN completo disponible del fabricante. Varios fabricantes comerciales ofrecen ensayos cuantitativos de PCR para detectar ADN de células huésped residuales, por ejemplo, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, etc. Una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema de ADN Threshold para medir la contaminación de ADN de una célula huésped de una vacuna viral se puede encontrar en la referencia 75.

### **Composiciones farmacéuticas**

Las composiciones de vacuna fabricadas de acuerdo con la invención son farmacéuticamente aceptables. Por lo general, incluyen componentes además de los antígenos de la gripe, por ejemplo, típicamente incluyen uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticos. También pueden incluirse adyuvantes. Una exposición detallada de tales componentes está disponible en la referencia 76.

Las composiciones de vacuna estarán generalmente en forma acuosa.

Las composiciones de vacunas pueden incluir conservantes como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna esté sustancialmente libre de material mercurial (es decir, menos de 5  $\mu\text{g/ml}$ ), por ejemplo, libre de tiomersal [59,77]. Las vacunas que no contienen mercurio son las más preferidas. El succinato de  $\alpha$ -tocoferol puede incluirse como una alternativa a los compuestos mercuriales [59]. Se prefieren particularmente las vacunas sin conservantes.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/l. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, dihidrato de fosfato de disodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Las composiciones de vacuna tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferiblemente estarán dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. Se ha informado anteriormente que la osmolalidad no tiene un impacto en el dolor provocado por la vacunación [78], pero se prefiere mantener la osmolalidad en este intervalo.

Las composiciones de vacunas pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón de citrato. Los tampones normalmente se incluirán en el intervalo de 5-20 mM.

El pH de una composición de vacuna estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más típicamente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Por lo tanto, un proceso de la invención puede incluir un paso de ajuste del pH de la vacuna a granel antes del envasado.

La composición de vacuna es preferiblemente estéril. La composición de vacuna es preferiblemente no pirogénica, por ejemplo conteniendo <1 EU (unidad de endotoxinas, una medida estándar) por dosis, y preferiblemente <0,1 EU por dosis. La composición de la vacuna está preferiblemente libre de gluten.

Las composiciones de la vacuna pueden incluir detergente, por ejemplo, un surfactante de éster de polioxietilen sorbitan (conocido como 'Tweens'), un octoxinol (como el octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetil trimetil amonio ('CTAB'), o desoxicolato de sodio, particularmente para una vacuna de antígeno dividida o de superficie. El detergente puede estar presente solo en cantidades de traza. Por lo tanto, la vacuna puede incluir menos de 1 mg/ml de cada uno de octoxinol-10 y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades de traza podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

Una composición de vacuna puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit "multidosis"). La inclusión de un conservante se prefiere en disposiciones multidosis. Como alternativa (o además) a incluir un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la eliminación del material.

Las vacunas de la gripe se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse una dosis media (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a niños.

Las composiciones y los kits se almacenan preferiblemente a entre 2° C y 8° C. No deben congelarse. Idealmente, deben mantenerse fuera de la luz directa.

#### **Envasado de composiciones de vacunas**

Los recipientes adecuados para las composiciones de la presente divulgación (o componentes del kit) incluyen viales, jeringuillas (por ejemplo, jeringuillas desechables), aerosoles nasales, etc. Estos recipientes deben ser estériles.

Cuando una composición/componente está localizado en un vial, el vial está hecho preferiblemente de un material de vidrio o plástico. El vial se esteriliza preferiblemente antes de que se le añada la composición. Para evitar problemas con los pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferiblemente con un tapón sin látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de embalaje. El vial puede incluir una dosis individual de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un vial 'multidosis'), por ejemplo, 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

Un vial puede tener un tapón (por ejemplo, un bloqueo Luer) adaptado de tal manera que se pueda insertar una jeringuilla precargada en el tapón, el contenido de la jeringuilla puede ser expulsado hacia el vial (por ejemplo, para reconstituir material liofilizado en la misma), y el contenido del vial se puede retirar de nuevo en la jeringuilla. Después de retirar la jeringuilla del vial, se puede conectar una aguja y se puede administrar la composición a un paciente. El tapón está localizado preferiblemente dentro de un sello o cubierta, de modo que la junta o cubierta debe retirarse antes de poder acceder al tapón. Un vial puede tener un tapón que permita la eliminación aséptica de su contenido, en particular para los viales multidosis.

Cuando se envasa un componente en una jeringuilla, la jeringuilla puede tener una aguja unida a ella. Si no se coloca una aguja, se puede suministrar una aguja aparte con la jeringuilla para su montaje y uso. Tal aguja puede estar revestida. Se prefieren agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 1 pulgada calibre 23, 1 pulgada calibre 25 y 5/8 de pulgada calibre 25. Para facilitar el mantenimiento de registros, se pueden proporcionar jeringas con etiquetas desprendibles en las que se pueden imprimir el número de lote, la temporada de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos. El émbolo en la jeringuilla tiene preferiblemente un tapón para evitar que el émbolo se retire accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener un tapón de goma de látex y/o émbolo. Las jeringuillas desechables contienen una única dosis de vacuna. La jeringuilla generalmente tendrá un tapón de la punta para sellar la punta antes de colocar una aguja, y el tapón de la punta está hecho preferiblemente de una goma de butilo. Si la jeringuilla y la aguja se envasan por separado, la aguja se equipará entonces preferiblemente con un protector de goma de butilo. Las jeringuillas preferidas son aquellas comercializadas con el nombre comercial "Tip-Lok"™.

