

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-99780

54. TÍTULO LÍNEA CELULAR VERO ADAPTADA
PARA CRECER EN SUSPENSIÓN

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE ZELLTEK S.A

DOMICILIO SANTA FE, ARGENTINA

74. APODERADO JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

22. BOGOTÁ, D. C.,

PETI: 51

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-096780- (0000-0000)
Fes: 2005-10-09 16:53:10 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 2 PATENTES
Ere: 1 REGDEPOSTO
Act411 PRESENTACION F0002: 57

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

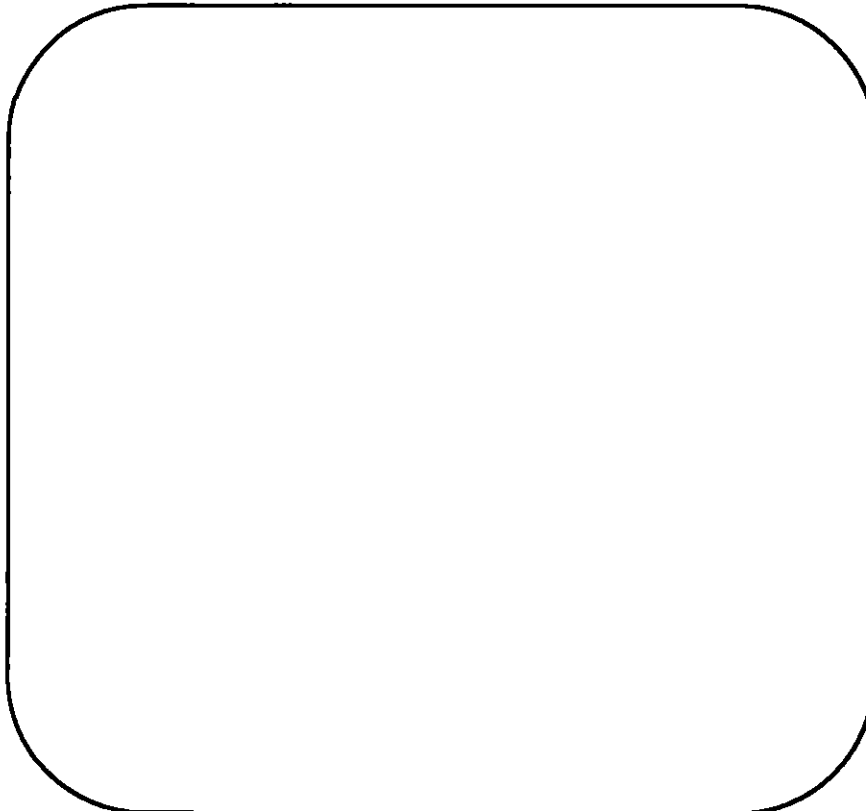
1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ZELLTEK S.A. Dirección: Lizandro de la Torre 3124 - Dpto 2, 3000 Santa Fe SANTA FE, ARGENTINA Nacionalidad o domicilio: ARGENTINA Lugar de Constitución:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual: _____ Número: _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____		
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS Dirección: Avenida 22 No. 37 - 31 OF. 202 Teléfono: 2444098 Fax: 2442486 E-mail: _____		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual: _____ Número: 19.270.955 TP 43.308 C.S.J. Bogotá
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: MARCELO GUSTAVO DAELLI C.C. Dirección: Lizandro de la Torre 3124 - Dpto 2, 3000 Santa Fe, SANTA FE, ARGENTINA Teléfono: _____ Fax: _____ Nacionalidad o Domicilio: ARGENTINO		
5 Título (84) <u>LINEA CELULAR VERO ADAPTADA PARA CRECER EN SUSPENSIÓN</u> <i>Ver folio 59.</i>			
6 Clasificación Internacional (81) <u>B12N 5/00</u>			
7 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen US	(32) Fecha 04-10-2005	(31) Número de Solicitud 00723377
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los: 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐			
9 Comprobante de pago No. _____ Fecha: _____			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.			

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Certificado de la fecha de presentación de la solicitud prioridad, expedida por la autoridad correspondiente y una copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☒ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Resumen
- ☒ Descripción de la invención.
- ☒ Una o más reivindicaciones.
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12X12 y 6X8 cm.
- ☐ De ser el caso, información de otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas total o parcialmente con la invención de esta solicitud.

1 FIGURA CARACTERISTICA



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

FIRMA:

C.C. No. 19.270.955 Bogotá

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 50,924
FECHA : JULIO 6 DE 2006

3
Este recibo debe ser utilizado
Únicamente para trámites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.
M. Delgado Echeverry e Hijos Ltda.
Expediente: 201/TEK S.A.

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
MARIO DELGADO ECHEVERRY	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55612948	06/07/2006	12,182,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098760-00000-0000
Fec: 2006-10-03 16:58:10 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 2 PATENTES
Eje: 1 REGDEPOSITO
Agl: 11 PRESENTACION Folio: 57

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Este recibo debe ser utilizado
únicamente para tramites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.
Dpto 2ELTER S.A.
Expediente:

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 50,931
FECHA : JULIO 6 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MARIO DELGADO ECHEVERRY	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55612948	06/07/2006	12,182,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	130,000.00
		TOTAL :	\$ 130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.:

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-089780- 00000-0000
Fec: 2006-10-03 16:56:10 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 2 PATENTES
Ere: 1 REGDEPOSITO
Asi 411 PRESENTACION Folios: 67

VERO CELL LINE ADAPTED TO GROW IN SUSPENSION

ABSTRACT

The invention relates to a Vero cell line that can be grown in serum-free and protein-free culture and in suspension culture in the absence of supporting materials for its adherence, and to production of viral vaccines using said cell line. More particularly, the present invention relates to establishment of a cell line that can be grown in suspension culture without need of the cells to be adhered to any supporting material. Furthermore, the present invention provides a process to obtain said Vero cell line and a process for producing viral vaccines with said cell line. The present invention further relates to virus obtainable by said process and vaccines formulated by said virus.

DESCRIPTION

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The invention resides in a Vero cell line that can be grown in protein-free culture and in suspension culture without a carrier, and to production of viral vaccines using said cell line. More particularly, the present invention relates to establishment of a cell line that can be grown without using fetal calf serum (FCS) and that can be grown in suspension culture without need of the cells to be adhered to any carrier, and a process for producing viral vaccines with said cell line. The

present invention further relates to virus obtainable by said process and vaccines formulated by said virus.

BACKGROUND OF THE INVENTION

For production of viral vaccines chicken eggs, mouse brains, primary cells or established cell lines are used in order to propagate the virus (Principles of Virology. Molecular Biology, pathogenesis and control, 2001). These conventional techniques have several problems:

- 1) The use of chicken eggs requires management of chicken breeding, management of fertilized eggs to be adjusted to a vaccine production schedule, and laborious procedures including extensive purification for completely removing components derived from egg proteins (Tree et al., 2001).
- 2) Cell lines; in general require the addition of fetal calf serum as a cell growth factor. Therefore, there is an associated risk of contamination with infection agents and prions and high-quality FCS is very expensive, a fact that adds a considerable cost to the vaccine.
- 3) Among established cell lines where various kinds of viruses can be propagated, Vero cells (African Green Monkey Kidney Epithelial Cells) are widely used for production of high quality vaccines for humans and animals (Butler et al., 2000; Franzzati-Gallina et al., 2001; US Patent N° 4,664,912; Montagnon, 1989; Montagnon et al., 1981). Furthermore, Vero cells are the only recommended cells to prepare viruses for vaccine production by reverse genetics in the document: "WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics". 2005.6, page 3. However, Vero cells have a tendency to adhere to surfaces. Thus, the use of Vero cells for large-scale cultures is, due to the need of reactors with very large surface or to the need of introduction of cell-carriers in the culture, extremely costly.

Serum is often used for the propagation of mammalian cell lines. However, when mammalian cells are used for the production of recombinant proteins or virus production, there is increasing pressure to remove serum from the manufacturing process. Some of the driving reasons to implement serum-free cell-culture technology are the expense of serum, variation between serum lots and serum quality, regulatory concerns regarding biological agents in serum and the burden of removing serum proteins in downstream processing. There is also a recognized need, for reasons of reduced cost and process scale up, for use of cell lines adapted to grow in suspension. There is an urgent need for more economic processes for quality vaccine production at a low-cost to make them available worldwide.

Many developments have been accomplished to obtain Vero cell lines in suspension to obtain a virus for vaccine manufacturing (US 4,664,912; US 4,525,349; US 5,719,051; Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Frazzati-Gallina NM. J Biotechnol. 2001 Dec 14;92(1):67-72; among other publications referred to and incorporated herein by this reference). However, these documents describe the use of carriers and microcarriers to obtain suspensions of anchorage-dependent Vero cell lines.

