



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-119202

1. EXPEDIENTE No.

4. TÍTULO Procedimiento para la producción de una
vacuna contra la influenza

1. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 7/01 S100 AG1K
34/12, 34/145, C12N 5/06.

1. SOLICITANTE LD Biomedical Corporation

DOMICILIO West Laval, Quebec, Canada

4. APODERADO Dolores Maria Rodriguez D'Alemon

2. BOGOTÁ, D. C., NOV 24/06

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

90-DIC 06

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2) LICITANTE (71)	Nombre: ID BIOMEDICAL CORPORATION Dirección: 525 Cartier Boulevard West Laval, Quebec H7V 3S8 Canadá Nacionalidad o domicilio: Quebec, Canadá Lugar de constitución: Canadá		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
	4) INVENTOR (ES) (72) Nombre: 1. TREPANIER, Pierre; 2. DUGRE, Robert; 3. HASSELL, Tom Dirección: 1. 1 Place Bellerive, Laval, Québec H7V 1B1, Canadá; 2. 375 Des Camellias, Ste-Therese, Québec J7E 5L8 Canadá; 3. 28-Sommerset Way, Apt. 1226, North York, Notario M2N 6W7 Canadá Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Canadienses		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2005/017606 Fecha: Mayo 20, 2005 Publicación Internacional No. WO2005/113758 A1 Fecha: Dic. 1, 2006 ?			
6) Título (54) PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA C NTRA LA INFLUENZA			
7) Clasificación Internacional: C12N 7/01, 5/00, A61K 39/12, 39/145, C12N 5/06			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Mayo 20 de 2004
			(31) Número de Solicitud 60/572,612
9) Comprobante de pago N°. 06-88,956 Fecha: N v. 17, 2006			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 88,956
FECHA : NOVIEMBRE 17 DE 2006

Rad: 06-119202-00000-0000
Fec: 2006-11-24 16:41:10 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trib. 11 PATENTE/II
Evs: 379 FASENACIONAL/II
ADM 411 PRESENTACION Folios: 102

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE HOBET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50107111	17/11/2006	11,422,000.00

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.

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

RECEIVED

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2005/017606

MS/MJR
NLS

DEC 09 2005

From the INTERNATIONAL BUREAU

SEED INTELLECTUAL PROPERTY
LAW GROUP PLLC

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

ROSOK, Mas, Joanne
Seed Intellectual Property Law Group PLLC
Suite 6300
701 Fifth Avenue
Seattle, WA 98104-7092
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

P. 871

Date of mailing (day/month/year)
01 December 2005 (01.12.2005)

Applicant's or agent's file reference
480094.429PC ✓

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/017606 ✓

International filing date (day/month/year)
20 May 2005 (20.05.2005)

Priority date (day/month/year)
20 May 2004 (20.05.2004)

Applicant
ID BIOMEDICAL CORPORATION et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 01 December 2005 (01.12.2005) under No. WO 2005/113758
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
- For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Beate Giffo-Schmitt

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 87 20

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

**(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau**



(43) International Publication Date
1 December 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/113758 A1

(51) International Patent Classification:
5A00, A61K 39/12, 39/145, C12N 5/06

C12N 7/02

(71). Applicant (for LS only): ID BIOMEDICAL CORPORATION OF WASHINGTON (USUS); 19204 North Creek Parkway, Suite 100, Bothell, WA 98011 (US).

(21) International Application Number:

PC7/US3005A/1764X

(72) Inventors; and

(22) International Filing Date: 20 May 2005 (20.05.2005)

(75) Inventors/Applicants (for US only): TREPANIER, Pierre [CA/CA]: 1 Place Bellerive, Laval, Québec H7V 1B1 (CA). DUGRE, Robert [CA/CA]: 375 Des Camélias, Ste-Thérèse, Québec J7E 5L8 (CA). HASSELL, Tom [GB/CA]: 28-Sommerston Way, Apt. 1226, North York, Ontario M2N 6W7 (CA).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/572,612 20 May 2001 (20.05.2001) US

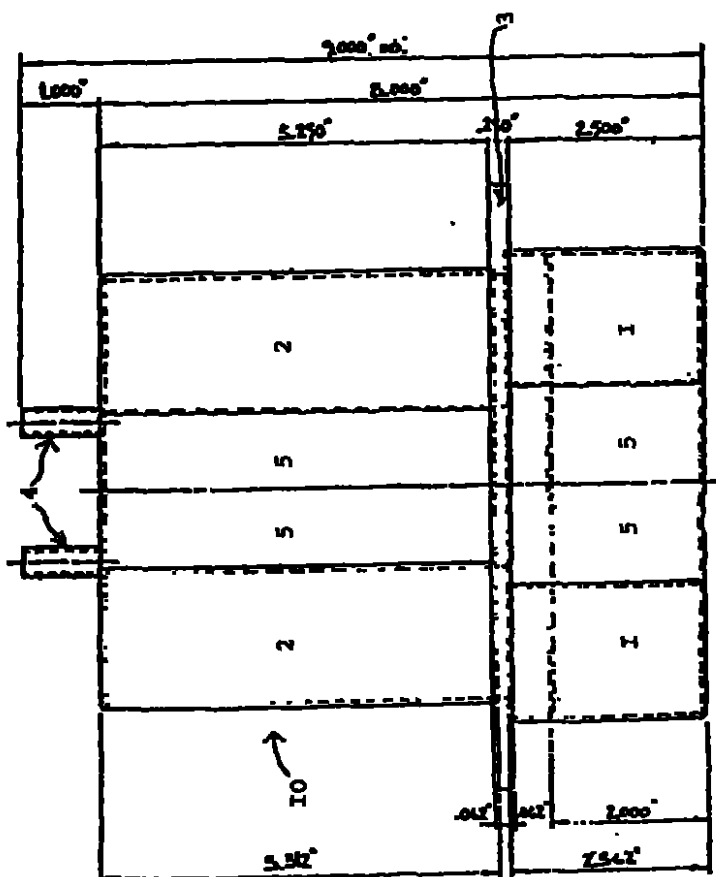
(74) Agents: ROSOK, Mae, Joanne et al.: Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-7092 (US).

(71) Applicant (for all Designated States except US): ID BIOMEDICAL CORPORATION [CA/CA]; 1630 Waterfront Center, 200 Burrard Street, Vancouver, British Columbia V6C 3L6 (CA).

(81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF AN INFLUENZA VACCINE



(57) Abstract: The present invention relates to a commercial-scale process for the production of influenza virus or antigens for prophylactic, diagnostic, immunotherapeutic or therapeutic purposes. Particularly, the invention provides a Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-derived, cell line and a cell culture-based process for the production of an influenza vaccine and more particularly, a human vaccine comprising influenza types A and B.

WO 2005/113758 A1



GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PI, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

European (~~AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EA, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR~~), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

**PROCESS FOR THE PRODUCTION OF AN
INFLUENZA VACCINE**

This application claims the benefit of U.S. provisional
5 application 60/572,612 filed May 20, 2004, which is herein
incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

10

The present invention generally relates to a commercial-scale
process for the production of influenza virus or antigens for
prophylactic, diagnostic, immunotherapeutic or therapeutic
purposes. Particularly, the invention provides a Madin-Darby
15 Canine Kidney (MDCK)-derived, cell culture-based process for
the production of an influenza vaccine and more particularly, a
human vaccine comprising influenza types A and B.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20

Traditionally, commercial influenza vaccines have been produced
by growing vaccine virus strains in embryonated hens' eggs.
The virus is harvested from the allantoic fluid and processed
to create a vaccine. However, this procedure has the
25 disadvantages of being labour-intensive and generating low
yields per egg, factors which present a serious limitation
during periods of epidemic. There is thus a need for the
large-scale manufacture of influenza virus vaccines which
overcomes the cost, time and yield disadvantages of the
30 embryonated hen egg method.

An alternative method to the above involves the use of cell
culture to produce influenza virus particles or virus proteins.

35 Influenza vaccines produced with cell cultures are believed to
be safer than ones produced in eggs and should not induce the
hypersensitivity to egg-based vaccines experienced by children

However, it is now considered that the presence of trypsin in solution has the disadvantage of causing a certain proportion of MDCK cells to lift from their solid support. Consequently, 5 the requirement for trypsin is a serious limitation to the commercial production of an influenza vaccine, despite the potential usefulness of this patented process. There is still a need therefore for a commercial cell culture-based process for the production of an influenza vaccine. This is supported 10 by the following statement in Kodihalli et al. (J. Virol. 69(8): 4888, 1995): "Embryonated chicken eggs are currently the only host in which sufficient quantities of virus can be cultivated economically and within the short time necessary to ensure a vaccine supply".

15

Also in 1995, the World Health Organization (WHO) published a memorandum summarizing discussions that took place in the summer of 1995, when experts in the field met to evaluate the recent advancements relating to cell culture-based processes 20 for the production of influenza vaccines (Bull. W.H.O. 73(4): 431, 1995). This document makes recommendations for further work to achieve rapid production of large amounts of influenza vaccine in cell culture systems which would allow rapid scale-up.

25

For growth of viruses in cell culture for research purposes, MDCK and Vero cells are the most frequently referred to as good producers of several viruses. However, for large scale production purposes several factors influence the choice of a 30 particular cell line over another, such as susceptibility to one or a multiplicity of viruses, output of viral titers, anchorage-dependency, tumorigenicity, etc.

Although MDCK cells are susceptible to several viral strains, 35 the poor resulting titers may limit the usefulness of this cell line for large-scale production purposes.

The properties of the MDCK line have been the subject of some studies. In 1970, Leighton et al (Cancer 26:1022) reported that MDCK cells presented the morphological pattern of a papillary adenocarcinoma in histopathologic preparations of three dimensional tissue cultures on collagen-coated cellulose sponge. The neoplastic quality of the cell line was demonstrated when suspensions of cells which had been injected in 11- or 12-day-old chick embryos were found to produce many foci of brain metastasis.

Evaluation of the tumorigenicity of a cell line is important in order to assess its desirability for use in the production of biological products. The Center for Biologics Evaluation and Research of the US Food and Drug Administration has published points to consider when using a cell culture as a substrate for the production of biologicals (See: *Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals*, Office of Biologics Research and Review, Center for Drugs and Biologics, FDA (USA), 1993). One such point is the tumorigenicity of the cell line used, and the FDA has devised guidelines for in vivo tumorigenicity testing. These guidelines call for, among other things, testing of cells administered by subcutaneous or intramuscular route in nude mice (nu/nu).