Los contenedores pueden estar marcados para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo, para facilitar la administración a los niños. Por ejemplo, una jeringuilla que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestre un volumen de 0,25 ml.

Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringuilla o un vial), entonces se prefiere usar un recipiente hecho de vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

Un kit o composición se puede envasar (por ejemplo, en la misma caja) con un folleto que incluya detalles

de la vacuna, por ejemplo, instrucciones para la administración, detalles de los antígenos dentro de la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, por ejemplo, para mantener una solución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica después de la vacunación, etc.

## 5 *Métodos de tratamiento, y administración de la vacuna*

La divulgación también proporciona una vacuna fabricada de acuerdo con la invención.

10 Las composiciones de vacuna fabricadas de acuerdo con la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y la invención proporciona un método para generar una respuesta inmune en un paciente, que comprende el paso de administrar una composición de la invención al paciente.

Una composición de la divulgación puede ser para su uso como un medicamento.

15 La divulgación también proporciona el uso de un antígeno del virus de la gripe preparado de acuerdo con la invención, en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un paciente.

20 La respuesta inmune provocada por estos métodos y usos generalmente incluirá una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los métodos para evaluar las respuestas de anticuerpos, la capacidad de neutralización y la protección después de la vacunación contra el virus de la gripe son bien conocidos en la técnica. Los estudios en humanos han demostrado que los títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe humana se correlacionan con la protección (un título de hemaglutinación-inhibición de la muestra de suero de aproximadamente 30-40 proporciona una protección de aproximadamente el 50% contra la infección por un virus homólogo) [185]. Las respuestas de los anticuerpos se miden típicamente por  
25 inhibición de la hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (SRID) y/o por hemólisis radial individual (SRH). Estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

30 Las composiciones de la divulgación pueden administrarse de varias maneras. La vía de inmunización más preferida es la inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o la pierna), pero otras vías disponibles incluyen la inyección subcutánea, intranasal [186-188], oral [189], intradérmica [190,191], transcutánea, transdérmica [192], etc.

35 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Las vacunas contra la gripe se recomiendan actualmente para su uso en inmunización pediátrica y en adultos, a partir de los 6 meses. Por tanto, el paciente puede tener menos de 1 año, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o al menos 55 años. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥50 años, ≥60 años, y preferiblemente ≥65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≤5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, servicio militar y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeficientes, pacientes que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un compuesto de oseltamivir o zanamivir; ver a continuación) en los 7 días anteriores a recibir la vacuna, las personas con alergias al huevo y las  
40 personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos y se pueden usar de manera más general en una población. Para las cepas pandémicas, se prefiere la administración a todos los grupos de edad.

45 Las composiciones preferidas de la divulgación satisfacen 1, 2 o 3 de los criterios de CPMP para la eficacia. En adultos (18-60 años), estos criterios son: (1) ≥70% de seroprotección; (2) ≥40% de seroconversión; y/o (3) un aumento de GMT de ≥2,5 veces. En ancianos (> 60 años), estos criterios son: (1) ≥60% de seroprotección; (2) ≥30% de seroconversión; y/o (3) un aumento de GMT de ≥2 veces. Estos criterios se basan en estudios abiertos con al menos 50 pacientes.

50 El tratamiento puede ser por un programa de dosis individual o un programa de dosis múltiple. Se pueden usar dosis múltiples en un programa de inmunización primario y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un esquema de dosis múltiple, las varias dosis pueden administrarse por la misma vía o por diferentes vías, por ejemplo, un cebado parenteral y un refuerzo mucosal, un cebado mucosal y un refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente vírgenes, por ejemplo, para personas que no han recibido nunca una vacuna contra la gripe, o para vacunarse  
55 contra un nuevo subtipo de HA (como en un brote pandémico). Las dosis múltiples normalmente se administrarán con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

60 Las vacunas producidas por la invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional del cuidado de la salud o centro de vacunación) otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna contra el MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna contra el MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra  
65

la tosferina, una vacuna contra el DTP, una vacuna conjugada contra el virus de la gripe tipo B, una vacuna contra el poliovirus inactivado, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna contra el meningococo conjugado (como la vacuna tetravalente AC-W135-Y), una vacuna contra el virus respiratorio sincitial, una vacuna contra el neumococo conjugado, etc. La administración sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna neumocócica y/o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes ancianos.

De manera similar, las vacunas pueden administrarse a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional del cuidado de la salud) un compuesto antiviral, y en particular un compuesto antiviral activo contra el virus de la gripe (por ejemplo, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de la neuraminidasa, como el ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluyendo ésteres de los mismos (por ejemplo, los ésteres etílicos) y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de fosfato). Un antiviral preferido es el ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), también conocido como oseltamivir fosfato (TAMIFLU™).