In the state of the art, it has never been reported a Vero cell line to obtain a virus for vaccine manufacturing, adapted to growing in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence (carriers or microcarriers), adapted to growth in a culture medium free of fetal calf serum, and capable of growing also in a protein-free medium. On the other hand, there are references to Vero cell lines which may grow in suspensions forming cell aggregates ("The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media". Cytotechnology. 1992;10(2):169-74. Litwin J.). Litwin described a method to grow Vero cells in suspension as cell aggregates in serum free media. However, cell aggregates are difficult to infect with viruses and therefore are not adequate for vaccine production (US patent 2005153419-A). There are no

reports of Vero cells that may grow as individual cells without forming aggregates in high density cultured.

In order to obviate the disadvantages of the prior art as stated above, this invention has now established a novel Vero cell line which can be grown without FCS, without protein and in suspension comprising isolated cells in the absence of cell aggregates. This cell line can be use in large scale production of vaccines in normal fermentation vessels in the absence of supporting materials for its adherence (without the need of any kind of cell carrier or microcarrier in the culture). The individual cells suspensions have known advantages over the aggregates suspension, for those skilled in the art, for example improves of efficiency in virus production systems that involve high density reactors. The present invention also established a process for producing a viral vaccine culturing Vero cells in suspension without FCS and then infecting the cells with the virus to be use in the vaccine production. The vaccine so produced is of low cost and high safety profile

SUMMARY OF THE INVENTION

The Vero cell line, subject matter of the present invention, useful for the production of viruses for vaccine formulation, is adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and in a culture free of fetal calf serum. Furthermore, this cell line is adapted to grow in a protein-free culture. This cell line also is adapted to grow in a suspension as isolated cells, in the absence of cell aggregates. Specifically, this cell line is deposited with the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) under the name of sVero p66 and whose name assigned by the International Deposit Authority is DSM ACC2791.

The procedure for obtaining said Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and in a culture free of fetal calf serum and free of proteins, another subject matter of this invention, comprises the following steps:

- a. adapting an anchorage-depending Vero cell line, preferably the Vero E6 cell line (passage 26, Banco Argentino de Células), to a culture with a low content of fetal calf serum by a gradual adjustment of the culture from a high concentration of fetal calf serum of about 7 to approximately 15% to a culture of low concentration of fetal calf serum of about 0 to approximately 3%, preferably about 2%,
- b. applying the Vero cell line obtained in the previous step "a." to a culture in suspension of the same culture medium of low concentration fetal calf serum of about 0 to about 3%, preferably 2%, for a time sufficient enough, at least 30 days, for said cell line to grown in suspension in the absence of supporting materials for its adherence; and
- c. adapting said cell line obtained in step "b" to grow in a medium free of fetal calf serum and free of protein.

In another preferred embodiment of this invention, it is disclosed a procedure to obtain a virus for vaccine formulation, another purpose of this invention, comprising the following steps:

- a. growing a Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and, preferably, in the absence of proteins, to a concentration of up to between about 1×10^5 and about 30×10^6 cells per ml of culture medium,

- b. infecting the cell line of step "a" with said virus with an multiplicity of infection (m.o.i.) between about 0.001 and about 10, and
- c. collecting the virus produced during the infection, preferably by centrifugation.

In preferred embodiments of this invention, said virus is selected from the group consisting of the human immunodeficiency virus, such as HIV-1 and HIV-2; polio virus; hepatitis A virus, human coxsackie virus; rhinovirus; echovirus; equine encephalitis virus; rubella virus, dengue viruses, encephalitis virus, yellow fever virus, coronavirus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, ebola virus, parainfluenza virus, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus, influenza virus, Hantaan virus, bunga virus, hemorrhagic fever virus, reovirus, rotavirus, parvoviruses, papilloma virus, polyoma virus, adenovirus, herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, varicella zoster virus, cytomegalovirus (CMV), smallpox virus, vaccinia virus, pox viruses, African swine fever virus and the unclassified agent of delta hepatitis, and the agents of non-A, non-B hepatitis. Preferably said virus is selected from the group consisting of polio virus, rabies virus, yellow fever virus, hepatitis A virus and influenza virus.

In other preferred embodiments of this invention, the viruses are the viruses and viral antigens, also subject matter of the present invention, that can be obtained by the procedure previously described herein.

Subject matter of this invention are also the vaccines formulated with the viruses that can be obtained by the procedure disclosed in this invention.

DESCRIPTION OF THE DRAWING

FIG. 1 shows growth of Vero E6 AGS according to the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The Vero cell line, subject matter of the present invention, useful for the production of viruses for vaccine formulation, is adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and in a culture free of fetal calf serum. Furthermore, this cell line is adapted to grow in a protein-free culture. This cell line also is adapted to grow in a suspension as isolated cells, in the absence of cell aggregates. Specifically, this cell line is deposited with the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) under the name of sVero p66 and whose name assigned by the International Deposit Authority is DSM ACC2791.

The procedure for obtaining said Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and in a culture free of fetal calf serum and free of proteins comprises the following steps:

- a. Adapting an anchorage-dependent Vero cell line, preferably the Vero E6 cell line (passage 26, Banco Argentino de Células), to a culture with a low content of fetal calf serum by a gradual adjustment of the culture from a high concentration of fetal calf serum of about 7 to approximately 15% to a culture of low concentration of fetal calf serum of about 0 to approximately 3%, preferably about 2%.
- b. Applying the Vero cell line obtained in the previous step "a." to a culture in suspension of the same culture medium of low concentration fetal calf serum of about 0 to about 3%, preferably 2%, for a time sufficient enough, at least 30 days, for said cell line to grown in suspension in the absence of supporting materials for its adherence. That is achieved with an abrupt passage of the cells from T-flasks to spinner flasks, without any carrier, and gradually replacing remaining serum supplementation by serum free media containing proteins and growth factors. During the initial

phase of suspension culture adaptation the cells tend to form aggregates of 2-30 cells, especially at cell densities higher than 1×10^6 cells/ml.

c. Adapting said cell line obtained in step "b" to grow in a medium free of fetal calf serum and free of protein. After several passages, and replacing step "b" medium by serum free and protein free media, no cell clumping is observed, and Vero E6 is considered adapted to grow in suspension culture in protein free media, and that cellular clone is denominated "Vero E6 AGS". Vero E6 AGS cells have been shown to maintain an average doubling time of 24 hours in continuous growth cultures over a period of at least one month and have retained the susceptibility to be infected by several viruses.

Additionally, there was not difference in the cellular response (as measured by viability and doubling time) to growth in medium with low concentrations of proteins and growth factors and growth in medium with no proteins (protein free media).

The Vero E6 AGS cell line has been deposited with the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) under the name sVero p66 and whose number, assigned by the International Deposit Authority, is DSM ACC2791.

Suspension Culture and Infection

Cells are maintained in suspension in 30 to 1,000 ml cultures in 50 to 1,500 ml glass spinner flasks (Technic, UK) agitated at 50-80 rpm in a 5% CO₂ incubator at 33-37.degree. C.

During cell maintenance, cultures are kept in exponential phase by diluting cells approximately every second day in order to maintain cell densities between 1×10^5 cells/ml and 12×10^5 cells/ml. For infection experiments, exponentially growing cells are centrifuged and resuspended in fresh culture media at a cell density of 1×10^6 cells/ml.

Infection is initiated by adding concentrated viruses to the cultures at a multiplicity of infection (M.O.I.) of 0.001 to 10. A 500-1,500 μ l cell suspension aliquot is transferred in sterile tubes at different times post infection. The different aliquots were stored at -80.degree.C. for further analyses. Viral particles are recovered from the frozen total-suspension samples by 3 freeze-thaw cycles.

According to the present invention cells grow individually in suspension and are well infected by different virus producing a good yield of the antigenic viral particles adequate for vaccine production.

The viruses that may be produced by application of the present invention are selected from the group consisting of the human immunodeficiency virus, such as HIV-1 and HIV-2; polio virus; hepatitis A virus, human coxsackie virus; rhinovirus; echovirus; equine encephalitis virus; rubella virus, dengue viruses, encephalitis virus, yellow fever virus, coronavirus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, ebola virus, parainfluenza virus, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus, influenza virus, Hantaan virus, bunga virus, hemorrhagic fever virus, reovirus, rotavirus, parvoviruses, papilloma virus, polyoma virus, adenovirus, herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, varicella zoster virus, cytomegalovirus (CMV), smallpox virus, vaccinia virus, pox viruses, African swine fever virus and the unclassified agent of delta hepatitis, and the agents of non-A, non-B hepatitis. Preferably the polio virus, the rabies virus, the yellow fever virus, hepatitis A virus and the influenza virus.

The viruses that can be obtained according to the present invention are useful for vaccine formulation using methods known by those skilled in the art of vaccine formulation. Said viruses or the viral antigens are concentrated and purified using methods known in the art such as centrifugation and chromatography. The vaccines that can be obtain by the present invention comprise said viruses or viral antigens, at least one diluent and, optionally, adjuvants, excipients

and chemotherapeutic agents known in the art. If necessary, said viruses will undergo an attenuation or inactivation process.

The present invention will now be described in more details through the following application examples showing preferred forms to practice this invention. However, said examples are provided for illustration purposes only, to better understand the present invention, and do not intend to limit the scope of the present invention.