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the present invention relates to a process for the large-scale production of influenza viral particles or proteins, comprising the steps of :

- (a) growing a MDCK cell line capable of replicating said influenza virus;
- (b) infecting the MDCK cell culture with a strain of influenza virus and incubating to allow replication of the virus;

(c) harvesting said replicated virus and purifying virus particles or proteins therefrom.

The invention further provides for a cell line derived from the MDCK cell line that is highly-susceptible to viral infection and which produces influenza virus in higher titer than its parental cell line.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a front sectional view of a decanter used in the perfusing means of the invention;

Figure 2 is a top elevational view of said decanter; and

Figure 3 is a bottom elevational view of said decanter.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In one embodiment, the MDCK-derived cell line of the present invention, allows multi-step replication of the influenza virus. In another embodiment, the MDCK cell line of the present invention is anchorage-dependent and non-tumorigenic.

The present invention provides a derivation of a MDCK clone that is super-susceptible to viral infection. The description "super-susceptible" is used to indicate a MDCK-derived cell line that is highly susceptible to at least one virus, thereby producing higher titers of viral particles than the parental MDCK cell line. This derived clone, MDCK.5F1, was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) on February 8 1996 under No. CRL-12042. In one embodiment, the MDCK-derived cell line of the present invention is non-tumorigenic in tests conducted in accordance with FDA guidelines, and thus may be suitable for use in the preparation of viruses or antigens for prophylactic, diagnostic, immunotherapeutic or therapeutic purposes. The cell line has been tested for the presence of contaminating microorganisms and none have been detected.

8

In accordance with the present invention there is also provided, a process for the large-scale production of influenza virus particles or proteins for the manufacture of a vaccine.

5

In accordance with an aspect of the present invention there is also provided, a large-scale, cell-cultured, microcarrier-based commercial process for the production of influenza virus particles or proteins for the manufacture of influenza

10 vaccines.

The process of this invention is carried out using a MDCK cell line for the multiple replication of the influenza virus. In one embodiment, the MDCK cell line used in the process of this invention has the same biological properties as those of ATCC cell line No. CRL-12042. In one embodiment, the cell line used in the process is a clone of the MDCK cell line internally designated as MDCK.5F1, deposited under ATCC No. CRL-12042.

20 The MDCK-derived cell line of this invention is highly susceptible to viral infection. "Highly susceptible" to viral infection in this context means that the cell line is capable of producing titers that are higher than the titers produced by the parental cell line for at least one viral strain.

25

In one embodiment, "high susceptibility" is defined as a cell line capable of producing a virus at a titer of at least about 1.2 times the titer produced by the parental cell line. In one embodiment, the higher susceptible cell lines are clones

30 selected from the group consisting of: 3B5, 5F1, 1D11, 5H12, 9C2, 9D9, P79, 9E9, 7C1, and P123.

Still, in one embodiment, higher susceptibility is defined as a cell line capable of producing a multiplicity of viruses at a titer of at least about twice the titer produced by the parental cell line for these same viruses. In one embodiment,

35

such a clone is selected from the group consisting of: 3B5, 5F1, 5H12, 9C2, 7C1, and P123.

In one embodiment, higher susceptibility is defined as capable of producing at least about twice the parental viral titer for two different strains of the same virus. In one embodiment, such a clone is capable of producing twice the viral titer of the parent for respiratory syncytial virus and influenza types A and B. In one embodiment, such a clone is selected from the group consisting of 5F1 and 5H12.

In one embodiment, the cell line is capable of being infected by a virus selected from the group consisting of: influenza, respiratory syncytial virus, papovavirus, parainfluenza, vesicular stomatitis, vaccinia, Cocksackie, reovirus, parvovirus, adenovirus, poliomyelitis, measles, rabies, herpes, and other viruses.

In one embodiment, the virus is selected from the group consisting of: influenza types A, B, and C; respiratory syncytial virus; papovavirus; vesicular stomatitis (Indiana strain); Cocksackie B-5; reovirus types 2, and 3; and adenovirus types 4, and 5.

In one embodiment, the virus is selected from the group consisting of: influenza types A, B, and C, and respiratory syncytial virus.

In one embodiment, the virus is selected from human, equine, porcine or avian influenza strains.

In one embodiment, the virus is selected from human influenza types A, B or C.

In one embodiment, the cell line of the invention is capable of being infected by human influenza virus type A or B.

6
9

In one embodiment, the cell line of the invention is capable of being infected by both human influenza virus types A and B.

5 In one embodiment, the cell line of the present invention allows multi-step replication of influenza virus with addition of a proteolytic enzyme such as trypsin, chymotrypsin, pepsin, pancreatin, papain, pronase and carboxypeptidase. In one embodiment, such a cell line allows multi-step replication of
10 influenza virus with the addition of trypsin.

Alternatively, the cell line of the present invention allows multi-step replication of influenza virus without requiring the addition of a proteolytic enzyme such as trypsin, chymotrypsin,
15 pepsin, pancreatin, papain, pronase and carboxypeptidase. In one embodiment, such a cell line allows multi-step replication of influenza virus without requiring the addition of trypsin.

It will be apparent to a person skilled in the art which
20 viruses or virus strains may require the use of a proteolytic enzyme.

Although it is possible to culture the cell line of this invention in suspension, it is preferable that it grow in an
25 anchorage-dependent manner. In one embodiment, it is also capable of growing on microcarrier beads, thereby allowing high concentrations of cells to be obtained in cell culture.

In one embodiment, the MDCK-derived cell line of this invention
30 is non-tumorigenic. In one embodiment the cell line of the invention grows with minimal efficiency (i.e., < 1% efficiency) in soft agar. In one embodiment, the cell line of the invention does not produce nodules in nude mice when observed for at least 3 months.

35

The present invention further contemplates the use of the cell line according to the invention for the production of viral particles or viral proteins in bulk quantity.

5 Such viral particles or proteins can be used in the manufacture of vaccines for the prevention of viral infections in a host. In one embodiment, said host is a mammal. Mammals include, for example, humans, equine, porcine species. In another embodiment, said host is a human. In a further embodiment, the
10 host is an avian species (e.g., duck or chicken).

The process of this invention may be carried out in the presence or absence of trypsin, as long as the presence of trypsin does not affect the ability of anchorage-dependent MDCK
15 cells to grow in culture. In one embodiment, the process is performed in the presence of trypsin at a concentration of about or lower than 4µg/ml. Alternatively, the process is performed in the absence of trypsin.

20 The process described herein is intended for the production of respiratory syncytial virus and a variety of influenza viruses such as human, equine, porcine and avian strains of the influenza virus. In one embodiment, the process described herein is intended for the production of human influenza type
25 A, B or C. In one embodiment, the process described herein is intended for the production of human influenza type A or B. In one embodiment, the process described herein is intended for the production of human influenza type A and type B by using an MDCK cell line that may be infected by either type of virus.

30 The process of this invention provides yields that are in the range of 4µg HA/10⁶ MDCK cells. As is described in Example 9, this process yields virus protein amounts greater than 4µg HA/10⁶ MDCK cells, more particularly in the range of 9µg HA/10⁶
35 MDCK cells.

2
10

"Large-scale process" means a process for producing large amounts of influenza virus. Such a process is usually done in a bioreactor as opposed to a culture flask. Such bioreactor may be of varying size depending on the final yield/doses required. For example, such bioreactor may be of approximately 5 liters in size (with a working volume of about 4 liters), or it may be up to 5000 liters. Of course, as will be apparent for a person skilled in the art of large-scale cell culture-based vaccine production, all reactants, media, nutrients, cell concentrations, microcarrier concentrations, perfusion rates, etc., will be adjusted according to the size of the bioreactor.

The process of this invention may be executed in suspension culture but it is preferable that it be carried out on microcarrier means to increase the cell concentration (and thereby increase viral output). For example, microcarrier beads of the type usually known in the art as dextran polymers (Cytodex™) may be selected. These microcarriers may be used at concentrations ranging from about 5-25 g/L. In one embodiment, the microcarrier concentration is in the range of about 10-25 g/L. In one embodiment, the microcarrier concentration is in the range of about 15-20 g/L.

A perfusing means is introduced to maximize both cell growth and viral replication in the process. Perfusion allows for the constant supply of nutrients while simultaneously providing a means of avoiding the accumulation of potentially toxic by-products in the culture medium. Through perfusion, nutrient type and quantity may be varied during the various stages of the process. For instance, serum may be introduced to the cells during the growth phase but ideally should be eliminated at cell confluency and before introducing the virus. The perfusion flow rate is gradually increased during cell growth to provide adequate nutritional supplies. Perfusion is continued during viral replication.

The perfusion rate is adjusted to between about 0.5 to 4 bioreactor volumes/day, depending on the stage of the process.

5 The perfusing means is added to the bioreactor. It includes inlet means to continuously introduce a culture medium in the bioreactor and two outlet means to continuously remove spent culture medium from the bioreactor (thereby producing a continuous flow of the culture medium through the microcarrier
10 suspension in the bioreactor), and a decanter associated with the outlet means. The decanter herein described and used in the process of the invention was specially designed for a 5 L (3.7 L working volume) bioreactor when it was realized that, with a perfusing means as proposed above and using a
15 concentration of microcarriers in excess of 10 g/L, cell growth was limited by the tendency of the microcarriers to move upwardly and either escape through or clog the outlet means. Therefore, in order to achieve higher microcarrier concentrations, a decanter having the following features was
20 built which minimizes formation of turbulence within the decanter and achieves a speed of microcarrier sedimentation which is faster than the upward flow speed of the suspension.

In accordance with a preferred embodiment of the invention, the
25 decanter 10 as shown in Figure 1, comprises a lower chamber 1 joined to a larger upper chamber 2 by a radial plate 3. The two outlet means 4 are attached to the upper chamber 2 at the top of the decanter. The lower chamber 1 and the upper chamber 2 are semi-cylindrical in shape and surround an axially
30 directed central circular cavity 5 intended to accommodate the central rotating shaft of the bioreactor as well as various probes introduced in the bioreactor to monitor the process of the invention. Solid metal walls complete the decanter.

35 Figure 2 illustrates a top elevational view of elements 2, 4 and 5 described above.

Figure 3 shows a bottom elevational view of the lower chamber 1 of the decanter. The lower chamber 1 has a plurality of regularly distributed longitudinal channels 6 which are
5 separated by radially oriented longitudinal partitions 7, the longitudinal channels being in communication with one another via the upper chamber 2 and the radial plate 3 of the decanter. In one embodiment the longitudinal channels 6 are identical and each has a circular cross-section. In addition, the plurality
10 of longitudinal channels 6 are regularly distributed around the axially directed central circular cavity 5, with the surrounding longitudinal channels 6 being separated from one another by the radially oriented longitudinal partitions 7.