### General

El término "comprende" abarca "incluye" así como "consiste", por ejemplo una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X+Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "alrededor de" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo  $x \pm 10\%$ .

A menos que se indique lo contrario, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere cualquier orden específico de mezclado. Así los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando haya tres componentes, entonces dos componentes pueden ser combinados entre sí, y después la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

Donde se usan materiales animales (y particularmente bovino) en el cultivo de células, deberían ser obtenidos de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs), y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). En general, se prefieren cultivos celulares en ausencia total de materiales derivados de animales.

Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición entonces ese compuesto puede ser reemplazado alternativamente por un profármaco adecuado.

### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el esquema de asilamiento del virus de la gripe de especímenes clínicos.

La Figura 2 compara títulos de HA de 9 muestras víricas aisladas en células MDCK-33016. En cada muestra, la barra de la izquierda es en el paso 2 y la barra de la derecha es en el paso 5.

La Figura 3 compara títulos de HA de 10 muestras de virus de la gripe cultivados en tres tipos de células MDCK diferentes. Para cada muestra, las tres barras con: izquierda, 33016 en suspensión; medio 33016 adherente; y derecha, células CCL-34 MDCK.

La Figura 4 muestra el enlace de tres virus con lectinas SNA o MAA. La Figura 4A muestra el enlace de un aislado original, la Figura 4B muestra el enlace después del cultivo en células MDCK 33016, y la 4C muestra el enlace después del cultivo en huevos.

Las Figuras 5 y 6 muestran el enlace de virus con 3-SL o 6-SLN. en ambas Figuras hay seis grupos de columnas: las tres de más a la izquierda muestran el enlace con 3-SL a diferentes concentraciones (1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ ) y las tres de más a la derecha muestran el enlace con 6-SLN a diferentes concentraciones (0.25  $\mu\text{M}$ , 0.125  $\mu\text{M}$ , 0.0625  $\mu\text{M}$ ). Dentro de cada uno de los seis grupos cada columna muestra un virus diferente. En la Figura 5, las tres columnas son, de izquierda a derecha: (i) un virus aislado de células; (ii) un virus aislado de huevos; y (iii) un virus aviar. En la Figura 6, las cuatro columnas son, de izquierda a derecha: (i) virus después de dos pasos en huevos; (ii) virus después de dos pasos en MDCK; (iii) virus después de cinco pasos en huevos; (iv) virus después de cinco pasos en MDCK.



**MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION*****Aislamiento de virus de muestras de pacientes***

Se obtuvieron especímenes clínicos (hisopos nasales y de garganta) que contenían subtipos del virus de la gripe A y/o B de niños y adultos durante la estación de la gripe del hemisferio norte 2006-2007. Se comparó la susceptibilidad y confiabilidad de la línea celular MDCK 33016 (DSM ACC 2219) cultivada en cultivo en suspensión libre de suero con la línea celular MDCK CCL 34 establecida (ATCC) y con huevos de gallina, por determinación de títulos de hemaglutinina (HA), reacción en cadena de polimerasa (PCR) y titulación de virus. Se identificaron 248 muestras positivas de gripe por reacción en cadena de polimerasa (PCR) diagnóstica. La susceptibilidad y confiabilidad de la replicación y aislamiento de virus de la gripe se evaluó en la línea celular MDCK 33016 y en huevos de gallina por (i) títulos de hemaglutinina (HA); (ii) reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real para la medición de la carga vírica; y (iii) titulación de virus. La precisión de la replicación en las células se evaluó por secuenciación del gen de Ha en los especímenes clínicos originales y también en aislados del segundo paso en células MDCK y huevos de gallina. Los títulos de los virus obtenidos de aislados cultivados en células MDCK 3306 en suspensión se compararon con los de las células MDCK 33016 adheridas en placas.

Los resultados indicaron que la capacidad de aislamiento de la línea celular en suspensión MDCK 33016 es superior a la línea celular MDCK CCL establecida, y mucho mayor que la de los huevos de gallina. Después del paso de muestras de virus en células MDCK 33016, las sustituciones de aminoácidos se identificaron en no aislados. Por el contrario, casi todos los virus pasados por huevos contenían una o más sustituciones de aminoácidos, predominantemente en el gen de HA1. Las mutaciones en el sitio de enlace de anticuerpos del gen de HA, observado después del paso en huevos, puede resultar en modificaciones a la antigenicidad de los virus de la gripe.

El 55% de las muestras clínicas obtenidas de pacientes con enfermedad respiratoria aguda, se identificaron como positivos para la gripe, con los siguientes tipos víricos: 79% A/H3N2; 12.5% A/H1N1; 1.6% B, 0.4% H3/B y 6.5% no tipificable. El aislamiento vírico de especímenes clínicos fue posible usando células MDCK 33016 (Figura 1). Por el contrario, de los virus inyectados en huevos de especímenes clínicos, ninguno se aisló satisfactoriamente. Se consiguieron resultados negativos similares con fibroblastos de embrión de pollo (CEF) recién preparados. El aislamiento y establecimiento de virus de la gripe en huevos pudo conseguirse solamente usando sobrenadantes de cultivos de MDCK 33016 con un título HA positivo.