EXAMPLE 1

More specifically, the Vero cell line of the present invention was prepared using the following procedures:

Vero cells from the line Vero E6 (passage 26, Banco Argentino de Células) were used as the starting material. Cells were cultured in a monolayer in a 25 cm.sup.2 culture flask containing MEM (GIBCO BRL, USA) medium supplemented with 10% FCS. Incubation was at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After sufficient expansion of the cells, the cells were then cultured in the above medium containing 20% serum-free medium and subcultured upon confirming no abnormality in cells. After subculture and sufficient expansion of the cells, the culture medium was replaced with medium containing 40% serum-free medium and sub-cultured upon confirming no abnormality in cells. The procedure was repeated until the content of serum-free medium was 80% (2% FCS). At this point cells were trypsinated and inoculated (2.5.times.10.sup.5 cells/ml) in a spinner flask (Techne, UK) containing the same medium. Agitation was at 50 rpm and incubation was at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were transfer to fresh medium according to the evolution of the pH of the culture. After 90 days of the initiation of the adaptation procedure, cells were seeded in a medium containing half a volume of MEM supplemented with 0.2% FCS and half a volume of ExCell™ 302 CHO serum-free (JRH Biosciences, USA) medium

supplemented with 2 mM glutamine. Duplication period in this medium was about 24 hs and viability 98-100% a week after transfer. Cells were grouped in clusters of less than ten cells when the cell concentration was superior to 1.5×10^6 cells/ml. At this point, the half volume of MEM was replaced with the protein free SMIF-6 medium (GIBCO BRL, USA). After this, the proportion of ExCell™ 302 CHO serum-free medium was diminished and 120 days after the initiation of the adaptation procedure, Vero cells (Vero E6) were growing in suspension in 100% protein free SMIF-6 medium. These cells were named "Vero E6 AGS" for Vero E6 adapted to grow in suspension as isolated cells without cells aggregates, without carriers.

For storage, Vero E6 AGS cells in exponential growth period were centrifuge at 1000 rpm and the cell pellet suspended in a solution containing 45% SMIF-6 conditioned medium, 45% fresh SMIF-6 medium and 10% dimethylsulfoxide (DMSO). This cell suspension was fractionated in cryotubes containing 1ml of the suspension each and freeze in steps: 1h at 4°C, 1h at -20°C in nitrogen atmosphere and finally in liquid nitrogen at -196°C.

EXAMPLE 2

Susceptibility of Vero E6 AGS cells to viral infection

The susceptibility of Vero E6 AGS cells to viral infection was assayed using the vesicular stomatitis virus (VSV, Indiana strain: ATCC VR-1238). Titration of the virus was performed using Vero E6 cells (passage 31). For this, 4.0×10^4 cells were seeded in each well of a 96 wells titration plate (GREINER, GERMANY). After 3 hs of incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, cells were infected with different amounts of a viral suspension. After 24 hs viral titer was estimated as the maximal viral dilution with capacity to produce cytopathic in 100% of the cells.

For virus production, 3.2.times.10.sup.5 Vero E6 AGS cells were seeded in a spinner flask containing SMIF-6 medium and infected with 0.01 cytopathic units/ml of the viral suspension.

Table 1 shows that after 48 hours all the cells have been killed by the virus. Viral titer in the supernatant was 1 cytopathic unit/ml. This result indicates that in average Vero E6 AGS cells are able to amplify 100 times the seeded virus in the conditions here given as an example.

TABLE 1

Time after infection (hs)	% of viable cells	Viral titer (cytopathic units/ml)
0	97	0.0001
24	37	ND
48	0	0.01

EXAMPLE 3

The relationship between cell density and viral production was studied using the Vero E6 AGS cell line and the VSV virus. For this, Vero E6 AGS were grown in suspension until density 0.75.times.10.sup.6 or 5.00.times.10.sup.6 cells/ml and infected with VSV virus at a multiplicity of infection (M.O.I.) of 0.1.

Culture medium: SMIF 6

Additives: FCS 2%

Culture condition: 37°C, 5% CO2

Rotation of spinner: 50 rpm

Cellular density at the beginning of culture: about 1.times.10.sup.5 cells/ml

Virus: VSV

MOI: 0.1

Samples were taken 20 hs after infection and viral titer was measured in accordance with a plaque counting method.

The sample dilution that produces cytopathic effect in 50% of the inoculated cultures, contains 1 Tissue Culture Infection Dose 50% (TCID₅₀). The determination of this value was in accordance with the Reed-Muench procedure (Reed and Muench, 1938).

Table.2 shows that the viral titers rose in an approximately proportional form to the cell density.

TABLE.2

Cell Density (cells/ml)	Viral Titer (TCID50/ml)	Viral Titer/ Cell Density (TCID50/cell)
0.75.times.10.sup.6	4.64.times.10.sup.8	618
2.44.times.10.sup.6	3.16.times.10.sup.9	1295

EXAMPLE 4

Vero E6 AGS was used to propagate Herpes Simplex (HSV):

Culture conditions were as follows:

Cellular density at infection: 2.0.times.10.sup.5

MOI: 0.002

Culture scale: 100 ml spinner flask

Culture medium: SMIF 6 and SMIF 6 / FCS 2%

Rotation of spinner: 50 rpm

Culture conditions: 37°C, 5%CO2

Duration of culture: 2 days

Table.3. shows that the HSV virus, a DNA virus, was produced using Vero E6 AGS in suspension in the absence of microcarriers and in a protein-free culture medium. It was observed a suspension of isolated individual cells without cell aggregates. It is also observed that the viral titration is slightly higher in the experiment conducted in the absence of FCS.

TABLE.3

Culture medium	HSV titer (TCID50/ml)
SMIF 6	5.88.times.10.sup.8
SMIF 6 + FCS (2%)	4.64 .times.10.sup.8

EXAMPLE 5

Vero E6 AGS was used to propagate Poliovirus (OPV type I Sabin strain).

Culture conditions were as follows:

Cellular density at infection: 3.0×10^5

MOI: 1

Culture scale: 100 ml spinner flask

Culture medium: SMIF 6 and SMIF 6 / FCS 2%

Rotation of spinner: 50 rpm

Culture conditions: 34°C, 5%CO₂

Duration of culture: 1 day

Table.4 shows that the Polio virus (OPV type I Sabin strain), a RNA virus, was produced using Vero E6 AGS in suspension in the absence of microcarriers and in a protein-free culture medium. It was observed a suspension of isolated individual cells without cell aggregates. It is also observed that the viral titration is slightly higher in the experiment conducted in the absence of FCS.

TABLE.4

Culture medium	OPV titer (TCID50/ml)
SMIF 6	2.5.times.10.sup.8
SMIF 6 + FCS (2%)	1.8.times.10.sup.8



References

Patent documents

1. US 4,664,912 Wiktor et al. May, 1987
2. US 6,825,036; Makizumi, et al. September 3, 2002
3. US 6,656,719; Gould , et al.; October 21, 1998
4. US 6,656,720; Groner. et al.; Jul. 12, 2002
5. US 6,146,873; Kistner, et al. October 15, 1997
6. US 6,008,036; Fanget, et al.; May 22, 1998
7. US 5,824,536; Webster, et al.; June 17, 1996
8. US 5,719,051; Mundt, et al.; December 13, 1994
9. US 4,783,407; Provost, et al.; September 30, 1985
10. US 4,664,912; Wiktor, et al.; October 1, 1984
11. BR 0002694; Gallina Neuza Frazatti; June 19, 2000
12. US 4,525,349; Montagnon, et al.; December 29, 1981
13. US 20050019928; Rasty, Siyamak; et al. August 17, 2004
14. US 20040137013; Katinger, Hermann; et al.; October 3, 2003
15. US 20010001709; Lau, Allan S.; December 13, 2000
16. US 20050153419; Liu, Zhong; et al. July 14, 2005

Papers

1. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Frazatti-Gallina NM, et al. Vaccine. 2004 Dec 9;23(4):511-7.R

2. Rabies virus production in high Vero cell density cultures on macroporous microcarriers. Yokomizo AY. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Mar 5;85(5):506-15.
3. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. Trabelsi K J *Biotechnol*. 2006 Jan 24;121(2):261-71.
4. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. Choi Y. *Vaccine*. 2003 May 16;21(17-18):1867-73.
5. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. Liu CC, *Vaccine*. 2006 Aug 2.
6. Immunogenicity and protective efficacy in monkeys of purified inactivated Vero-cell SARS vaccine. Qin E, *Vaccine*. 2006 Feb 13;24(7):1028-34.
7. The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media. Litwin J. *Cytotechnology*. 1992;10(2):169-74.
8. Studies on the efficiency of measles virus antigen production using Vero cell culture in a microcarrier system. Mendonca RZ. *Braz J Med Biol Res*. 1994 Jul;27(7):1575-87.
9. Preparation and evaluation of Vero-cell infectious bursal disease vaccine in Pakistan. Rasool MH, Hussain I. *Vaccine*. 2006 Apr 5;24(15):2810-4.
10. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. Putnak R. *J Infect Dis*. 1996 Dec;174(6):1176-84.
11. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. Promising results. Montagnon B. *Dev Biol Stand*. 1983;55:37-42.
12. A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor. Sun MB. *World J Gastroenterol*. 2004 Sep 1;10(17):2571-3.
13. Development of a novel influenza vaccine derived from a continuous cell line. Kistner O. *ALTEX*. 2001;18(1):50-4.

14. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. Merten OW. *Adv Exp Med Biol.* 1996;397:141-51.
15. Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. Kistner O. *Dev Biol Stand.* 1999;98:101-10.
16. Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures. Merten OW. *Dev Biol Stand.* 1999;98:23-37.
17. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Frazzati-Gallina NM. *J Biotechnol.* 2001 Dec 14;92(1):67-72.
18. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. Srivastava AK. *Vaccine.* 2001 Aug 14;19(31):4557-65.
19. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. Kistner O. *Vaccine.* 1998 May-Jun;16(9-10):960-8.
20. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. Montagnon BJ. *Rev Infect Dis.* 1984 May-Jun;6 Suppl 2:S341-4.
21. Application of a serum-free medium for the growth of Vero cells and the production of reovirus. Butler M. *Biotechnol Prog.* 2000 Sep-Oct;16(5):854-8.
22. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. Y Choi. *Vaccine,* May 16, 2003; 21(17-18): 1867-73.
23. Cell aggregate suspension culture for large-scale production of biomolecules. Tolbert WR, Hitt MM, Feder J. *In Vitro.* 1980 Jun;16(6):486-90.
24. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. Genari SC. *Cell Biol Int.* 1998;22(4):285-94.
25. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Neuza M. Frazatti-Gallina. *Vaccine* Volume 23, Issue 4 , 9 December 2004, Pages 511-517.

26. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers.
Neuza M. Frazzati-Gallina. *Journal of Biotechnology* Volume 92, Issue 1 , 15 November 2001, Pages 67-72.
27. Protein-free culture of Vero cells: a substrate for replication of human pathogenic viruses. Jindrich Cinatl, Jr. *Cell Biology International* Volume 17, Issue 9 , September 1993, Pages 885-896.
28. Butler, M; Burgener, A.; Patrick. M; Berry, D.; Moffatt, D.; Huzel, N.; Bernabé, N. And Coombs, K. (2000). Application of a serum-free medium for the growth of Vero Cells and production of reovirus. *Biotechnol. Progr.*, 16, 854-858.
29. Frazzati-Gallina, N.M.; Paoli, R.L.; Mourao-Fuches, R.M.; Jorge, S.A.C and Pereira, C.A. (2001). Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *J. Biotechnol.*, 92, 67-72.
30. Montagnon, B.J. ; Fanget, B. ; Nicolas, A.J. (1981). Large scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Dev. Biol. Stand.*, 47, 55-64.
31. Montagnon, B.J. (1989) Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. *Dev. Biol. Stand.*, 70, 27-47.
32. Tree, J.A.; Richardson, C., Fooks, A.R.; Clegg, J.C.; Looby, D. (2001) Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine*, 19, 3441-3450
33. Reed, L.J., Muench, H. (1938), A simple method of estimating fifty percent end points. *J. Hyg.*, 27, 493-497.

CLAIMS

What is claimed is:

- 1. A Vero cell line wherein the cell line is adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and in a culture medium free of fetal calf serum .**
- 2. The cell line of Claim 1 wherein the cell line is adapted to grow in a protein-free culture medium.**
- 3. The cell line of Claim 1 wherein said suspensions comprises isolated cells in the absence of cell aggregates.**
- 4. The cell line of Claim 1 wherein said line is the line deposited with the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) under the name sVero p66 and whose name assigned by the International Deposit Authority is DSM ACC2791.**
- 5. The cell line of Claim 1 wherein said line is useful for virus production for vaccine formulation**

6. A procedure to obtain a Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and in a culture medium free of fetal calf serum and free of protein, wherein the procedure comprises the steps of:
 - a. adapting an anchorage-dependent Vero cell line to a culture medium of low concentration of fetal calf serum by gradually adjusting the medium from a high concentration of fetal calf serum from about 7 to about 15 % to a culture medium from about 0 to about 3 %, preferably 2%,
 - b. applying the Vero cell line obtained in step "a" to a culture in suspension with the same culture medium of low concentration of fetal calf serum of about 0 to about 3 %, preferably 2% for a period of time sufficient enough for said cell line to adapt to grow in suspension in the absence of supporting materials for its adherence; and
 - c. adapting said cell line obtained in step "b" to grow in a medium free of fetal calf serum and free of proteins.
7. The procedure of Claim 6 wherein said sufficient time of step "b" is at least 30 days.
8. The procedure of Claim 6 wherein said anchorage-dependent Vero cell line is the Vero E6 line (passage 26, Banco Argentino de Células).
9. The procedure of Claim 6 wherein said Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence and in a culture medium free of fetal calf serum and obtained in step "c" of said Claim is the line deposited with the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig,

Germany) under the name of sVero p66 and whose number assigned by the International Deposit Authority is DSM ACC2791.

10. A procedure to produce viruses to formulate vaccines wherein the procedure comprises the steps of:
 - a. growing the Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence, up to a cell concentration between approximately 1×10^5 and approximately 30×10^6 cells per ml of culture medium;
 - b. Infecting the cell line of step "a" with said virus with an infection multiplicity (M.O.I.) of between approximately 0.001 and 10; and
 - c. Collecting the virus production produced during the infection.
11. The procedure of Claim 10 wherein said Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence is adapted to grow in a culture medium free of fetal calf serum and free of proteins.
12. The procedure of Claim 10 wherein said Vero cell line adapted to grow in suspension, in the absence of supporting materials for its adherence is the cell line deposited with the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) under the name of sVero p66 and whose number assigned by the International Deposit Authority is DSM ACC2791.
13. The procedure of Claim 10 wherein said virus is selected from the group consisting of the human immunodeficiency virus, such as HIV-1 and HIV-2; polio virus; hepatitis A

virus, human coxsackie virus; rhinovirus; echovirus; equine encephalitis virus; rubella virus, dengue viruses, encephalitis virus, yellow fever virus, coronavirus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, ebola virus, parainfluenza virus, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus, influenza virus, Hantaan virus, bunga virus, hemorrhagic fever virus, reovirus, rotavirus, parvoviruses, papilloma virus, polyoma virus, adenovirus, herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, varicella zoster virus, cytomegalovirus (CMV), smallpox virus, vaccinia virus, pox viruses, African swine fever virus and the unclassified agent of delta hepatitis, and the agents of non-A, non-B hepatitis.

14. The procedure of Claim 10 wherein said virus is the polio virus.
15. The procedure of Claim 10 wherein said virus is the rabies virus.
16. The procedure of Claim 10 wherein said virus is the hepatitis A virus.
17. The procedure of Claim 10 wherein said virus is the yellow fever virus.
18. The procedure of Claim 10 wherein said virus is the influenza virus.
19. The procedure of Claim 10 wherein said step "c" comprises a centrifugation.
20. A virus obtained by the procedure of Claims 10.
21. A vaccine formulated with a virus of Claim 20.

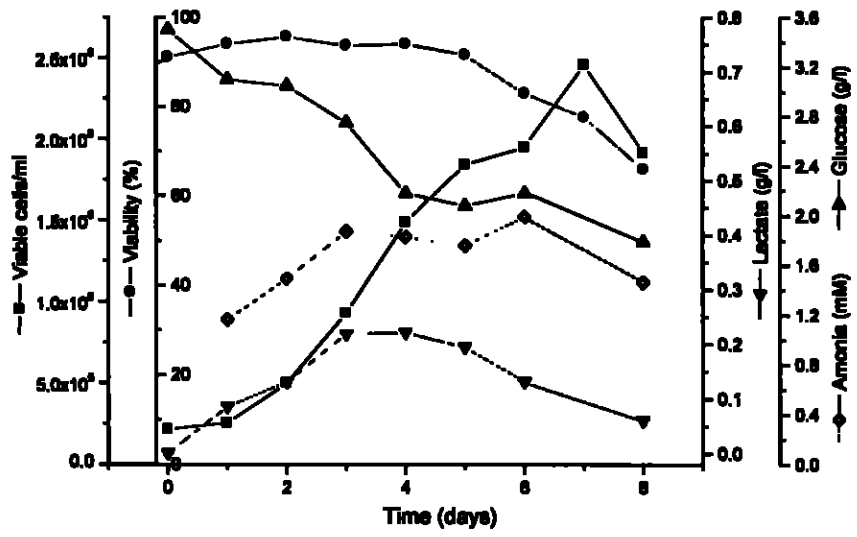


Figure 1

LINEA CELULAR VERO ADAPTADA PARA CRECER EN SUSPENSIÓN

Resumen

La presente invención se relaciona con una línea celular Vero que puede crecer en un cultivo libre de suero y proteínas, en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia, y con la producción de vacunas virales usando dicha línea celular. Más específicamente, la presente invención esta relacionada con el establecimiento de una línea celular que puede crecer en un cultivo en suspensión sin la necesidad de que dichas células se adhieran a un material de soporte. Además, la presente invención provee un proceso para obtener dicha línea celular Vero y un proceso para producir vacunas virales con dicha línea celular. La presente invención también se refiere a los virus obtenidos por dicho proceso y las vacunas formuladas por dichos virus.