15 The outlet means of the perfusing means is switched from a waste reservoir to a harvest recipient at the moment of infection. Continuous harvesting occurs until replication is complete (about 4-5 days).

20 The process of the invention is carried out by seeding the MDCK cell culture with virus at a multiplicity of infection (M.O.I.) of between $10:1$ - $1:10^{10}$. In one embodiment, the process is carried out at a M.O.I. of between $1:10$ - $1:10^8$. In one embodiment, the process is carried out at a M.O.I. of about
25 $1:10^4$ - $1:10^7$. In one embodiment, the process is carried out at a M.O.I. of about $1:10^5$ - $1:10^6$.

In one embodiment, growth of MDCK cells in the process of this invention is carried out for about 7 to 10 days at a
30 temperature of about $33-40^{\circ}\text{C}$. In one embodiment, growth of MDCK cells in the process is carried out for about 7 days at a temperature of about $36-38^{\circ}\text{C}$.

In one embodiment, growth of MDCK cells in the process is
35 carried out for about 7 days at a temperature of about 37°C .

In one embodiment, viral replication in the process of this invention is carried out for about 4 to 6 days at a temperature of about 30-37°C. In one embodiment, viral replication in the process is carried out for about 5 days at a temperature of about 32-34°C. In one embodiment, viral replication in the process is carried out at a temperature of about 33°C.

Viral particles or proteins are purified in the following way.

10 Filtration of the virus harvest is followed by inactivation of the filtrate with formaldehyde. The resulting inactivated viral suspension is then centrifuged and enriched virus fractions are selected for use in vaccine preparation.

15 A method for the prevention of influenza infection in a mammal, comprising the step of administering the vaccine of the invention is also provided.

A process wherein purified viral particles or proteins are used to produce a diagnostic kit for the detection of influenza virus infections is also provided.

The use of bulk virus particles or proteins isolated for the manufacture of a kit for the detection and diagnosis of influenza virus infection in a mammal is also provided.

Specific examples of the use of our process and propagation of selected strains of human influenza viruses types A and B are discussed below. It will be apparent that various changes may be made in the arrangement and components of the invention without departing from its essence and scope or sacrificing all of its material advantages, the forms hereinafter described being merely preferred or exemplary embodiments.

2/12

EXAMPLES

Example 1 describes the derivation of clone MDCK.5F1. **Example 2** considers the purity of the MDCK.5F1 cell line. **Example 3** illustrates growth of influenza virus with and without trypsin on the MDCK.5F1 cell line. **Example 4** is a summary of tumorigenicity studies on MDCK.5F1. **Example 5** discusses results following the inoculation of nude athymic mice with a cell suspension of MDCK.5F1. **Example 6** is a step-by-step description of a particular embodiment of the process. **Example 7** describes the results of an assay performed using parental MDCK cells and influenza strain A/Shanghai/11/87 with trypsin. **Example 8** describes the results of an assay performed using MDCK.5F1 cells and influenza strain A/Shanghai/11/87 without trypsin. **Example 9** describes the results of an assay performed using MDCK.5F1 cells and influenza strain B/Harbin/7/94 without trypsin.

EXAMPLE 1**Derivation of Clone MDCK.5F1**

MDCK cells No. CCL 34 were obtained from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. The stock was received in frozen state in 1 ml ampoules containing 3.4×10^6 cells. The cell line was at its 54th passage.

After passaging, MDCK cells were harvested at passage 64 and diluted in a nutritive medium composed of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Medium 199 in a 1:1 ratio (DMEM-199) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). The diluted cell suspension was then aliquoted into 96-well plates, such that each well received less than one cell, assuming a uniform distribution of the cells in solution. The plates were placed in a CO₂ incubator at 37°C and examined at weekly intervals

under the light microscope in order to score the wells for growth.

The characteristics sought in the clone were selected from:

5

- (1) higher susceptibility than parental line to viral infection (i.e., clone produces higher titers of virus than the parental line);
- (2) higher susceptibility to more than one virus (In one embodiment, susceptibility to several strains of the influenza virus);
- (3) the ability to allow multi-step replication of influenza virus without requiring the addition of a proteolytic enzyme such as trypsin; and, optionally,
- 15 (4) anchorage-dependency (i.e. to obtain higher concentrations of cells in culture).

Table 1 illustrates the susceptibility of several clones to infection by influenza type A and B viruses without the
20 addition of trypsin.

TABLE 1: Clonal Susceptibility to Infection by Influenza Type A and B Viruses

Clone Number*	Susceptibility to Type A (TCID ₅₀)	Susceptibility to Type B (TCID ₅₀)
3B5	ND	5.6X
5F1	5.5X	3.6X
1D11	0.5X	2.4X
5H12	8.5X	2.2X
9C2	0.5X	2.0X
9D9	ND	1.5X
P79	1.0X	1.0X
8H7	ND	0.6X
9E9	0	1.2X
7C1	0.3X	2.0X
P123	ND	2.8X
Control** (parental MDCK)	1X	1X
ND = Not Detected Control = Parental susceptibility, defined as 1X when assessed by TCID ₅₀ * = Clonal susceptibility was determined without the addition of trypsin in the culture medium ** = Control susceptibility was determined with the addition of trypsin		

5 "High susceptibility" was defined as at least about 1.2 times the susceptibility of the parental cell line when assessed by TCID₅₀. Clones 3B5, 5F1, 1D11, 5H12, 9C2, 9D9, P79, 9E9, 7C1, and P123 were identified as being highly susceptible. Clon s

3B5, 5F1, 1D11, 5H12, 9C2, 9D9, 7C1, and P123 were identified as being at least twice as susceptible as the parent line.

Clones 5F1 and 5H12 were selected as being the two most highly susceptible, and 5F1 was chosen to establish a cell line internally designated as MDCK.5F1.

Cell generation number was defined as zero at the point of cloning and calculated by cell enumeration at each subsequent cell culture. The culture was passaged initially in multi-well plate culture and eventually transferred to plastic flasks.

In addition, experiments were conducted with respiratory syncytial virus to measure the susceptibility to infection by this virus of the parental MDCK cell line and the MDCK.5F1 clone. Viral titers indicated that while the MDCK cell lines are much less susceptible to infection than the respiratory syncytial virus host Hep 2 cell line, the MDCK.5F1 clone was approximately ten times more susceptible to infection by this virus than was the parental MDCK cell line.

EXAMPLE 2

Determination of Clonality of MDCK.5F1

The parameter which determines the clonality of any particular clone picked is the percentage growth on a multi-well plate from which the clone is selected. The probability of the culture selected actually being clonal (i.e., $P(1)$) is determined from this percentage. (See Collier and Collier, *Methods in Enzymology*, vol. 121, pp. 412-417 (Academic Press, 1986).)

Given that 5% of the wells showed growth in this cloning, the probability that cell line MDCK.5F1 is derived from a single cell is $\geq 97.5\%$.

7
14

A 299 ampoule Master Cell Bank (MCB) and a 283 ampoule Manufacturer's Working Cell Bank (WCB) were prepared from the MDCK.5F1 cell line. These banks were prepared in accordance with Canadian guidelines on the principles of Good

Manufacturing Practice and were assessed for contamination in the form of fungal, yeast, mycoplasmal, bacterial and viral agents. No contamination of any kind was found.

Sustainable, viable cultures were obtained from the prepared cell banks and the cell line tested for stability of product production, morphology, tumorigenicity, and isoenzyme characteristics for 50 population doublings beyond the WCB. The results showed the cell line to be stable for these characteristics.

EXAMPLE 3

Experiments illustrating growth of influenza virus in MDCK.5F1 clone with and without addition of trypsin

Experiments were performed to determine the ability of influenza viruses to reproduce in cultures of clone MDCK.5F1 in the presence and absence of trypsin. The results of three experiments using influenza strains A/Johannesburg, A/Texas and B/Harbin appear in Table 2.

TABLE 2: Growth of different influenza strains in MDCK.5F1 clone culture with and without trypsin

Days post-infection	A/Johannesburg *HA		A/Texas *HA		B/Harbin *HA	
	+	-	+	-	+	-
	trypsin	trypsin	trypsin	trypsin	trypsin	trypsin
3	32	24	24	12	128	128

Days post- infection	A/Johannesburg *HA		A/Texas *HA		B/Harbin *HA	
	+	-	+	-	+	-
	trypsin	trypsin	trypsin	trypsin	trypsin	trypsin
4	48	48	96	48	192	128
5	64	64	96	96	128	96
* Hemagglutination (HA) = a mean of two readings for 0.5% chick red blood cells expressed as the inverse of the final dilution after red blood cell addition						

These results reveal that there is no substantial difference when influenza was made to replicate in cell cultures with and without trypsin, as shown by the hemagglutination (HA) titer values.

EXAMPLE 4

Summary of In Vitro Tumorigenicity Studies

Following the method described by Furesz et al (Develop. Biol. Stand. vol. 70, pp. 233-243, S. Kargel ed., Basel, 1989), four ml of 0.6% agar in DMEM-199 medium with 10% (v/v) FBS was allowed to set in tissue culture dishes containing six wells of 35 mm diameter. After setting, these wells were overlaid with 3 ml of medium containing ungelled agar at 0.3% W/V maintained at 42°C and a cell concentration of 60,000 cells/ml. Plates were incubated at 37°C with 5% CO₂. Light microscope observations were made at days 3, 7, 10 and 14. Colonies consisted of four or more cells forming spherical groups in the soft agar. The percentage efficiency was determined by the ratio of number of cell colonies counted divided by the total cell number plated.

TABLE 3: Colony formation in soft agar

Cell line	% Efficiency
HEP 2	22.90
VERO (passage 129)	12.70
MDCK (parental line)	0.70
MDCK.5F1 (passage 12)	0.42
MDCK.5F1 (passage 30)	0.51
MRC-5 (neg. control)	0.00

The results of Table 3 show that the MDCK.5F1 cell line grows with minimal efficiency in soft agar, an indication that it may be non-tumorigenic in animals. This property was maintained 18 passages later, demonstrating that the phenotype is stable.

To further support this finding of non-tumorigenicity, we tested the tumor formation potential of MDCK.5F1 cell line in athymic nude mice.