La primera recolección de cada célula fue inoculada adicionalmente en huevos, con propósitos de referencia. El número de aislamientos de virus con éxito, usando cada enfoque, se muestra en las cajas de la Figura 1, con el número de diferentes tipos virales inyectados también mostrados. Los tres subtipos de virus aislados de células MDCK 33016, ganaron HA razonable ( $>32$ ) y título de virus ( $>1 \times 10^6$ ) después del segundo paso en huevos, con ambos títulos aumentando con pasos adicionales (Figura 2).

Las células MDCK 33016 cultivadas en suspensión fueron superiores a la línea celular adherente (CCL-34) para el aislamiento de virus de la gripe de hisopos clínicos para los tres subtipos. La línea celular en suspensión mostró una sensibilidad más alta para material de hisopo de la gripe positivo como se demuestra por la tasa de recuperación (tabla 1). Las secuencias de Ha se compararon entre diferentes pasos en células MDCK 33016 y huevos con el aislado original (Tabla 2), y no se encontraron mutaciones para las cepas de la gripe A aisladas en células MDCK 33016 incluso después de 5 pasos, mientras que las cepas de la gripe A aisladas en huevos mostraron mutaciones en el sitio de enlace de anticuerpos de la proteína HA después de 2 pasos. No se encontraron mutaciones para las cepas de la gripe B aisladas en células MDCK 33016 o huevos.

Se encontraron altos rendimientos de virus, o al menos un nivel de registro, después de la replicación de aislados en células MDCK 33016 en suspensión en comparación con las células MDCK 33016 adheridas (Figura 3).

Por lo tanto la línea celular en suspensión MDCK 33016 es un sistema ideal para el aislamiento y replicación de cepas de la gripe del tipo salvaje, ya que ofrece una mayor capacidad de aislamiento en comparación con huevos de gallina. Además, debido a la alta precisión de replicación, el uso de aislados basados en células para la producción de una vacuna contra la gripe humana puede llevar a una vacuna más auténtica. El emparejamiento mejorado entre las cepas del tipo salvaje circulantes y las contenidas en la vacuna debería ofrecer mayor protección contra la gripe para la vacuna.

En conclusión: (a) todas las cepas de virus fueron aisladas con éxito en células MDCK 33016 en comparación con huevos; (b) las cepas de virus aisladas de células MDCK pudieron ser propagadas con éxito en huevos; (c) la tasa de recuperación de los tres subtipos de virus de la gripe es superior en células MDCK 33016 cultivadas en suspensión, cuando se comparan con las células adherentes; y (d) las sustituciones del gen de HA, cuando se coparan con las del material original, no estaban presentes en ninguno de los aislados cultivados en células MDCK 33016 pero estaban presentes después del segundo paso en huevos. Por lo tanto la línea celular en suspensión MDCK 33016 es un sustrato muy adecuado para el aislamiento y propagación de subtipos de virus de la gripe humana ya que es muy fiable para el paso de virus de la gripe de tipo salvaje de aislados clínicos y conserva un carácter auténtico de los virus de tipo salvaje.

*Enlace de receptores*

Se investigaron las preferencias de receptores de los virus aislados originales, de virus cultivados en huevos y de virus cultivados en MDCK. Los estudios usaron lectinas con ligamientos 2,3-sialil (MAA) o ligamientos 2,6 sialil (SNA) o 2,3-sialilactosa (3-SL, un análogo del receptor de huevo) y 2,6-sialil-N-acetilactosamina (6-SLN, un análogo del receptor humano) sialilglicopolímeros [193].

La Figura 4 muestra los resultados de un estudio representativo. Los picos etiquetados muestran el enlace con las lectinas SNA o MAA. El virus original (4A) y el virus cultivado en MDCK 33016 (4B) tienen picos distintos para SNA y MAA, mientras que los picos SNA y MAA se superponen sustancialmente para virus cultivados en huevos (4C).

También se examinó la especificidad de enlace en experimentos adicionales usando 3-SL y 6-SLN. Un resultado de ejemplo se muestra en la Figura 5. El enlace en la izquierda del gráfico indica una preferencia por el receptor aviar, mientras que el enlace en la derecha indica una preferencia por el receptor humano. Como se ve en la Figura 5, el virus aislado de células favorece fuertemente los receptores humanos.

La Figura 6 muestra datos usando un aislado de Stuttgart (A/H1N1) después de 2 ó 5 pasos en huevos o en MDCK 33016 cultivado en suspensión. Los virus pasados por MDCK muestran una fuerte preferencia por 6-SLN.

En conclusión, todos los virus A y B humanos clínicos cultivados en MDCK enlazan con 6-SLN en lugar de con 3-SL, excepto que se descubrió que algunos aislados no enlazan con nada en este ensayo. A diferencia de los aislados clínicos originales, los virus adaptados de huevos enlazan o con 3-SL o con ninguno de 3-SL o 6-SLN.

*Cambios debidos al cultivo en huevos*

Se aislaron varias cepas de virus de la gripe A y B en células MDCK y se pasaron hasta 5 veces a través de uno de los siguientes sustratos: huevos,; células MDCK CCL-34, células MDCK 33016; células Vero; o células HEK 293-T. El gen de HA de los virus se secuenció después de cada paso y se midieron los títulos de HA.