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una línea celular que puede crecer en un cultivo libre de suero fetal bovino (SFB) y en suspensión sin la necesidad de un soporte sólido (*carrier*); y con un proceso de producción de vacunas virales utilizando dicha línea celular. Particularmente, la presente invención se relaciona con el establecimiento de una línea celular que puede crecer en un cultivo libre de proteínas y en suspensión sin la

necesidad de que las células se adhieran a un *carrier*, y un proceso para producir vacunas virales utilizando dicha línea celular. La presente invención además, se relaciona con los virus obtenidos por dicho proceso y las vacunas formuladas por dichos virus.

ARTE PREVIO

Para la producción de vacunas virales, se utilizan huevos de gallinas, cerebros de ratones, células primarias o líneas de células establecidas con el fin de propagar el virus (Principles of Virology. Molecular Biology, pathogenesis and control, 2001). Estas técnicas convencionales presentan diversos problemas:

- 1) El uso de huevos de gallina requiere el manejo de la cría de gallinas, de huevos fertilizados que se deben ajustar al esquema de producción de vacunas, y laboriosos procedimientos que incluyen la purificación exhaustiva para eliminar completamente los componentes derivados de las proteínas del huevo (Tree et al., 2001).
- 2) Líneas celulares; en general requieren de la adición de suero fetal bovino como factor de crecimiento celular. Por lo tanto, existe un riesgo asociado de contaminación con agentes infecciosos y priones y además, el suero fetal bovino de calidad es muy costoso, lo que suma un costo considerable a la vacuna.
- 3) Entre las líneas celulares establecidas, en las que se puede propagar diversos tipos de virus, las células Vero (*African Green Monkey Kidney Epithelial Cells*) son ampliamente utilizadas para la producción de vacunas de alta calidad para animales y humanos (Butler et al., 2000; Franzzati-Gallina et al., 2001; US Patent N° 4,664,912; Montagnon, 1989; Montagnon et al., 1981). Además, las células Vero son la única línea celular recomendada para producción de virus para la producción de vacunas por

genética reversa según el documento: "WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics". 2005.6, página 3. Sin embargo, las células vero tienen tendencia a adherirse a superficies. Por esto, el uso de células Vero para cultivos a gran escala es extremadamente costoso, ya que se hace necesario el uso de reactores con grandes superficies o la introducción de *carriers* en el cultivo.

El suero fetal bovino se usa con frecuencia para la propagación de líneas de células de mamíferos. Sin embargo, cuando se utilizan células de mamíferos para la producción de virus o proteínas recombinantes, existe una creciente presión para eliminar el suero del proceso de elaboración. Algunas de las razones que impulsan la implementación de la tecnología de medios de cultivos libres de suero son: los costos del suero, la variabilidad entre lotes de suero y la calidad de éste, cuestiones regulatorias respecto a los agentes biológicos presentes en el mismo y la responsabilidad de eliminar las proteínas de suero en pasos posteriores durante la producción. También existe la necesidad, por razones de reducción de costos y por el escalado de los procesos, del uso de líneas celulares adaptadas al crecimiento en suspensión. Existe la urgencia de desarrollar procesos más económicos para la producción de vacunas a bajo costo, de manera de volverlas accesibles a toda la población mundial.

Gran cantidad de desarrollos han sido realizados para obtener líneas celulares VERO en suspensión con el objeto de obtener virus para la fabricación de vacunas (US 4,664,912; US 4,525,349; US 5,719,051; Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Frazzati-Gallina NM. J Biotechnol. 2001 Dec 14;92(1):67-72, entre otras publicaciones que quedan referenciadas en esta solicitud de patente). Sin embargo estos documentos describen, en general, el uso de carriers y microcarriers para la obtención de suspensiones de células Vero en adherencia.

No ha sido reportado en el estado del arte una línea celular VERO para la obtención de virus para vacunas, adaptada para el crecimiento en suspensión, en ausencia de materiales de soportes para su adherencia (*carriers* o *microcarriers*), adaptada a crecer en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino, que además sea capaz de crecer en medios de cultivo libres de proteínas. Por otra parte existen referencias a líneas celulares VERO que pueden crecer en suspensiones formando agregados de células ("The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media". Cytotechnology. 1992;10(2):169-74. Litwin J.), Litwin describe un método para hacer crecer células Vero en suspensión como agregados de células en medio de cultivo libre de suero. Sin embargo los agregados celulares son difíciles de infectar con virus y por esto no son adecuados para la producción de vacunas (tal como puede leerse en la solicitud de patente US 2005153419-A). No se han reportado células VERO que puedan crecer en suspensión como células individuales sin formar agregados en cultivos de alta densidad.

Con el fin de resolver los problemas que presenta el arte previo tal como se ha descrito anteriormente, este invento ha establecido una nueva línea de células Vero capaces de crecer en un cultivo sin suero fetal bovino, sin proteínas y en suspensión de células aisladas en ausencia de agregados de células. Esta línea celular puede utilizarse en la producción a gran escala de vacunas en reactores de fermentación estándares en ausencia de materiales de soporte para su adherencia (sin la necesidad de cualquier tipo de soporte celular, tales como *carriers* o *microcarriers*, en el medio de cultivo). Las ventajas de un cultivo en suspensión de células individuales respecto de un cultivo de agregados celulares son conocidas en el estado del arte, por ejemplo la mejora de la eficiencia en los sistemas de producción de virus que involucran bioreactores de alta densidad. La presente invención también comprende un proceso para fabricar vacunas

virales cultivando las células Vero en suspensión sin SFB y luego infectando las células con el virus a utilizarse en la producción de vacunas. La vacuna, producida de este modo, resulta de bajo costo y de un alto perfil de seguridad.

RESUMEN DE LA INVENCION

La línea celular VERO, objeto de la presente invención, útil para la producción de virus para la formulación de vacunas está adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino. Además esta línea celular está adaptada para crecer en un medio de cultivo libre de proteínas. Esta línea celular está también adaptada para el crecimiento en suspensión como células aisladas, en ausencia de agregados de células. En particular dicha línea celular está depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania) bajo el nombre sVERO p66 y cuyo número asignado por la Autoridad de Depósito internacional es DSM ACC2791.

El procedimiento para obtener dicha línea celular VERO, adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino y libre de proteínas, otro objeto de la presente invención, comprende los siguientes pasos:

- a. adaptar una línea celular VERO de crecimiento en adherencia, preferentemente la línea celular Vero E6 (pasage 26, Banco Argentino de Células), a un medio de cultivo con bajo contenido de suero fetal bovino mediante un progresivo ajuste del medio desde un medio de cultivo con una alta concentración de suero fetal bovino de entre 7 y 15 % hasta llegar a un

medio de cultivo de baja concentración de suero fetal bovino de entre 0 y 3 %, preferentemente 2%,

b. aplicar la línea celular VERO obtenida en el paso "a." a un cultivo en suspensión con el mismo medio de cultivo de baja concentración de suero fetal bovino de entre 0 y 3 %, preferentemente 2%, durante un tiempo suficiente, al menos 30 días, para que dicha línea celular se adapte a crecer en suspensión en ausencia de soportes para su adherencia; y

c. adaptar la línea celular obtenida en "b." para crecer en un medio libre de suero fetal bovino y libre de proteína.

El procedimiento para producir virus para formular vacunas, otro objeto de la presente invención, comprende los siguientes pasos:

a. hacer crecer una línea celular VERO adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia, y preferentemente en ausencia de proteínas, hasta una concentración de células de entre $1 \cdot 10^5$ y $30 \cdot 10^6$ células por ml de medio de cultivo,

b. infectar la línea celular del paso "a." con dicho virus con una multiplicidad óptima de infección (M.O.I.) de entre 0.001 y 10, y

c. recoger la producción de virus producida durante la infección, preferentemente por centrifugación.

En las formas preferidas de llevar a cabo la presente invención dicho virus es seleccionado del conjunto comprendido por virus de inmunodeficiencia humanos, como HIV-1 y HIV-2; virus de la polio; virus de hepatitis A; virus coxackie humano; rinovirus; echovirus; virus encefalítico equino; virus de rubiola; virus del dengue; virus de la encefalitis; virus de la fiebre amarilla; coronavirus; virus de la estomatitis vesicular; virus de la rabia; virus del ebola; virus parainfluenza; virus mumps; virus

measles; virus syncytial respiratorio; virus influenza; virus Hantaan; virus bunga; virus de la fiebre hemorrágica; reovirus; rotavirus; parvovirus; virus papilloma; virus polyoma; adenovirus; virus herpes simplex (HSV) 1 y 2; virus de la varicela zoster; cytomegalovirus (CMV); virus de la viruela; virus vaccinia; virus pox; virus de la fiebre porcina; y los agentes no clasificados de la hepatitis delta y los agentes de la hepatitis no-A y no-B. Preferentemente es el virus de la polio, de la rabia, el virus fiebre amarilla, virus de la hepatitis A y el virus influenza.