EXAMPLE 5

Evaluation of tumor formation in nude (nu/nu) athymic mice following subcutaneous inoculation of cell suspension of MDCK.5F1 clone

Nude (nu/nu) athymic mice fail to mount a cell mediated response against foreign materials and therefore will support the growth of allogeneic and heterogeneic tumor cell lines. This permits the assessment of the capability of an inoculum to form neoplasms *in vivo*.

Six week old female nude mice were inoculated subcutaneously with approximately 1×10^7 cells of the test article, MDCK.5F1, followed clinically for 84 days and necropsied. Nude mice inoculated with positive control cells and negative control

cells were treated similarly. The inoculation site (skin), lung, scapular lymph nodes and gross lesions were processed, sectioned, stained and examined microscopically. Further particulars of the experiment are presented below.

5

Inoculation of test and control materials

All mice within each cage were treated identically.

10 Each mouse was inoculated subcutaneously between the scapulae with 0.2 ml of the appropriate inoculum as described below. A 22 gauge needle was used for inoculation and all mice were inoculated on the same day.

15 Groups 1 and 2: Test article, MDCK.5F1 (at a concentration of 5×10^7 cells/ml).
Groups 3 and 4: Positive control (18C1-10T cells at a concentration of 5×10^7 cells/ml).
Groups 5 and 6: Negative control (SHE cells at a
20 concentration of 1×10^7 cells/ml).

All animals were observed every working day and the inoculation site palpated twice a week for a period of up to 84 days.

25

RESULTS

Clinical Findings

All positive control mice were sacrificed and necropsied 14 days post inoculation, because all had large masses with at
30 least one dimension greater than 1 cm at the inoculation site.

All negative control mice were sacrificed and necropsied 84 days post-inoculation.

35 Nine out of 10 test article (5F1) mice were sacrificed and necropsied 84 post-inoculation. One of the 5F1 inoculated mice

7/
16

was sacrificed and necropsied 33 days post-inoculation, because the lesion at the inoculation site, which was progressing began to regress. This lesion was later revealed to be a cyst.

Palpation

5 The ten nude mice inoculated with the positive control article had palpable lesions with at least one dimension greater than 1 cm by day 14 post-inoculation.

Small non-progressing lesions were palpable at the inoculation
10 sites of the ten negative control article inoculated nude mice. These lesions first noted day 4 post-inoculation persisted in eight of the ten negative control mice for the duration of the observation period.

Palpation results are summarized in Table 4.

15

All of the ten 5F1 mice had lesions by day 4 post-inoculation. In nine of the ten 5F1 mice these lesions were small and did not progress. By day 56 post-inoculation, there were no palpable lesions in eight of the test article mice. One 5F1
20 inoculated mouse had an inoculation site lesion which progressed significantly in size between day 25 and day 28 and had markedly decreased in size by day 32 post-inoculation. This lesion was identified as a cyst by microscopic examination (see Table 6). The other mouse presenting a lesion had a localized
25 inflammation.

TABLE 4: Palpation results

Days Post-Inoculation	4	7	11	14	18	21	25	28	32	35	39	41	46	49	53	56	60	63	66	70	74	78	81	84
571																								
Lesion Incidence	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	7/10	6/10	4/9	4/9	4/9	3/9	5/9	2/9	1/9	1/9	2/9	2/9	1/9	1/9	1/9	2/9	3/9
Range of Maximum Dimension of Lesions (mm)	4-9	4-9	4-7	4-7	2-9	2-9	3-6	3-10	3-5	3-6	2-5	2-5	4-5	3-4	3-4	4	3	3	3	2	3	3	3	2-3
Positive Control																								
Lesion Incidence	10/10	10/10	10/10	10/10	-	-	-	-																
Range of Maximum Dimension of Lesions (mm)	4-10	6-11	8-16	10-25	-	-	-	-																
Negative Control																								
Lesion Incidence	10/10	10/10	10/10	9/10	8/10	10/10	6/10	7/10	10/10	9/10	9/10	9/10	7/10	6/10	7/10	7/10	8/10	6/10	7/10	9/10	9/10	8/10	7/10	8/10
Range of Maximum Dimension of Lesions (mm)	4-10	3-9	3-6	2-6	2-7	1-7	1-6	2-6	2-6	2-6	2-6	2-5	2-5	4	3-5	2-5	3-5	3-5	2-4	1-5	1-5	2-5	2-5	2-5

18

Gross Necropsy Findings

Treatment-related gross necropsy findings are summarized in TABLE 5.

5

TABLE 5: Treatment related gross findings

Organ/Lesion	5F1	Positive Control	Negative Control
Skin Inoculation Site (No. Examined)	(10)	(10)	(10)
Mass or Nodule	3	10	6

Masses at the inoculation sites were found in all positive control animals. Masses or nodules were found at the inoculation sites in 10 three of the ten 5F1 mice and six of the ten negative control mice.

Microscopic findings

Lesions of interest are summarized in TABLE 6.

TABLE 6: Treatment-related microscopic findings.

Organ/Lesions	5F1	Positive Control	Negative Control
Skin Inoculation Site (No. Examined)	(10)	(10)	(10)
Fibrosarcoma	0	10	0
Osseous Proliferation	0	0	2
Inflammation, subacute	1	0	0
Cyst	1	0	0
No corollary change detected	1	0	4

Neoplasia (fibrosarcoma) was diagnosed at the inoculation site in all positive control mice. The fibrosarcoma consisted of
5 spindloid cells arranged in bundles of variable density with an interweaving pattern. Collagen deposition was minimal. Adjacent tissues were compressed, but seldom invaded by the neoplasm.

No neoplasms were diagnosed in any negative control mice, however,
10 foci of osseous proliferation were noted at the inoculation sites in two of the negative control article mice. This is thought to represent select differentiation and growth of the SHE cells inoculated as the negative control.

15 No neoplasms were diagnosed in any 5F1 mice, however, a cyst was noted in one mouse and focal subacute inflammation was noted in one other 5F1 mouse.

8/
19

Conclusions

Fibrosarcoma was diagnosed at the inoculation site of all ten of the positive control mice.

5

No neoplasms were present in any of the negative control or test article mice.

Under the conditions of the above study, the test article,
10 MDCK.5F1, is not considered to be tumorigenic.

EXAMPLE 6

General Procedures

a) Cell Multiplication

15

Before seeding the bioreactor, MDCK.5F1 (ATCC No. CRL-12042) cells were passaged a few times for cell amplification. Approximately $5-10 \times 10^6$ cells were thawed in a 37°C water bath, transferred to a polystyrene cell culture flask with nutritive medium and
20 incubated at 37°C. After 3-4 days, cells from this flask were dissociated and used to seed 5 other flasks. The 5 flasks were then used to seed 20 flasks in the same manner. The nutritive medium used for cell growth was Dulbecco's Modified Eagle Medium and Medium 199 in a 1:1 ratio prepared in deionized water and
25 containing 4.5 g/L of glucose, 0.58 g/L of glutamine and 1 g/L of sodium bicarbonate (DMEM-199). The nutritive medium was supplemented with 10% gamma-irradiated fetal bovine serum (I-FBS). The solution used to dissociate the cells in the flasks for cell passaging was a 0.25% trypsin with 0.02% ethylene diamine
30 tetraacetic acid (EDTA) solution prepared in phosphate buffered saline (PBS) without magnesium and calcium.

The cells in the 20 flasks were grown for 3-4 days, trypsinized, collected and used to seed 3 microcarrier cell cultures in 1000-ml spinner flasks containing 3-5 g/L of microcarrier beads. The spinner flasks were incubated at 37°C with stirring maintained at about 50 rpm. Cell growth was continued for 5-7 days after which the cells were trypsinized from the microcarriers and used to seed a 5-L bioreactor (CelliGen™ by New Brunswick of Edison, N.J.).

Trypsinization of the cells from the microcarriers was done in the following way. The microcarrier cell culture was washed twice with a solution of PBS and 0.02% EDTA. After the second cell wash, approximately 200 ml of trypsin solution was poured into the flask and left at 37°C for about 20 minutes with stirring. After cell dissociation was complete, as determined by light microscopy, the cells were recovered from the free microcarriers using DMEM-199 containing 2% I-FBS, then pelleted and resuspended in DMEM-199 containing 10% I-FBS. A cell count was performed and an appropriate number of cells (approximately 10^{10}) used to seed the bioreactor.

20

The spherical beads or microcarriers used for the cell cultures are manufactured by Pharmacia (Sweden) and distributed under the trade name of Cytodex 1. The density of the Cytodex 1 microcarriers was 1.03 (g/ml in 0.9% NaCl) and their size varied between 131 and 220µm, with an average of 180µm. The approximate surface area for cell growth was 4,500 cm²/g microcarrier (dry weight), with one gram containing approximately 6.8×10^6 microcarriers.

30 b) Cell Seeding and Growth in the Bioreactor

A concentration of 15-25 g/L of Cytodex 1 microcarriers was introduced in a 5-L bioreactor (3.7 L working volume). Seeding of

19

the bioreactor was performed as follows. Approximately 4×10^9 - 1×10^{10} cells obtained from the previously prepared stock (see above) were placed in a tubular glass bottle. From a sterile solution of 20 g/L of microcarriers, 55.5-92.5 g of microcarriers (depending on the desired concentration in the culture) were rinsed twice with DMEM-199 and added to the cells in the glass bottle. The bottle was subsequently filled with DMEM-199 containing 10% I-FBS to a final volume of 3.7 L. The contents of the bottle (cells, microcarriers in DMEM-199) were then poured into the bioreactor vessel with the central shaft rotating at about 20 rpm. With the vessel filled, stirring was increased to 50 rpm, the temperature adjusted to 37°C and the dissolved oxygen content maintained between 5-50% of air saturation. The pH of the culture was also maintained at 6.8-7.4. Perfusion of the microcarrier cell culture was started on day 1 at 0.5 volumes/day using DMEM-199 with 2.5% I-FBS and 0.5 g/L magnesium sulfate. Cell growth was continued for approximately 7-10 days and the perfusion flow rate was gradually increased to 2 volumes/day.