Aunque la secuencia de HA para algunas cepas (por ejemplo A/H1N1/Bayern/7/95) era estable durante el paso a través de los huevos y a través de las MDCK 33016, para otras no lo era. Por ejemplo, la secuencia de HA de A/H1N1/Nordrhein Westfalen/1/05 adquirió una mutación D203N en el sitio de enlace de anticuerpos D después de 2 pasos a través de huevos, y después de 2 pasos más adquirió adicionalmente una R329K. Por el contrario, la secuencia no se alteró en virus pasados en paralelo a través de MDCK 33016.

Para esta cepa A/H1N1/NRW/1/05, no se observó crecimiento cuando se cultivó con células Vero. Los otros cuatro sustratos pudieron soportar su crecimiento, pero los títulos de HA variaron. Por ejemplo, los títulos de 32-256 se observaron en huevos, pero las células 293-T dieron títulos más bajos (16-32) y las MDCK 33016 dieron títulos más altos (32-152).

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y se pueden hacer modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito de la invención.

**TABLA 1: Tasa de recuperación después del primer paso de muestras positivas para gripe en líneas celulares MDCK 33016 y ATCC (CCL-34)**

Tasa de recuperación n (%) de acuerdo con la cepa viral					
	Total n=248	A/H1N1	A/H3N2	B	No tipificable
	(%)	(n=31)	(n=196)	(n=4)	(n=16)
33016	178(72)	26 (83.9)	150 (76.5)	4 (100)	9 (56.3)
CCL-34	156(63)	23 (74.2)	135 (68.9)	2 (50)	4 (25.0)

\* 1 infectada doble (H3/B) que podría ser aislada en ambas líneas celulares MDCK

**TABLA 2: Comparación de secuencias de hemaglutinina después de 2 ó 5 pasos en células MDCK 33016-PF o huevos con el aislado original**

	Aislado (serotipo)	Paso (huésped)	Comparación con el material original (nucleótido)	Comparación con el material original (aminoácido)
5	295 (H1N1)	P2 (MDCK) P2 (huevo)	0* 1*	0* D203N*
10	124 (H3N2)	P2 (MDCK) P5 (MDCK) P2 (huevo)	0 0 1	0 0 L210P
15	128 (H3N2)	P2 (MDCK) P5 (MDCK) P2 (huevo)	0 0 3	0 0 L210P
20	146 (H3N2)	P2 (MDCK) P5 (MDCK) P2 (huevo)	0 0 1	0 0 L210P
25	171 (H3N2)	P2 (MDCK) P5 (MDCK) P2 (huevo)	0 0 1	0 0 H199L
30	215 (B)	P5 (MDCK) P2 (huevo)	0** 0**	0** 0**
	419032(B)	P5 (MDCK) P2 (huevo)	0 0	0 0

0 = Sin mutación detectable  
 \* para aislado original sólo estaba disponible la secuencia Ha1  
 \*\* comparación con el aislado P2 (MDCK 33016)

**REFERENCIAS**

- [1] Gerdil (2003) Vaccine 21:1776-9.
- [2] Palese (2006) Emerging Infectious Diseases 12:61-65.
- [3] de Oña et al. (1995) J Clin Microbiol 33:1948-49.
- [4] Monto et al. (1981) J Clin Microbiol 13(1): 233-235.
- [5] Govorkova et al. (1995) J Infect Dis. 172(1):250-3.
- [6] Tobita et al. (1975) Med Microbiol Immunol (Berl). 162(1):9-14 y 23-27.
- [7] Ollier et al. (2004) J Clin Microbiol 42(12):5861-5.
- [8] Schepetiuk & Kok (1993) J Virol Methods 42(2-3):241-50.
- [9] WHO (2003) Weekly epidemiological record 78:73-80
- [10] Patente US 6,344,354. See also WO97/38094.
- [11] Patente US 5,162,112
- [12] Medema et al. (2004) Virus Res. 103(1-2):9-15.
- [13] Robertson et al. (1995) Vaccine 13:1583-8.
- [14] Merten et al. (1996) Advances in Experimental Biology 397:141-151.
- [15] Govorkova et al. (1996) J. Virol., 70:5519-24.
- [16] Mastrosovich et al. (2003) J Virol 77:8418-25.
- [17] Gambaryan & Matrosovich (1992) J Virol Methods 39(1-2):111-23.
- [18] Mastrosovich et al. (1999) J Virol 73: 1146-55.
- [19] Stevens et al. (2006) J Mol Biol 355:1143-55.
- [20] Couceiro & Baum (1994) Mem Inst Oswaldo Cruz 89(4):587-91.
- [21] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.
- [22] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.
- [23] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.
- [24] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.
- [25] <http://www.atcc.org/>
- [26] <http://locus.umdj.edu/>
- [27] WO03/076601.
- [28] WO2005/042728.
- [29] WO03/043415.
- [30] WO97/37000.
- [31] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.