El virus o los antígenos virales, objetos también de la presente invención, son obtenibles mediante el procedimiento descrito previamente.

También son objetos de la presente invención las vacunas formuladas con los virus obtenibles mediante el procedimiento descrito.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: muestra el crecimiento de Vero E6 AGS según el presente invento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION.

La línea celular VERO de la presente invención, útil para la producción de virus para la formulación de vacunas está adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia (*carriers o microcarriers*) y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino. Además esta línea celular está adaptada para crecer en un medio de cultivo libre de proteínas. Esta línea celular, además, está adaptada para crecer en una suspensión de células aisladas en ausencia de agregados de células. En particular dicha línea celular está depositada en German Collection of Microorganisms

and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania) bajo el nombre sVERO p66 y cuyo número asignado por la Autoridad de Depósito internacional es DSM ACC2791.

El procedimiento para obtener dicha línea celular Vero adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un cultivo libre de suero fetal bovino comprende los siguientes pasos:

- a. adaptar una línea celular VERO de crecimiento en adherencia, preferentemente la línea celular Vero E6 (pasaje 26, Banco Argentino de Células), a un medio de cultivo con bajo contenido de suero fetal bovino mediante un progresivo ajuste del medio desde un medio de cultivo con una alta concentración de suero fetal bovino de entre 7 y 15 % hasta llegar a un medio de cultivo de baja concentración de suero fetal bovino de entre 0 y 3 %, preferentemente 2%,
- b. aplicar la línea celular VERO obtenida en el paso "a." a un cultivo en suspensión con el mismo medio de cultivo de baja concentración de suero fetal bovino de entre 0 y 3 %, preferentemente 2%, durante un tiempo suficiente, al menos 30 días, para que dicha línea celular se adapte a crecer en suspensión en ausencia de soportes para su adherencia. Ésto se logra mediante un pasaje abrupto de las células de un frasco tipo "*T-flasks*" a un frasco tipo "*spinner*", sin ningún *carrier*, y gradualmente se reemplaza el medio suplementado con suero por un medio libre de suero conteniendo proteínas y factores de crecimiento. Durante la fase inicial de adaptación al crecimiento en suspensión las células tienden a formar agregados de 2 a 30 células, especialmente a densidades celulares mayor de 1.10^6 células/ml.; y
- c. adaptar dicha línea celular, obtenida en el paso "b." para el crecimiento en un medio libre de suero fetal bovino y libre de proteínas. Luego de varios

pasajes, y reemplazo del medio del paso "b." por un medio libre de proteínas, no se observa la formación de grumos de células, y la célula Vero E6 está adaptada al crecimiento en un cultivo en suspensión en un medio libre de proteínas, a este clon celular se lo denominó "VERO E6 AGS".

Las células Vero E6 AGS presentan un tiempo de duplicación de 24 horas en un cultivo continuo a lo largo de un periodo de al menos un mes y mantienen la susceptibilidad a ser infectadas por diversos virus. Adicionalmente, no se observan diferencias en la respuesta celular (medidas por la viabilidad y el tiempo de duplicación) al crecimiento en medios con bajas concentraciones de proteínas y factores de crecimiento y al crecimiento en medios libre de proteínas.

La línea celular Vero E6 AGS ha sido depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania) bajo el nombre sVERO p66 y cuyo número asignado por la Autoridad de Depósito internacional es DSM ACC2791.

Cultivo en Suspensión e Infección

Las células se mantienen en suspensión en cultivos de entre 30 y 1000 ml en frasco tipo *spinner* de 50 a 1500 ml (*Techne*, UK) agitados a una velocidad de entre 50 y 80 rpm en un incubador con 5% CO₂ y a una temperatura de entre 33 y 37 °C.

Durante el mantenimiento de la célula, los cultivos son mantenidos en fase exponencial diluyendo las células aproximadamente cada dos días con el fin de mantener las densidades de las células entre $1 \cdot 10^5$ células/ml y $12 \cdot 10^5$ células/ml. Para experimentos

de infección, las células en crecimiento exponencial son centrifugadas y resuspendidas en medios de cultivo frescos a una densidad celular de 1.10^6 células/ml.

La infección se inicia agregando un concentrado del virus al cultivo a multiplicidad óptima de infección (MOI) de 0.001 a 10. Una alícuota de 500-1500 μ l de la suspensión de células es transferida a tubos estériles a distintos tiempos post infección. Las distintas alícuotas son guardadas a -80°C . para posterior análisis. Las partículas virales son recuperadas del total de las muestras congeladas mediante tres ciclos de congelado-descongelado.

De acuerdo con la presente invención, las células crecen individualmente en suspensión y son infectadas de manera adecuada por diferentes virus produciendo rendimientos adecuados de partículas virales antigénicas aceptables para la producción de vacunas.

Los virus que pueden ser producidos por aplicación de la presente invención son seleccionados del grupo comprendido por virus de inmunodeficiencia humanos, como HIV-1 y HIV-2; virus de la polio; virus de hepatitis A; virus coxsackie humano; rinovirus; echovirus; virus encefalítico equino; virus de rubiola; virus del dengue; virus de la encefalitis; virus de la fiebre amarilla; coronavirus; virus de la estomatitis vesicular; virus de la rabia; virus del ebola; virus parainfluenza; virus mumps; virus measles; virus syncytial respiratorio; virus influenza; virus Hantaan; virus bunga; virus de la fiebre hemorrágica; reovirus; rotavirus; parvovirus; virus papilloma; virus polyoma; adenovirus; virus herpes simplex (HSV) 1 y 2; virus de la varicela zoster; cytomegalovirus (CMV); virus de la viruela; virus vaccinia; virus pox; virus de la fiebre porcina; y los agentes no clasificados de la hepatitis delta y los agentes de la hepatitis no-A y no-B. Preferentemente es el virus de la polio, de la rabia, el virus fiebre amarilla, virus de la hepatitis A y el virus influenza.

Los virus obtenibles mediante la aplicación de la presente invención son útiles para la formulación de vacunas, mediante los métodos conocidos en el estado del arte. Dichos virus o antígenos virales derivados se concentran y purifican por métodos conocidos tales como centrifugación y cromatografía. Las vacunas, obtenibles mediante la presente invención, comprenden dicho virus o antígenos virales, al menos un diluyente, y la presencia opcional de adyuvantes, excipientes y agentes quimioterapéuticos usuales en el estado del arte. En los casos en que sea necesario se somete a dichos virus a un proceso de atenuación o inactivación.

A continuación se describe la presente invención a través de ejemplos de aplicación que muestran formas preferidas de llevarla a la práctica, sin que ello implique limitar el alcance de la misma.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

La línea celular Vero de la presente invención fue preparada utilizando el siguiente procedimiento:

Las células Vero de la línea celular Vero E6 (pasaje 26, Banco Argentino de Células) fueron utilizadas como material inicial. Las células fueron cultivadas en un frasco para cultivo en monocapa de 25 cm², que contenía MEM (GIBCO BRL, USA) medio suplementado con 10% SFB. La incubación se realizó a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Luego de una suficiente expansión de las células, éstas fueron sembradas en el medio antes mencionado contenido 20% medio libre de suero y subcultivado hasta confirmar ausencia de células anormales. Luego del subcultivo y expansión suficiente de las células, el medio de cultivo fue reemplazado con un medio que contenía 40% de

medio libre de suero y subcultivado hasta confirmación de ausencia de anormalidad en las células. El procedimiento fue repetido hasta que el contenido de medio libre de suero fue del 80% (2% SFB). En este punto, las células fueron sometidas a tripsinización e inoculadas ($2,5 \cdot 10^5$ cells/ml) en un frasco tipo *spinner* (Techne, UK) conteniendo el mismo medio. La agitación fue a 50 rpm y la incubación fue a 37°C en una atmósfera al 5% CO₂. Las células fueron transferidas a medio fresco según la evolución del pH del cultivo. Después de 90 días luego de la iniciación del proceso de adaptación, las células fueron sembradas en un medio que contenía la mitad del volumen de MEM suplementado con 0.2% SFB y la mitad del volumen del medio con ExCell™ 302 CHO libre de suero (JRH Biosciences, USA) suplementado con 2 mM de glutamina. El período de duplicación en ese medio fue de alrededor de 24 hs con una viabilidad 98-100 %, una semana después de la transferencia. Las células estaban agregadas en *clusters* de menos de diez células cuando la concentración de la célula era superior a $1,5 \cdot 10^6$ cel/ml. En este punto, la mitad del volumen de MEM fue reemplazado con el medio libre de proteína SMIF-6 (GIBCO BRL, USA). Luego de esto, la proporción del medio ExCell™ 302 CHO libre de suero fue disminuida y 120 días después de la iniciación del proceso de adaptación, las células Vero se desarrollaron en suspensión en un medio 100% libre de proteína SMIF-6. Las células que originalmente eran las Vero E6 y que fueron adaptadas para crecer en suspensión como células aisladas sin agregados de células, y en ausencia de materiales de soporte fueron denominadas "Vero E6 AGS".