20 c) Virus Infection

Before the virus was added to the microcarrier cell culture, perfusion was increased to 4 serum-free volumes/day on the day of infection, the temperature lowered to 33°C and the partial pressure of oxygen controlled at 15% air saturation. At cell confluency and right before virus infection (on the same day), the culture medium was replaced with the same culture medium free of serum and the perfusion rate increased to 4 volumes/day for 7 hours. This ensured that the serum content of the culture was reduced to a minimal level before infection. After that period, perfusion was stopped and human influenza virus of type A or B was introduced into the microcarrier cell culture. The virus was normally diluted with nutritive medium (DMEM-199 medium containing

6.5g glucose/L) before introduction in the bioreactor in order to obtain a M.O.I. in the range of 1:10 to 1:10⁸. The next day, perfusion was maintained at 2 volumes/day until the cytopathic effect was complete. Total destruction of MDCK cells was typically observed within 5 days. The effluent containing influenza virus suspension was then collected and processed to produce a vaccine, as is well known in the art.

d) Inactivation and Purification

10

Purification of monovalent influenza virus was performed in the following manner. The virus harvest collected from the bioreactor, generally between 15-30 L, was first clarified through a 1.2 µm filter (Sartorius Sartopure GF®, 10 inch in length, 0.6 m²) in order to remove large cellular debris. The clarified suspension containing the influenza virus was subsequently inactivated by the addition of 0.125% (V/V) formaldehyde (final concentration) for 16 hours. The inactivated viral suspension was then purified by ion exchange, DNAase treatment and gel filtration.

Enriched virus fractions were selected and represented the premium material to be used in vaccine preparation. These fractions were then pooled and diluted to give a final concentration of 15 µg of HA per strain per dose as currently recommended by international authorities.

e) Vaccine Preparation

30 Viral proteins were diluted to 15µg for each dose of vaccine. Thimerosal (0.01%) was added for preservation and stabilization, respectively, to complete the vaccine.

20

For a standard trivalent vaccine, a monovalent dose of each of the three circulating strains would be mixed and added to the preservative agent and stabilizer described above.

5 Other known preservative agents such as aminomethyl propanol, sorbic acid and polyaminopropyl biguanid, phenylmercuric nitrate, phenylmercuric borate, 2-phenoxyethanol with formaldehyde, phenol, benzethonium chloride and 2-phenoxyethanol can be used for the vaccine preparation. Concentration of these preservative agents
10 will need to be acceptable to industry standards.

EXAMPLE 7

Infection of parental cell line with strain A/Shanghai/11/87 with
15 the addition of trypsin

MDCK cells from the parental line were grown in a CelliGen™ bioreactor. The working volume of the bioreactor was 3.7 L, the microcarrier concentration was 25 g/L and stirring was set at 50
20 rpm. On the seventh day, the culture was infected with human influenza virus designated A/Shanghai/11/87. The M.O.I. was 1:133,000 and 2.5µg/ml trypsin was added to enhance viral replication. TABLE 7 sets out the data relating to the assay while TABLE 8 summarizes the results. The yield of vaccine was
25 9,828 monovalent doses of 15µg HA, based on a total harvest volume of 18 L and Single Radial Diffusion (SRD) assay values of 7.38 µg HA/ml and 9 µg HA/ml. (See TABLE 8.)

**TABLE 7: Data for assay with parental cell line and strain
A/Shanghai/11/87 with the addition of trypsin**

Culture (days)	Post- infection (days)	Temp (°C)	pH	Dissolved O ₂ (% air saturation)	Air Pressure (psi)	O ₂ Pressure (psi)	Perfusion (vol./day)	% Serum	Cell Count in 10 ⁶ cells/ ml
0		37	6.40	5	<<1	<<1		10	1.45
0.16		37	6.40	5	<<1	<<1	1	5	
1		37	6.53	5	<<1	<<1	2	5	1.38
2		37	6.90	5	<<1	<<1	2	5	1.67
3		37	7.01	5	<<1	<<1	3	5	
4		37	6.95	2	<<1	<<1	3	5	
5		37	6.96	3	<<1	2.5	3	5	6.26
6		37	6.70	3	<<1	2.5	3	0	7.69
7	0	34	6.50	5	<<1	1.5	3	0	9.34
8	1	34	6.80	5	<<1	1.5	2	0	
9	2	34	6.70	5	<<1	1.5	2	0	
10	3	34	7.20	5	<<1	1.5	2	0	
11	4	25	7.24	68	<<1	1.51			
12	5	25	7.40	57	<<1	1.5			

5

The total number of cells at the moment of infection is calculated in the following way: 9.34×10^6 MDCK cells/ml $\times$ 3700 ml equals $34,558 \times 10^6$ cells.

12
21

TABLE 8: Results of assay with parental cell line and strain A/Shanghai/11/87 with the addition of trypsin

	HA	TCID ₅₀ /ml (10 ^x)	SRD (μg HA/ml)	Volume (L)	No. of Doses
Seed	1.92	3.2			
Bioreactor sample (time post-infection)					
17 hrs.	neg.	≤2.3			
2 days	192	3.8			
3 days	512	3.8			
5 days	192	3.2	13.2		
Harvest sample (time post-infection)					
0-24 hrs.	neg.	≤1.8			
1-2 days	64	4.0	neg.		
2-3 days	512	3.9	7.38	9	4,428
3-4 days	384	3.9	9.00	9	5,400
Total				18	9,828

5 Calculation of the total amount of HA is determined in the following way: 9,828 doses x 15μg /dose = 147,420 μg HA total. When divided by 34558 x 10⁶ cells =

4.26μg HA/10⁶ MDCK cells.

EXAMPLE 8

Infection of MDCK.5F1 clone with strain A/Shanghai/11/87 without trypsin

- 5 Cells derived from clone MDCK.5F1(ATCC number CRL-12042) were grown in a CelliGen™ bioreactor with a microcarrier concentration of 25 g/L. The working volume of the bioreactor was 3.7 L and stirring was set to 50-55 rpm. On the seventh day, the culture was infected with human influenza virus designated
- 10 A/Shanghai/11/87. No trypsin was added to the bioreactor to enhance the growth of the virus. The M.O.I. was 1:133,000 and the assay produced 32 L with an SRD value of 9.2µg HA/ml, resulting in 19,626 monovalent doses. TABLE 9 summarizes the data for the assay and TABLE 10 lists the results.

15

22

TABLE 9: Data for assay with MDCK.5F1 clone and strain A/Shanghai/11/87 in the absence of trypsin

Culture (days)	Post-Infection (days)	Temp (°C)	pH	Dissolved O ₂ (% air saturation)	Air Pressure (psi)	O ₂ Pressure (psi)	Perfusion (vol./day)	% Serum	Cell Count (x 10 ⁶ cells/ml)
0		37		5	<1	<1		10	2.3
1		37	6.88	5	<1	<1	2	5	1.9
2		37	6.94	5	<1	1	2	5	
3		37	6.59	5	<1	1	3	5	
4		37	6.85	5	<<1	1	3	5	7.9
5		37	6.84	4	<<1	3	3	5	11
6		37	6.82	4	<<1	3	3	5	14.4
7	0	33	6.83	4	<<1	3.5	3-4	0	16.8
8	1	33	6.93	4	<<1	3.5	2	0	
9	2	33	6.95	7	<<1	3.5	2	0	
10	3	33	7.23	7	<<1	3.5	2	0	
11	4	33	7.31	6-7	<<1	3.5	2	0	

5 The total number of cells at the moment of infection is calculated in the following way: 16.8×10^6 MDCK cells/ml x 3700 ml equals $62,160 \times 10^6$ cells.

TABLE 10: Results of assay with MDCK.5P1 clone and strain A/Shanghai/11/87 in the absence of trypsin

	HA	TCID ₅₀ /ml (10 ^x)	SRD (µg HA/ml)	Volume (L)	No. of Doses
Seed	512		14.21		
Bioreactor sample (time post-infection)					
17 hrs.	neg.	3.4			
2 days	384	6.1	7.63		
3 days	512	5.1	13.94		
4 days	128	5.2	6.87		
Harvest sample (time post-infection)					
0-4 days	192	5.2	9.2	32	19,626
Total				32	19,626

Calculation of the total amount of HA is determined in the following way: 19,626 doses x 15µg /dose = 294,390 µg HA total.
When divided by 62,160 x 10⁶ cells =
4.73µg HA/10⁶ MDCK cells.

23

EXAMPLE 9

Infection of MDCK.5F1 clone with strain B/Harbin/7/94 without trypsin

5 Cells derived from clone MDCK.5F1 were grown as described in
EXAMPLE 3 but with a microcarrier concentration of 15 g/L. On the
eighth day, the culture was infected with human influenza virus
designated B-Harbin/7/94. The M.O.I. was 1:10,000. No trypsin
was added to promote viral replication. Data and results from
10 this assay are reproduced in TABLES 11 and 12. The yield was
38,150 doses, based on a harvest of 35 L and an SRD value of 16.35
µg HA/ml.

TABLE 11: Data for assay with MDCK.5F1 clone and strain B-Harbin/7/94 without trypsin

Culture (days)	Post-Infection (days)	Temp (°C)	pH	Dissolved O ₂ (% air saturation)	Air Pressure (psi)	O ₂ Pressure (psi)	Perfusion (vol/day)	% Serum	Cell Count (x 10 ⁶ cells/ml)
0		37		8	<1	<1		10	1.20
1		37	6.87	5	<1	<1	0.5	2.5	1.79
2		37	<7.0	5			0.5	2.5	2.66
3		37	≈7.0	5			0.5	2.5	
4		37	≈7.0	4			1	2.5	
5		37	≈7.0	5			1.5	2.5	3.88
6		37	≈7.0	3			1.5	2.5	11.37
7		37	≈7.0	2.3			2	2.5	13.33
8	0	33	≈7.1	2			4	0	16.70
				13			3		
9	1	33	7.15	15			2	0	
10	2	33	7.1	16			2	0	
11	3	33	7.2	16			2	0	
12	4	33	≥7.2			1.5	2	0	
							4		

5 The total number of cells at the moment of infection is calculated in the following way: 16.7×10^6 MDCK cells/ml $\times$ 3700 ml equals $61,790 \times 10^6$ cells.

3/2
24

TABLE 12: Results of assay with MDCK.5F1 clone and strain B-Harbin/7/94 in the absence of trypsin

	HA	TCID ₅₀ /ml (10 ³)	SRD (µg HA/ml)	Volume (L)	No. of Doses
Seed	128	7.22			
Bioreactor sample (time post-infection)					
19 hrs.	neg.	7.3			
2 days	2048	8.72			
3 days	1024	7.88			
4 days	96	5.97	<7.885		
Harvest sample (time post-infection)					
0-4 days	512	7.88	16.35	35	38,150
Total				35	38,150

5 Calculation of the total amount of HA is determined in the following way: 38,150 doses x 15µg /dose = 572,250 µg HA total. When divided by 61,790 x 10⁶ cells =

9.26 µg HA/10⁶ MDCK cells.