5 [32] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.  
 [33] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.  
 [34] WO03/023021  
 [35] WO03/023025  
 [36] EP-A-1260581 (WO01/64846).  
 [37] WO2006/071563.  
 [38] WO2005/113758.  
 [39] WO97/37001.  
 [40] WO2006/027698.  
 10 [41] Hoffmann et al. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.  
 [42] Subbarao et al. (2003) *Virology* 305:192-200.  
 [43] Liu et al. (2003) *Virology* 314:580-590.  
 [44] Ozaki et al. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.  
 [45] Webby et al. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.  
 15 [46] WO00/60050.  
 [47] WO01/04333.  
 [48] Patente US 6649372.  
 [49] Neumann et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.  
 [50] WO2007/002008.  
 20 [51] WO2006/067211.  
 [52] WO01/83794.  
 [53] Hoffmann et al. (2000) *Virology* 267(2):310-7.  
 [54] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.  
 [55] WO02/28422.  
 25 [56] WO02/067983.  
 [57] WO02/074336.  
 [58] WO01/21151.  
 [59] WO02/097072.  
 [60] WO2005/113756.  
 30 [61] Huckriede et al. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.  
 [62] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.  
 [63] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.  
 [64] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.  
 [65] Herlocher et al. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.  
 35 [66] Le et al. (2005) *Nature* 437(7062):1108.  
 [67] EP-B-0870508.  
 [68] US 5948410.  
 [69] WO2007/052163.  
 [70] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.  
 40 [71] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mayo 2001.  
 [72] Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.  
 [73] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12.  
 45 [74] Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80.  
 [75] Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.  
 [76] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.  
 [77] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.  
 [78] Nony et al. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.  
 50 [185] Potter & Oxford (1979) *BrMed Bull* 35: 69-75.  
 [186] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.  
 [187] Zurbriggen et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.  
 [188] Piascik (2003) *J am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.  
 [189] Mann et al. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.  
 55 [190] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.  
 [191] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.  
 [192] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.  
 [193] Gambaryan et al. (1997) *Virology* 232:345-50.