Para el almacenamiento, las células Vero E6 AGS en crecimiento en fase exponencial fueron centrifugadas a 1000 rpm y el *pellet* de células resuspendido en una solución que contenía 45% de medio condicionado SMIF-6, 45% de medio fresco SMIF-6 y 10% dimetilsulfoxido (DMSO). Esta suspensión de células fue fraccionada en criotubos

conteniendo 1ml de la suspensión cada uno y congelada en etapas de: 1h a 4 °C, 1h a -20 °C en atmósfera de nitrógeno y luego en nitrógeno líquido a -196 °C.

EJEMPLO 2

Susceptibilidad de las células Vero E6 AGS a la infección viral

La susceptibilidad de las células Vero E6 AGS a la infección viral fue ensayada utilizando el virus de la estomatitis vesicular (VSV, cepa Indiana: ATCC VR-1238). La titulación de los virus fue realizada utilizando células Vero E6 (pasaje 31). Para esto, 4,10⁴ células fueron sembradas en cada posillo de una placa de titulación de 96 pocillos (GREINER, Alemania). Luego de 3 horas de incubación a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, las células fueron infectadas con diferentes cantidades de suspensión viral. Luego de 24 hs se estimó el título viral como la dilución máxima con capacidad de producir efecto citopático en el 100% de las células.

Para la producción de virus, se sembraron 3,2.10⁵ células Vero E6 AGS en un frasco tipo *spinner* conteniendo medio SMIF-6 y se lo infectó con 0.01 unidades citopáticas/ml de la suspensión viral. De la Tabla 1 se observa que luego de 48 todas las células habían sido destruidas por el virus. El titulo viral en el sobrenadante fue de 1 unidad citopática/ml. Este resultado indica que en promedio las células de la línea celular Vero 6 AGS son capaces de amplificar 100 veces la cantidad de virus sembrado bajo las condiciones dadas aquí como ejemplo.

TABLE 1

Tiempo luego de la Infección	Título viral	
	% de células viables	
(hs)		(unidades citopaticas/ml)

0	97	0.0001
24	37	ND
48	0	0.01

EJEMPLO 3

La relación entre la densidad celular y la producción viral fue estudiada utilizando la línea celular Vero E6 AGS y el virus VSV. Para esto, las células Vero E6 AGS fueron crecidas en suspensión hasta densidad de $0.75 \cdot 10^6$ ó $5 \cdot 10^5$ células/ml e infectadas con el virus VSV a una multiplicidad óptima de infección (M.O.I.) de 0.1.

Medio de cultivo: SMIF 6

Aditivos: FCS 2%

Condiciones de cultivo: 37°C, 5% CO2

Rotación de spinner: 50 rpm

Densidad celular al comienzo del cultivo: aproximadamente $1 \cdot 10^5$ células/ml

Virus: VSV

MOI: 0.1

Las muestras fueron tomadas luego de 20 horas de la infección y el título fue medido de acuerdo con el método de recuento de placas.

La dilución de la muestra que produce efecto citopático al 50% de los cultivos inoculados, contiene 1 Dosis de Infección de Cultivo Tisular de 50% (TCID₅₀). La

determinación de este valor se realizó según el procedimiento Reed-Muench (Reed and Muench, 1938).

La Tabla.2 muestra que los títulos virales aumentaron aproximadamente en forma proporcional a la densidad celular.

TABLA.2

Densidad celular (cels/ml)	Título Viral (TCID50/ml)	Titulo viral / densidad celular (TCID50/cell)
0,75.10 ⁶	4,64.10 ⁸	618
2,44.10 ⁶	3,16.10 ⁹	1295

EJEMPLO 4

La línea celular Vero E6 AGS fue utilizada para propagar el virus Herpes Simplex (HSV):

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

Densidad celular en infección: 2.0.10⁵

MOI: 0.002

Escala de cultivo: Frasco *spinner* de 100 ml

Medio de cultivo: SMIF 6 y SMIF 6 / FCS 2%

Rotación del Frasco *spinner*: 50 rpm

Condiciones del cultivo: 37°C, 5%CO2

Duración del cultivo: 2 días

La Tabla.3. muestra que el virus HSV, un virus ADN, fue producido utilizando Vero E6 AGS en suspensión en ausencia de microcarriers y en un medio de cultivo libre de proteína. Se observó una suspensión de células individuales aisladas sin agregados celulares. También se observó que el título viral es levemente superior en el experimento conducido en ausencia de SFB.

TABLA.3

Medio de cultivo	Título de HSV (TCID50/ml)
SMIF 6	5,88.10 ⁸
SMIF 6 + FCS (2%)	4,64.10 ⁸

EJEMPLO 5

La línea celular VERO E6 AGS fue utilizada para propagar el virus de la Polio (OPV tipo I cepa Sabin).

Las condiciones del cultivo fueron las siguientes:

Densidad celular al momento de infección: $3,0 \cdot 10^5$

MOI: 1

Escala de cultivo: Frasco *spinner* de 100 ml

Medio de cultivo: SMIF 6 y SMIF 6 / FCS 2%

Rotación del frasco *spinner*: 50 rpm

Condiciones del cultivo: 34°C, 5%CO2

Duración del cultivo: 1 día

TABLA 4

Medio de cultivo	Título OPV (TCID50/ml)
SMIF 6	$2,5 \cdot 10^8$
SMIF 6 + FCS (2%)	$1,8 \cdot 10^8$

REFERENCIAS

Patentes

1.	US 4,664,912	Wiktor et al.	May, 1987
2.	US 6,825,036;	Makizumi, et al.	September 3, 2002
3.	US 6,656,719;	Gould , et al.;	October 21, 1998
4.	US 6,656,720;	Groner. et al.;	Jul. 12, 2002
5.	US 6,146,873;	Kistner, et al.	October 15, 1997
6.	US 6,008,036;	Fanget, et al.;	May 22, 1998
7.	US 5,824,536;	Webster, et al.;	June 17, 1996
8.	US 5,719,051;	Mundt, et al.;	December 13, 1994
9.	US 4,783,407;	Provost, et al.;	September 30, 1985
10.	US 4,664,912;	Wiktor, et al.;	October 1, 1984
11.	BR 0002694;	Gallina Neuza Frazatti;	June 19, 2000
12.	US 4,525,349;	Montagnon, et al.;	December 29, 1981
13.	US 20050019928;	Rasty, Siyamak; et al.	August 17, 2004
14.	US 20040137013;	Kalinger, Hermann; et al.;	October 3, 2003
15.	US 20010001709;	Lau, Allan S.;	December 13, 2000
16.	US 20050153419;	Liu, Zhong; et al.	July 14, 2005

Trabajos Científicos

1. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Frazatti-Gallina NM, et al. Vaccine, 2004 Dec 9;23(4):511-7.R

2. Rabies virus production in high Vero cell density cultures on macroporous microcarriers. Yokomizo AY. Biotechnol Bioeng. 2004 Mar 5;85(5):506-15.
3. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. Trabelsi K J Biotechnol. 2006 Jan 24;121(2):261-71.
4. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. Choi Y. Vaccine. 2003 May 16;21(17-18):1867-73.
5. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. Liu CC, Vaccine. 2006 Aug 2.
6. Immunogenicity and protective efficacy in monkeys of purified inactivated Vero-cell SARS vaccine. Qin E, Vaccine. 2006 Feb 13;24(7):1028-34.
7. The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media. Litwin J. Cytotechnology. 1992;10(2):169-74.
8. Studies on the efficiency of measles virus antigen production using Vero cell culture in a microcarrier system. Mendonca RZ. Braz J Med Biol Res. 1994 Jul;27(7):1575-87.
9. Preparation and evaluation of Vero-cell infectious bursal disease vaccine in Pakistan. Rasool MH, Hussain I. Vaccine. 2006 Apr 5;24(15):2810-4.
10. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. Putnak R. J Infect Dis. 1996 Dec;174(6):1176-84.
11. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. Promising results. Montagnon B. Dev Biol Stand. 1983;55:37-42.
12. A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor. Sun MB. World J Gastroenterol. 2004 Sep 1;10(17):2571-3.

13. Development of a novel influenza vaccine derived from a continuous cell line. Kistner O. ALTEX, 2001;18(1):50-4.
14. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. Merten OW. Adv Exp Med Biol. 1996;397:141-51.
15. Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. Kistner O. Dev Biol Stand. 1999;98:101-10.
16. Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures. Merten OW. Dev Biol Stand. 1999;98:23-37.
17. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Frazzati-Gallina NM. J Biotechnol. 2001 Dec 14;92(1):67-72.
18. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. Srivastava AK. Vaccine. 2001 Aug 14;19(31):4557-65.
19. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. Kistner O. Vaccine. 1998 May-Jun;16(9-10):960-8.
20. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. Montagnon BJ. Rev Infect Dis. 1984 May-Jun;6 Suppl 2:S341-4.
21. Application of a serum-free medium for the growth of Vero cells and the production of reovirus. Butler M. Biotechnol Prog. 2000 Sep-Oct;16(5):854-8.
22. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. Y Choi. Vaccine, May 16, 2003; 21(17-18): 1867-73.
23. Cell aggregate suspension culture for large-scale production of biomolecules. Tolbert WR, Hitt MM, Feder J. In Vitro. 1980 Jun;16(6):486-90.
24. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. Genari SC. Cell Biol Int. 1998;22(4):285-94.

25. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Neuza M. Frazzati-Gallina. Vaccine Volume 23, Issue 4 , 9 December 2004, Pages 511-517.
26. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. Neuza M. Frazzati-Gallina. Journal of Biotechnology Volume 92, Issue 1 , 15 November 2001, Pages 67-72.
27. Protein-free culture of Vero cells: a substrate for replication of human pathogenic viruses. Jindrich Cinatl, Jr. Cell Biology International Volume 17, Issue 9 , September 1993, Pages 885-896.
28. Butler, M; Burgener, A.; Patrick, M; Berry, D.; Moffatt, D.; Huzel, N.; Bernabé, N. And Coombs, K. (2000). Application of a serum-free medium for the growth of Vero Cells and production of reovirus. *Biotechnol. Progr.*, 16, 854-858.
29. Frazzati-Gallina, N.M.; Paoli, R.L.; Mourao-Fuches, R.M.; Jorge, S.A.C and Pereira, C.A. (2001). Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *J. Biotechnol.*, 92, 67-72.
30. Montagnon, B.J. ; Fanget, B. ; Nicolas, A.J. (1981). Large scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Dev. Biol. Stand.*, 47, 55-64.
31. Montagnon, B.J. (1989) Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. *Dev. Biol. Stand.*, 70, 27-47.
32. Tree, J.A.; Richardson, C., Fooks, A.R.; Clegg, J.C.; Looby, D. (2001) Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine*, 19, 3441-3450
33. Reed, L.J., Muench, H. (1938), A simple method of estimating fifty percent end points. *J. Hyg.*, 27, 493-497.

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma es llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una línea celular VERO caracterizada por estar adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino.
2. La línea celular de la reivindicación 1 caracterizada porque está adaptada para crecer en un medio de cultivo libre de proteínas.
3. La línea celular de la reivindicación 1 caracterizada porque dicha suspensión comprende células aisladas en ausencia de agregados de células.
4. La línea celular de la reivindicación 1 caracterizada porque es la línea depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania) bajo el nombre sVERO p66 y cuyo número asignado por la Autoridad de Depósito internacional es DSM ACC2791.
5. La línea celular de la reivindicación 1 caracterizada porque es útil para la producción de virus para la formulación de vacunas.
6. Un procedimiento para obtener una línea celular VERO adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - a. adaptar una línea celular VERO de crecimiento en adherencia a un medio de cultivo con bajo contenido de suero fetal bovino mediante un

progresivo ajuste del medio desde un medio de cultivo con una alta concentración de suero fetal bovino de entre 7 y 15 % hasta llegar a un medio de cultivo de baja concentración de suero fetal bovino de entre 0 y 3 %, preferentemente 2%,

- b. aplicar la línea celular VERO obtenida en el paso "a." a un cultivo en suspensión con el mismo medio de cultivo de baja concentración de suero fetal bovino de entre 0 y 3 %, preferentemente 2% durante un tiempo suficiente para que dicha línea celular se adapte a crecer en suspensión en ausencia de materiales de soporte para su adherencia; y
- c. adaptar la línea celular obtenida en "b." para crecer en un medio libre de suero fetal bovino y libre de proteína.

- 7. El procedimiento de la reivindicación 6 caracterizado porque dicho tiempo suficiente del paso "b." es de al menos 30 días.
- 8. El procedimiento de la reivindicación 6 caracterizado porque dicha línea celular VERO de crecimiento en adherencia es Vero E6 (pasage 26, Banco Argentino de Células).
- 9. El procedimiento de la reivindicación 6 caracterizado porque dicha línea celular VERO adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino y obtenida en dicho paso c. es la depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania) bajo el nombre sVERO p66 y cuyo número asignado por la Autoridad de Depósito internacional es DSM ACC2791.

10. Un procedimiento para producir virus para formular vacunas caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
- hacer crecer una línea celular VERO adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia, hasta una concentración de células de entre 1.10^5 y 30.10^6 células por ml de medio de cultivo;
 - infectar la línea celular del paso "a." con dicho virus con una multiplicidad óptima de infección (m.o.i.) de entre 0.001 y 10; y
 - recoger la producción de virus producida durante la infección.
11. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicha línea celular VERO adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia está adaptada para crecer en medio de cultivo libre de suero fetal bovino y libre de proteínas.
12. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicha línea celular VERO adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia es la línea celular depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania) bajo el nombre sVERO p66 y cuyo número asignado por la Autoridad de Depósito internacional es DSM ACC2791.
13. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicho virus es seleccionado del conjunto comprendido por los virus de inmunodeficiencia humanos, como HIV-1 y HIV-2; virus de la polio; virus de hepatitis A; virus coxackie humano; rinovirus; echovirus; virus encefáltico equino; virus de rubiola; virus del dengue; virus de la encefalitis; virus de la

fiebre amarilla; coronavirus; virus de la estomatitis vesicular; virus de la rabia; virus del ebola; virus parainfluenza; virus mumps; virus measles; virus syncytial respiratorio; virus influenza; virus Hantaan; virus bunga; virus de la fiebre hemorrágica; reovirus; rotavirus; parvovirus; virus papilloma; virus polyoma; adenovirus; virus herpes simplex (HSV); 1 y 2; virus de la varisela zoster; cytomegalovirus (CMV); virus de la viruela; virus vaccinia; virus pox; virus de la fiebre porcina; y los agentes no clasificados de la hepatitis delta y los agentes de la hepatitis no-A y no-B.

14. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicho virus es el virus de la polio.
15. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicho virus es el virus de la rabia.
16. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicho virus es el virus de la Hepatitis A.
17. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicho virus es el de la fiebre amarilla.
18. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicho virus es el virus influenza.
19. El procedimiento de la reivindicación 10 caracterizado porque dicho paso "c." consiste en una centrifugación.
20. Un virus caracterizado por ser obtenible mediante el procedimiento descrito por cualquiera de las reivindicaciones entre la 10 y la 19.
21. Una vacuna caracterizada por ser formulada con un virus como el de la reivindicación 20.

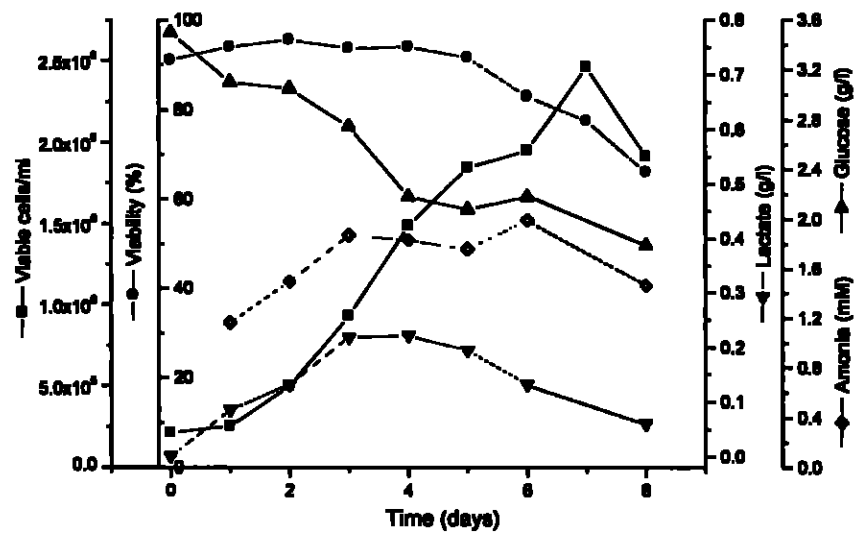


Figure 1

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) No. Prioridad 32) Fecha (33) País 00/723377 04-10-2005 US		(51) Int Cl: (71) Solicitante(s) ZELLTEK S.A. (72) Inventor(es) MARCELO GUSTAVO DAELLI (74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS	
(54) Título: LÍNEA CELULAR VERO ADAPTADA PARA CRECER EN SUSPENSIÓN			

Resumen - Reivindicación(es):

Una línea celular VERO caracterizada por estar adaptada para crecer en suspensión, en ausencia de materiales de soporte para su adherencia y en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino y proteínas, y con la producción de vacunas virales usando dicha línea celular. Ésta relacionada con el establecimiento de una línea celular que puede crecer en un cultivo en suspensión sin la necesidad de que dichas células se adhieran a un material de soporte. Además la presente invención provee un proceso para obtener dicha línea celular Vero y un proceso para producir vacunas virales con dicha línea celular. También se refiere a los virus obtenidos por dicho proceso y las vacunas formuladas por dichos virus.