10 Once again, it is shown that the process of this invention gives yields that are equal to or greater than yields given by prior art processes that require the presence of trypsin.

WE CLAIM:

1. A Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-derived cell line characterized in that it has a higher susceptibility to viral infection than its parental MDCK cell line.
2. The cell line according to claim 1, wherein said higher susceptibility is defined as at least about 1.2 time the titer of virus produced in said parental cell line.
3. The cell line according to claim 2, wherein said virus is selected from the group consisting of: influenza, respiratory syncytial virus, papovavirus, parainfluenza, vesicular stomatitis, vaccinia, Coxsackie, reovirus, parvovirus, adenovirus, poliomyelitis, measles, rabies, and herpes viruses.
4. The cell line according to claim 3, wherein said virus is influenza or respiratory syncytial virus.
5. The cell line according to claim 4, wherein said influenza virus comprises human, equine, porcine, or avian strains.
6. The cell line according to claim 5, wherein said influenza virus is selected from human influenza virus types A, B, or C.
7. The cell line according to claim 6, wherein said influenza virus is selected from type A or B.
8. The cell line according to claim 7, wherein said cell line is highly susceptible to both influenza virus types A and B.
9. A MDCK-derived cell line characterized in that it is non-tumorigenic.

42
25

10. The cell line according to any one of claims 1 to 8, characterized in that it is non-tumorigenic.
11. The cell line according to claim 10, wherein said non-tumorigenicity is defined as an absence of palpable nodules in nude mice after about 3 months of observation.
12. A cell line which has the biological properties of ATCC CRL-12042.
13. A cell line defined as ATCC CRL-12042.
14. The cell line according to any one of claims 1 to 13, further characterized in that it is anchorage-dependent.
15. Use of the cell line according to any one of claims 1 to 14 for the production of viral particles or viral proteins for prophylactic, diagnostic, immunotherapeutic or therapeutic purposes.
16. The use according to claim 15, wherein said viral particles or proteins are used for the manufacture of a vaccine used for the prevention of a viral infection.
17. The use according to claim 16, wherein said viral infection is caused by influenza virus.
18. The use according to claim 17, wherein said influenza virus comprises human, equine, porcine, or avian strains.
19. The use according to claim 18, wherein said influenza virus is selected from human influenza types A, B, or C.
20. The use according to claim 19, wherein said virus is human influenza virus type A or B.

21. Use of a cell line defined as ATCC CRL-12042, for the production of viral particles or viral proteins to be used for the manufacture of a vaccine for the prevention of an influenza virus infection.
22. The use according to claim 21, wherein said virus infection is caused by human influenza virus type A or B.
23. The use according to claim 21, wherein said virus infection is caused by both human influenza virus types A and B.
24. A process for the production of influenza virus particles or proteins, comprising:
 - a) growing a Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell line capable of replicating said influenza virus;
 - b) infecting said cell line with a strain of influenza virus and
 - c) incubating to allow replication of said virus; and harvesting said replicated virus.
25. The process of claim 24 which further comprises purifying virus particles or proteins therefrom.
26. The process of claim 24, wherein said MDCK cell line is defined as having the biological properties of ATCC No. CRL-12042.
27. The process of claim 24, wherein said MDCK cell line is defined as ATCC No. CRL-12042.
28. The process of claim 24, wherein said influenza virus comprises human, equine, porcine or avian strains.

92
26

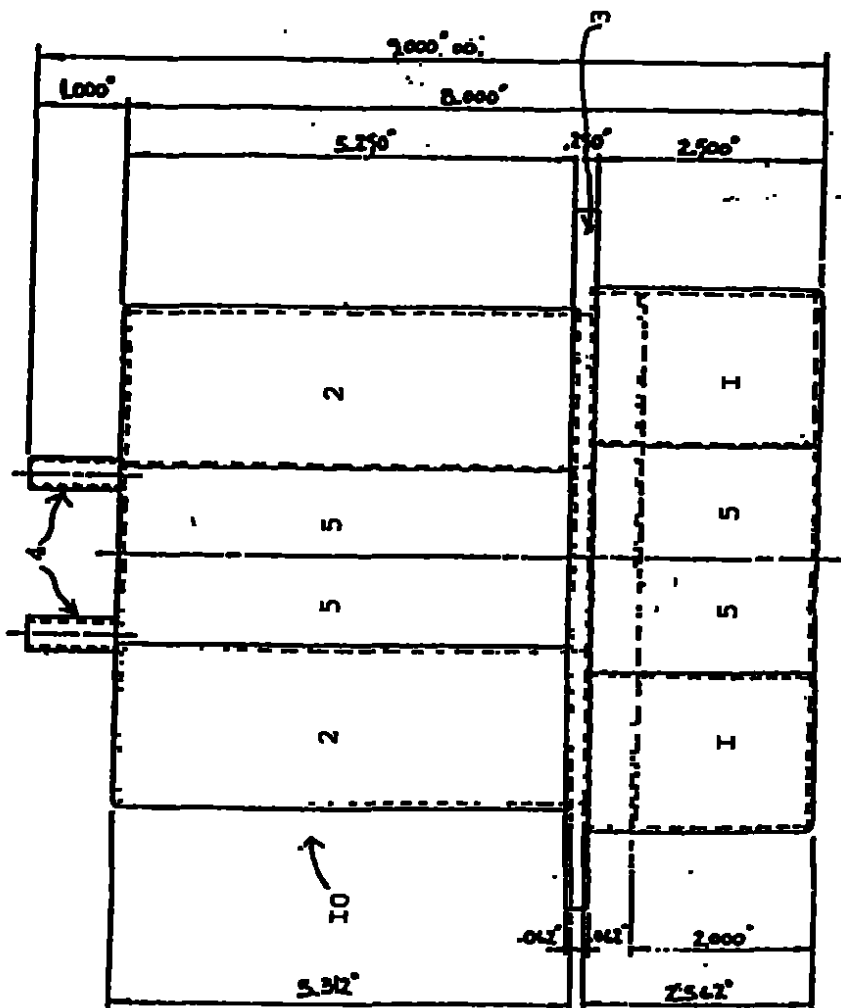
29. The process of claim 24, wherein said virus is selected from the group consisting of human influenza types A, B and C.
30. The process of claim 24, wherein said process is carried out in a bioreactor.
31. The process of claim 30, wherein said bioreactor is about 5 liters in size.
32. The process of claim 30, wherein said bioreactor is from about 5 to 5000 liters in size.
33. The process of claim 24, wherein
in step a), said cells are grown in medium containing microcarrier means, and
in step b), said incubation is carried out with a perfusing means.
34. The process of claim 33, wherein said perfusing means comprises a decanter to avoid leakage of microcarriers in said harvest.
35. The process of claim 33, wherein said microcarrier means comprises microcarrier beads at a concentration of about 5-25 g/L.
36. The process of claim 35, wherein said microcarrier bead concentration is in the range of about 10-25 g/L.
37. The process of claim 35, wherein said microcarrier bead concentration is in the range of about 15-20 g/L.
38. The process of claim 34, wherein said perfusing is carried out at a rate of about 0.5-4.0 volumes of bioreactor per day.

39. The process of claim 24, wherein in step b), said influenza virus is seeded at a multiplicity of infection of about $10:1-1:10^{10}$.
40. The process of claim 24 wherein said influenza virus is seeded at a multiplicity of infection of about $1:10-1:10^8$.
41. The process of claim 24, wherein said influenza virus is seeded at a multiplicity of infection of about $1:10^4-1:10^7$.
42. The process of claim 24, wherein said influenza virus is seeded at a multiplicity of infection of about $1:10^5-1:10^6$.
43. The process of claim 24, wherein in step a), said MDCK cell line is grown for about 7 days.
44. The process of claim 43, wherein said MDCK cell line is grown at a temperature in the range of about $33-40^{\circ}\text{C}$.
45. The process of claim 43, wherein said MDCK cell line is grown at a temperature in the range of about $36-38^{\circ}\text{C}$.
46. The process of claim 24, wherein in step b), said influenza virus is replicated at a temperature of about $30-37^{\circ}\text{C}$.
47. The process of claim 43, wherein said influenza virus is replicated at a temperature of about $32-34^{\circ}\text{C}$.
48. The process of claim 43, wherein said influenza virus is replicated at a temperature of about 33°C .
49. The process of claim 24, wherein said purified virus particles or proteins are used to produce a vaccine to prevent influenza virus infections.

50. A vaccine for the prevention of influenza virus infection in a mammal, as made by the process of claim 49.
51. The vaccine of claim 50, wherein said mammal is a human.
52. A method for the prevention of influenza infection in a mammal, comprising the step of administering the vaccine of claim 50 or 51.
53. A vaccine for the prevention of influenza virus infection in a mammal, comprising the virus particles or virus proteins isolated according to claim 24, in admixture with a preservative agent.
54. The use of the process of claim 24, for the manufacture of a vaccine.
55. The process of claim 24, wherein said purified viral particles or proteins are used to produce a diagnostic kit for the detection of influenza virus infections.
56. The use of bulk virus particles or proteins isolated according to claim 24 for the manufacture of a kit for the detection and diagnosis of influenza virus infection in a mammal.