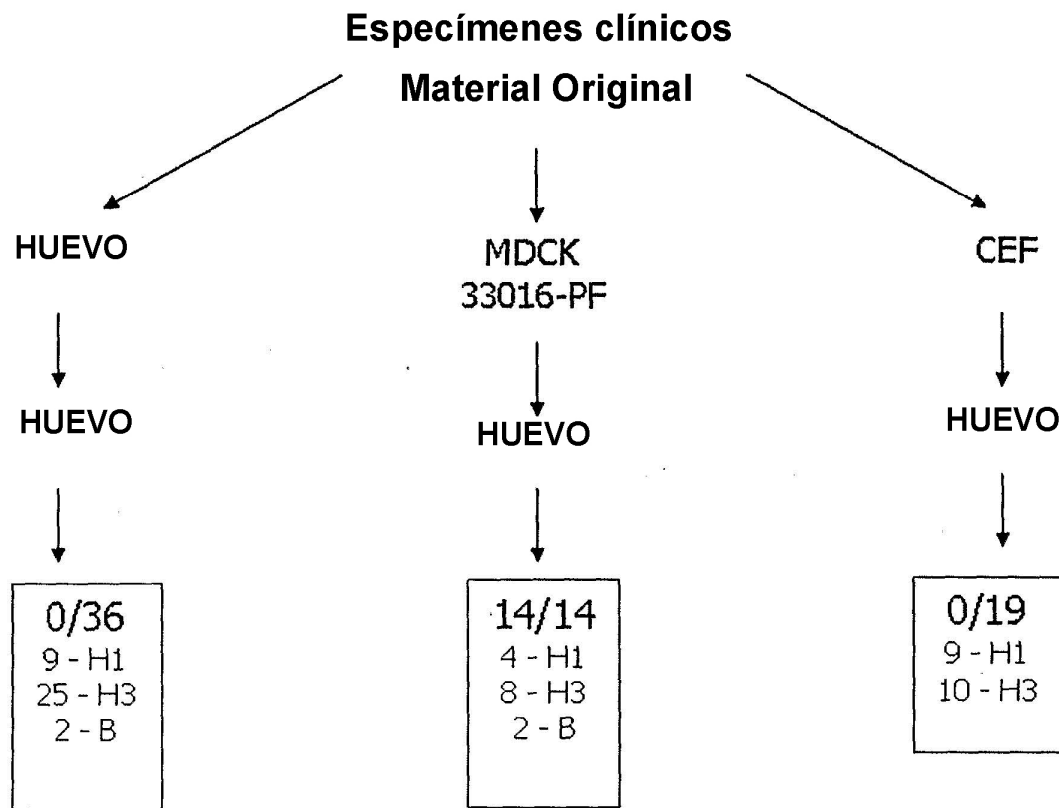
60

65

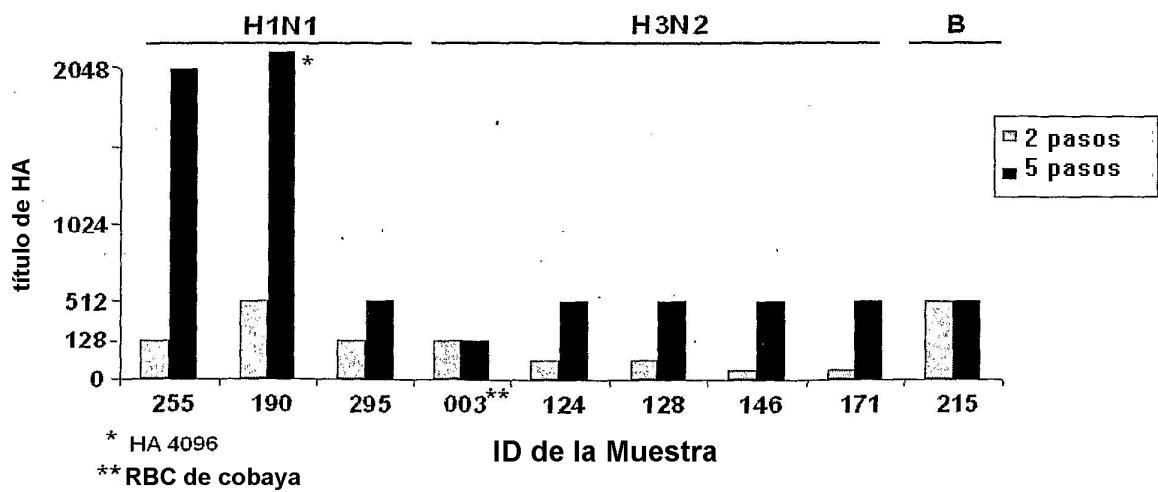
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aislar un virus de la gripe de una muestra de un paciente, que comprende un paso en el que la muestra de paciente se incuba con células MDCK, que crecen en un cultivo en suspensión libre de suero.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las células MDCK están creciendo en un cultivo en suspensión libre de proteínas.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las células MDCK no son tumorigénicas.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que las células MDCK son células MDCK 33016.
- 15 5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que después del aislamiento, el virus se pasa y/o crece en células que no son MDCK o en huevos, o en otro sustrato.
- 20 6. Un proceso para preparar un virus de siembra de la gripe para la fabricación de vacunas, que comprende los pasos de: (i) aislar un virus de la gripe de una muestra de un paciente de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para producir una célula MDCK infectada; (ii) el pase del virus de la célula infectada obtenido en el paso (i) al menos una vez; (iii) cultivar la célula infectada en el paso (ii) para producir virus de la gripe para usarlo como virus de siembra y (iv) purificar el virus de la gripe producido en el paso (iii) para proporcionar un virus de siembra.
- 25 7. Un proceso para preparar un virus de siembra de la gripe para la fabricación de vacunas, que comprende los pasos de: (i) aislar un virus de la gripe de una muestra de un paciente de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para producir una célula MDCK infectada; (ii) preparar un ADNc de por lo menos un segmento de ARN viral de un virus de la gripe producido por la célula infectada obtenida en el paso (i), y usar el ADNc en un procedimiento de genética inversa para preparar un nuevo virus de la gripe con al menos un segmento de ARN viral en común con el virus de la gripe del paso (i); (iii) infectar una línea celular con el nuevo virus de la gripe, y luego cultivar la línea celular para producir el nuevo virus de la gripe para usarlo como un virus de siembra, y
- 30 (iv) purificar el nuevo virus de la gripe producido en el paso (iii) para proporcionar un virus de siembra.
- 35 8. Un proceso para preparar un antígeno del virus de la gripe para su uso en una vacuna, que comprende los pasos de: (i) aislar un virus de la gripe de una muestra de un paciente de acuerdo con el método de la reivindicación 4; (ii) infectar una línea celular con este virus de gripe; (iii) cultivar las células infectadas del paso (ii) para producir el virus de la gripe, y (iv) preparar un antígeno del virus de la gripe para su uso en una vacuna del virus obtenido en el paso (iii).
- 40 9. El proceso de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el virus de siembra se usa para preparar lotes de siembra de trabajo.
- 45 10. Un proceso para fabricar una vacuna que comprende antígenos de hemaglutinina (HA) de 2, 3, 4 o más cepas del virus de la gripe, en las que las cepas son el virus de la gripe A y/o el virus de la gripe B, y el proceso comprende los pasos de:
  - (i) preparar un virus de siembra de la gripe de acuerdo con el proceso de la reivindicación 6 o la reivindicación 7,
  - (ii) infectar una línea celular para el crecimiento con el virus de siembra de la gripe para proporcionar virus de la gripe para la fabricación de vacunas,
  - (iii) inactivar los virus de la gripe proporcionados por la línea celular, y
  - 50 (iv) preparar antígenos HA a partir de los virus de la gripe inactivados.
- 55 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la cepa de virus de la gripe que se aísla de la muestra del paciente se selecciona de una cepa de gripe A H1N1 o H3N2 o una cepa de gripe B.
- 60 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el virus de la gripe que se aísla de la muestra del paciente incluye hemaglutinina con una preferencia de unión para oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,6)Gal en comparación con oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,3)Gal.
- 65 13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el virus de la gripe que se produce incluye hemaglutinina con una preferencia de unión para oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,6)Gal en comparación con oligosacáridos con un disacárido terminal Sia( $\alpha$ 2,3)Gal.