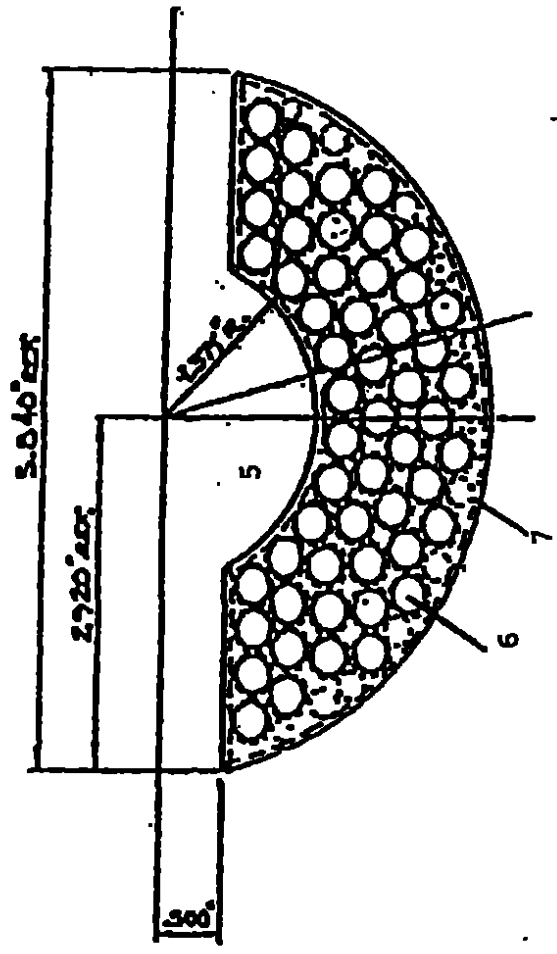
22
28

FIGURE I



28
30

FIGURE 3



1/5
31

Intern. Application No. PCT/US2005/017606	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N7/02 C12N5/00 A61K39/12 A61K39/145 C12N5/06	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	HALPERIN S A ET AL: "Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 7-8, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 1240-1247, XP004332997 ISSN: 0264-410X the whole document -/-
☒	Further documents are listed in the continuation of box C.
☒	Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :	
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'Z' document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 August 2005	Date of mailing of the international search report 02/09/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-8040, Tx. 31 651 apo nl, Fac. (+31-70) 340-8018	Authorized officer Sommerfeld, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No
PCT/US2005/017606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERCHESON P B ET AL: "A PHASE I, RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL TO STUDY THE REACTOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF A NEW SPLIT INFLUENZA VACCINE DERIVED FROM A NON-TUMORIGENIC CELL LINE" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, KARGER, BASEL, CH, vol. 98, 26 September 1997 (1997-09-26), pages 127-132, XP009008177 ISSN: 0301-5149 the whole document	1-56
A	"CELL CULTURE AS A SUBSTRATE FOR THE PRODUCTION OF INFLUENZA VACCINES: MEMORANDUM FROM A WHO MEETING*" BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. BULLETIN DE L'ORGANISATION MONDIALE DE AL SANTE, GENEVA, CH, vol. 73, no. 4, 1995, pages 431-435, XP002040695 ISSN: 0366-4996 cited in the application the whole document	
A	US 6 455 298 B1 (GROENER ALBRECHT ET AL) 24 September 2002 (2002-09-24) the whole document	
A	WO 03/054174 A (BAXTER HEALTHCARE S.A; REITER, MANFRED; MUNDT, WOLFGANG) 3 July 2003 (2003-07-03) * claims *	

75
32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/017606

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 52 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US2005/017606

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6455298	B1	24-09-2002	DE 19612966 A1	02-10-1997
			CA 2250714 A1	09-10-1997
			EP 0904351 A1	31-03-1999
			WO 9737000 A1	09-10-1997
			JP 2000507448 T	20-06-2000
			JP 2004331673 A	25-11-2004
			US 2003073223 A1	17-04-2003
WO 03054174	A	03-07-2003	US 2003108860 A1	12-06-2003
			AU 2002358662 A1	09-07-2003
			CA 2469644 A1	03-07-2003
			CN 1617924 A	18-05-2005
			WO 03054174-A1	03-07-2003
			EP 1453956 A1	08-09-2004
			HU 0402415 A2	28-02-2005
			JP 2005512564 T	12-05-2005

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA VACUNA CONTRA
LA INFLUENZA

Esta solicitud clama el beneficio de la solicitud provincial de la
5 solicitud de los Estados Unidos 60/572,612, presentada el 20 de mayo del
2004, que se incorpora en la presente mediante referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona en general con un
procedimiento a escala comercial para la producción de virus de influenza o
antígenos para propósitos profilácticos, de diagnóstico, inmunoterapéuticos o
terapéuticos. En particular, la invención proporciona un procedimiento basado
en el cultivo de células renales caninas de Madin-Darby (MDCK) para la
15 producción de una vacuna contra la influenza y más en particular una vacuna
humana que comprende la influenza de tipos A y B.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

20 Tradicionalmente las vacunas comerciales contra la influenza se
han producido al desarrollar cepas de virus de vacuna en huevos de gallinas
embrionadas. El virus se cosecha a partir del fluido alantoico y se procesa
para crear una vacuna. Sin embargo, este procedimiento tiene las desventajas

de necesitar intensa mano de obra y que genera bajos rendimientos por huevo, factores que presentan una limitación seria durante periodos epidémicos. Existe por ende una necesidad para la fabricación a gran escala de vacunas de virus contra la influenza que superen las desventajas de costo, tiempo y rendimiento del método de huevo de gallina embrionado.

Un método alternativo para lo anterior involucra el uso de un cultivo de células para producir partículas de virus contra la influenza o proteínas de virus.

Las vacunas contra la influenza producidas con cultivos celulares se cree son más seguras que aquellas producidas en huevos y no deberían inducir la hipersensibilidad a vacunas que experimentan los menores y adultos desarrolladas en huevos. Tales vacunas deberían también conferir una mejor protección a un espectro más amplio de cepas silvestres, en particular en los mayores, porque la fidelidad de la replicación viral se piensa que es mayor en cultivos celulares que en huevos (Katz, J.M., et al, J. Infect Diseases 160:191, 1989). Aun más, en caso de epidemias o pandemias, un mayor suministro de vacunas contra la influenza puede producirse de lo que es actualmente posible debido a limitaciones en el suministro de huevos.

La propagación de los virus de influenza A y B se ha demostrado en una variedad de sistemas de cultivos en tejidos incluyendo embriones picados de pollo, pulmón y riñón de embrión humano, riñón de mono y riñón de embrión bovino.

En particular, las células renales caninas se han sugerido como útiles para la producción del virus de la influenza, aunque con rendimientos bajos, es decir, insuficientes para propósitos de producción de vacuna.

Las células renales caninas se derivaron originalmente en 1958 por S.H. Madin y N.B. Darby a partir de un riñón de un Cocker Spaniel hembra adulto aparentemente normal (American Type Culture Collection (ATCC), Catalogue of Cell Lines Hybridomas, 7th edition, p. 21, 1992). La línea celular MDCK se depositó ante la ATCC en 1964 (bajo el No. CCL 34) y se identificó como que permite la replicación de varios virus, incluyendo estomatitis vesicular, vaccinia, Coxsackie, reovirus, y adenovirus.

La propagación en serie del virus de la influenza tipo B primero fue demostrada en una línea celular MDCK por Green en 1962 (Science 138:42, 1962). La propagación fue evidenciada por la presencia de efectos sicopáticos y de hemaglutinina (HA), la glicoproteína principal del virus de la influenza, en cada uno de seis pasos consecutivos de tejido-cultivo y por títulos con infectividad para el huevo en fluidos de cultivo de tejido. Sin embargo, esos datos son limitados a pequeña escala y no proporcionan un método para lograr una producción a gran escala de películas o proteínas virales para propósitos de vacuna.

Gaush et al. en 1966 demostró que las células MDCK también eran susceptibles a la infección por influenza A. sin embargo, este documento reportó infectividad únicamente y no trató el tema de la propagación del virus en este medio (Gaush et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Y Med., 122: 931, 1966).

En 1975, Tobita et al. describieron por primera vez el crecimiento de una amplia variedad de virus de la influenza A en una línea celular MDCK establecida en un medio de traslape que contenía tripsina. La propagación del virus formó placas bien definidas sin importar su historial de paso previo y se
5 propuso que la tripsina contribuía a la escisión del polipéptido HA, acelerando así la maduración del virus de la influenza. Empero, a pesar del avance que el uso de la tripsina proporcionó, el aislamiento del virus en medio de agar no proporcionó un medio para lograr una producción a gran escala del virus. En la misma referencia, las células MDCK también se utilizaron exitosamente
10 para el aislamiento primario del virus de la influenza A en lavados de garganta de pacientes.

Posteriormente Reuveny et al. cultivó virus de la influenza tipo A en células MDCK en microportadores a base de celulosa en cultivo intermitente (Develop. Biol. Standard 50:115, 1982). El título del virus de la
15 influenza obtenida fue similar en un medio que contenía tripsina como en huevos embrionados.

La patente de los Estados Unidos 4,500,513 (Brown et al.) describe un método para la replicación del virus de la influenza en números sucesivos de células del mismo cultivo líquido al incluir una enzima
20 hidrolizante de proteína como tripsina en el cultivo durante la incubación del virus. La enzima proteolítica se requiere para hacer al HA funcional y con ello superar el ciclo de crecimiento de un paso de técnicas de cultivo líquido

37

pasadas. Ésta es la primera descripción de una producción de vacuna de influenza "comercial" a partir de un cultivo celular líquido.

Sin embargo, se considera ahora que la presencia de tripsina en solución tiene la desventaja de ocasionar que una cierta proporción de células MDCK se levante de su soporte sólido. En consecuencia, el requerimiento de tripsina es una limitación muy seria a la producción comercial de una vacuna contra la influenza, a pesar de la utilidad potencial de este procedimiento patentado. Existe por ello todavía una necesidad para un procedimiento basado en cultivo celular comercial para la producción de una vacuna contra la influenza. Esto es sustentado mediante la siguiente declaración en Kodihalli et al. (J. Virol. 69(8): 4888, 1995): "Los huevos de pollo embrionados son actualmente el único hospedero en el cual suficientes cantidades de virus pueden cultivarse de forma económica y dentro del tiempo breve necesario para asegurar un suministro de vacuna".

También en 1995, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un memorandum que resume discusiones que tuvieron lugar en el verano de 1995, cuando los expertos en el campo se reunieron para evaluar los avances recientes relacionados con procedimientos a base de cultivo celulares para la producción de vacunas contra la influenza (Bull. W.H.O. 73(4): 431, 1995). Este documento hace recomendaciones para trabajos adicionales y lograr una rápida producción de grandes cantidades de vacuna contra la influenza en sistemas de cultivo celular que permitieran un incremento rápido.

Para el crecimiento de virus en cultivos celulares para propósitos de investigación, las células MDCK y Vero son las más frecuentemente conocidas como buenos productos de varios virus. Sin embargo, para propósitos de producción a gran escala varios factores influyen en la elección de una línea celular en particular sobre otra, como la susceptibilidad a uno o a una multiplicidad de virus, producción de títulos virales, dependencia a fijación, tumorigenicidad, etc.

Aunque las células MDCK son susceptibles a varias cepas virales, los escasos títulos resultantes pueden limitar la utilidad de esta línea celular para propósitos de producción a gran escala.