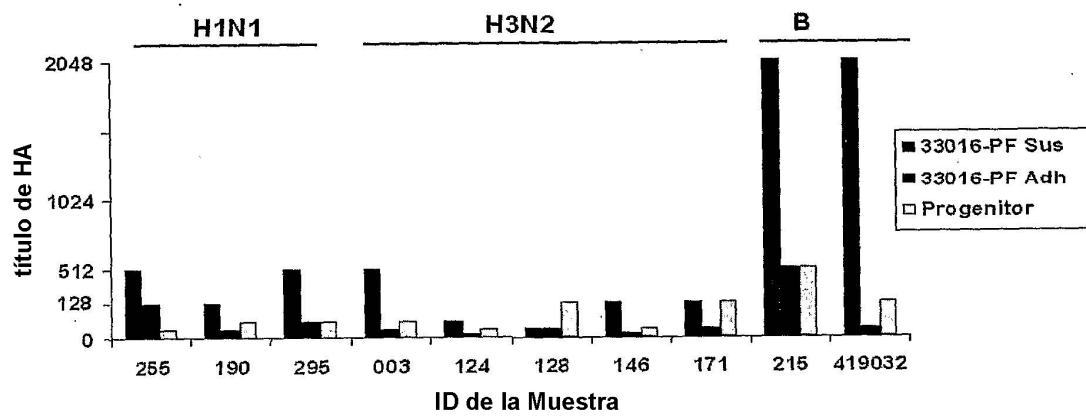
**Figura 1**



**Figura 2**

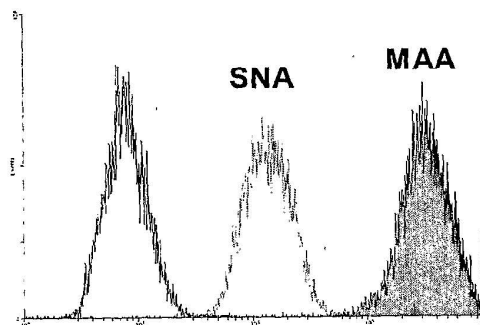


**Figura 3**

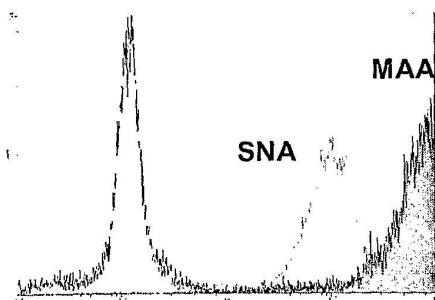


**Figura 4**

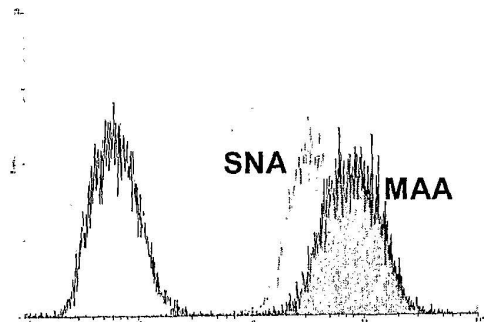
**Figura 4A**



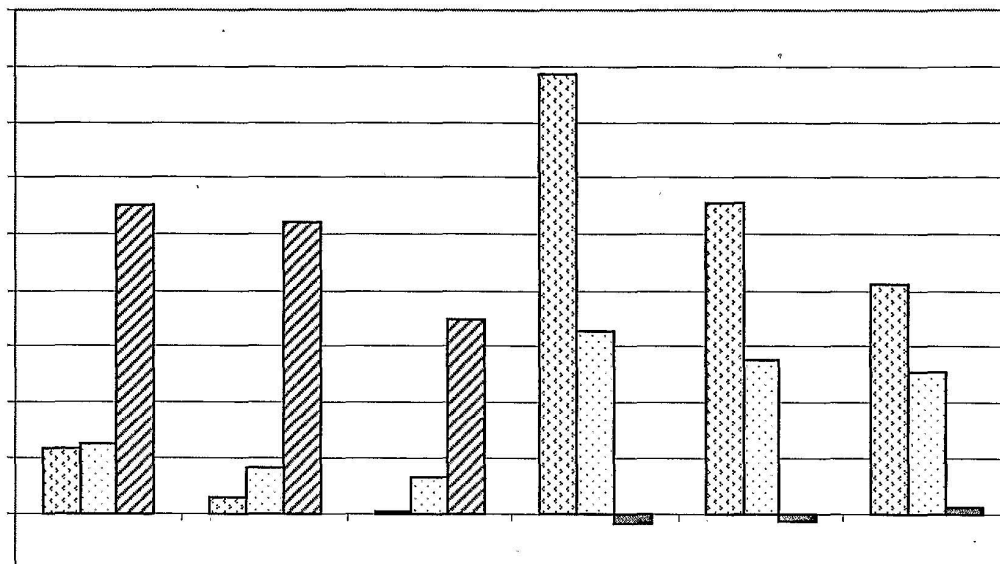
**Figura 4B**



**Figura 4C**



*Figura 5*



*Figura 6*