Las propiedades de la línea MDCK han sido el tema de algunos estudios. En 1970, Leighton et al (Cancer 26:1022) reportó que las células MDCK presentaban el patrón morfológico de un adenocarcinoma papilar en preparaciones histopatológicas de cultivos de tejido tridimensionales en una esponja de celulosa revestida con colágeno. La calidad neoplásica de la línea celular se demostró cuando las suspensiones de células que habían sido inyectadas en embriones de pollo de 11 a 12 días de antigüedad se encontraron produciendo muchos focos de metástasis cerebral.

La evaluación de la tumorigenicidad de una línea celular es importante para evaluar su deseo de uso en la producción de producto biológico. El Centro para Evaluación e Investigación Biológica de la Agencia de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos han publicado puntos a considerar cuando se utiliza un cultivo celular como substrato para la

producción de productos biológicos (Ver: *Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals*, Office of Biologics Research and Review, Center for Drugs and Biologics, FDA (E.U.A.), 1993).

Uno de tales puntos es la tumorigenicidad de la línea celular usada y FDA ha
5 implementado directrices para pruebas de tumorigenicidad in vivo. Estas directrices demandan, entre otras cosas, las pruebas a células administradas por ruta subcutánea o intramuscular en ratones sin pelaje (un/un).

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

10

En consecuencia, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la producción a gran escala de partículas virales de influenza o proteínas que comprende los pasos de:

(a) desarrollar una línea celular MDCK capaz de replicar dicho
15 virus de influenza;

(b) infectar el cultivo celular MDCK con una cepa de virus de influenza e incubarlo para permitir la replicación del virus;

(c) cosechar dicho virus replicado y purificar las partículas de virus y proteínas de éste.

20

La invención además contempla una línea celular derivada de la línea celular MDCK que es altamente susceptible a la infección viral y que produce virus de influenza en un mayor título que su línea celular paternal.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una vista en sección frontal de un decantador utilizado en el medio de perfusión de la invención;

5 La figura 2 es una vista en elevación superior de dicho decantador; y

La figura 3 es una vista en elevación inferior de dicho decantador.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10

En una modalidad, la línea celular derivada de MDCK de la presente invención permite la replicación de múltiples pasos de virus de influenza. En otra modalidad, la línea celular MDCK de la presente invención depende de la fijación y no es tumorigénica.

15

La presente invención proporciona una derivación de un clon MDCK que es super-susceptible en la infección viral. La descripción "super-susceptible" se utiliza para indicar una línea celular derivada de MDCK que es altamente susceptible a por lo menos un virus, produciendo así mayores títulos de partículas virales que la línea celular MDCK patenal. Este clon
20 derivado, MDCK.5F1, se depositó ante la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC) el 8 de febrero de 1996 bajo el No. CRL-12042. En la modalidad, la línea celular derivada en MDCK de la presente invención no es tumorigénica en pruebas realizadas en conformidad con directrices de la FDA,

B
41

y por ello puede ser adecuada para su uso en la preparación de virus o antígenos para propósitos profilácticos, de diagnóstico, inmunoterapéutico o terapéutico. La línea celular ha sido probada respecto a la presencia de microorganismos contaminantes y ninguno se ha detectado.

5 De conformidad de la presente invención también se proporciona un procedimiento para la producción a gran escala de partículas o proteínas de virus de la influenza para fabricación de una vacuna.

De conformidad con un aspecto de la presente invención se proporciona también un procedimiento comercial con base en microportador
10 cultivado en célula a gran escala para producción de partículas o proteínas del virus de influenza para la fabricación de vacunas contra la influenza.

El procedimiento de esta invención se lleva a cabo utilizando una línea celular MDCK para la múltiple replicación del virus de la influenza. En una modalidad, la línea celular MDCK utilizada en el procedimiento de esta
15 invención tiene las mismas propiedades biológicas que las de la línea celular ATCC No. CRL-12042. En una modalidad, la línea celular utilizada en el procedimiento es un clon de la línea celular MDCK designada internamente como MDCK.5F1, depositada bajo ATCC No. CRL-12042.

La línea celular derivada de MDCK de esta invención es
20 altamente susceptible a la infección viral. "Altamente susceptible" a la infección viral en este contexto significa que la línea celular es capaz de producir títulos que son mayores que los títulos producidos por la línea celular paternal para por lo menos una cepa viral.

42

En una modalidad, "alta susceptibilidad" se define como una línea celular capaz de producir un virus en un título de por lo menos alrededor de 1.2 veces el título producido por la línea celular paternal. En una modalidad, las líneas celulares más susceptibles son clones seleccionados del grupo que
5 consiste en 3B5, 5F1, 1D11, 5F12, 9C2, 9D9, P79, 9E9, 7C1, y P123.

Aún en otra modalidad, una mayor susceptibilidad se define como una línea celular capaz de producir una multiplicidad de virus en un título de por lo menos alrededor del doble del título producido por la línea celular paternal para estos mismos virus. En una modalidad, dicho clon se
10 selecciona del grupo que consiste en 3B5, 5F1, 5H12, 9C2, 7C1, y P123.

En una modalidad, una mayor susceptibilidad se define como capaz de producir por lo menos alrededor del doble del título viral paternal para dos cepas diferentes del mismo virus. En una modalidad, dicho clon es capaz de producir el doble del título viral del paternal para virus sincitial
15 respiratorio y la influenza tipo A y B. En una modalidad, dicho clon se selecciona del grupo que consiste en 5F1 y 5H12.

En una modalidad, la línea celular es capaz de ser infectada por un virus seleccionado del grupo que consiste en: influenza, virus sincitial respiratorio, papovavirus, parainfluenza, estomatitis vesicular, vaccinia,
20 Coxsackie, reovirus, parvovirus, adenovirus, poliomieltis, sarampión, rabia, herpes y otros virus.

En una modalidad, el virus se selecciona del grupo que consiste en: influenza tipos A, B, y C; virus sincitial respiratorio, papovavirus;

estomatitis vesicular (cepa Indiana); Coxsackie B-5, reovirus tipos 2, y 3; y adenovirus tipos 4, y 5.

En una modalidad, el virus se selecciona del grupo que consiste en influenza tipos A, B y C, y virus sincitial respiratorio.

5 En una modalidad, el virus se selecciona de cepas de influenza humana, equina, porcina o aviar.

En una modalidad, el virus se selecciona de influenza humana tipos A, B o C.

10 En una modalidad, la línea celular de la invención es capaz de ser infectada por el virus de influenza humana tipo A o B.

En una modalidad, la línea celular de la invención es capaz de ser infectada por ambos virus de influenza humana tipos A y B.

En una modalidad, la línea celular de la presente invención permite la replicación en pasos múltiples del virus de la influenza con la
15 adición de una enzima proteolítica como tripsina, quimiotripsina, pepsina, pancreatina, papaína, pronasa y carboxipeptidasa. En una modalidad, dicha línea celular permite la replicación en pasos múltiples del virus de la influenza con la adición de tripsina.

Alternativamente, la línea celular de la presente invención
20 permite la replicación en pasos múltiples del virus de la influenza sin requerir la adición de una enzima proteolítica como tripsina, quimiotripsina, pepsina, pancreatina, papaína, pronasa y carboxipeptidasa. En una modalidad, dicha

línea celular permite la replicación en pasos múltiples del virus de la influenza sin requerir la adición de tripsina.

Será evidente para un experto en la técnica que virus o cepas de virus pueden requerir el uso de una enzima proteolítica.

5 Aunque es posible cultivar la línea celular de esta invención en suspensión, es preferible que crezca en una manera dependiente de la fijación. En una modalidad también es capaz de crecer en perlas microportadoras, permitiendo así altas concentraciones de célula a obtenerse en el cultivo celular.

10 En una modalidad, la línea celular derivada de MDCK de esta invención no es tumorigénica. En una modalidad la línea celular de la invención crece con una eficiencia mínima (es decir <1% de eficiencia) en agar suave. En una modalidad, la línea celular de la invención no produce nódulos en ratones sin pelaje cuando se observan durante por lo menos tres
15 meses.

La presente invención además contempla el uso de la línea celular de conformidad con la invención para la producción de partículas virales o proteínas virales en cantidades volumétricas.

Tales partículas virales o proteínas pueden utilizarse en la
20 fabricación de vacunas para la prevención de infecciones virales en un hospedero. En una modalidad, dicho hospedero es un mamífero. Mamíferos incluyen, por ejemplo, humanos, especies equinas, porcinas. En otra

B
45

modalidad, dicho hospedero es un humano. En una modalidad adicional, el hospedero es una especie aviar (por ejemplo pato o pollo).

El procedimiento de esta invención puede llevarse a cabo en presencia o ausencia de tripsina, siempre y cuando la presencia de tripsina no
5 afecte la cantidad de las células MDCK dependientes de fijación para crecer en el cultivo. En una modalidad, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de tripsina en una concentración de alrededor o menor a 4µg/ml. Alternativamente el procedimiento se lleva a cabo en ausencia de tripsina.

El procedimiento descrito aquí se pretende para la producción de
10 virus sincitial respiratorio y una variedad de virus de la influenza como cepas humana, equina, porcina y aviar del virus de la influenza. En una modalidad, el procedimiento descrito aquí es pretendido para la producción de influenza humana tipo A, B o C. En una modalidad, el procedimiento descrito aquí está pretendido para la producción de influenza humana tipo A o B. En una
15 modalidad, el procedimiento descrito aquí es pretendido para la producción de influenza humana tipo A y B al utilizar una línea celular MDCK que puede ser infectada por cualquier tipo de virus.

El procedimiento de esta invención proporciona rendimientos que están en la escala de 4µg HA/10⁶ células MDCK. Como se describe en el
20 ejemplo 9, este procedimiento genera cantidades de proteína de virus mayores a 4µg HA/10⁶ células MDCK, más particularmente en la escala de 9µg HA/10⁶ células MDCK.

"Procedimiento a gran escala" significa un procedimiento para producir grandes cantidades de virus de influenza. Dicho procedimiento solamente se lleva a cabo en un biorreactor al contrario de un matraz de cultivo. Dicho vía reactor puede ser de tamaño variado dependiendo del

5 **rendimiento final/dosis requerida. Por ejemplo, dicho biorreactor puede ser de aproximadamente 5 litros de tamaño (con un volumen de trabajo de alrededor de 4 litros) o puede ser de hasta 5000 litros. Por supuesto, como será evidente para un experto en la técnica de la producción de vacunas con base en cultivo celular a gran escala, todos los reactivos, medios, nutrientes,**

10 **concentraciones celulares, concentraciones de microportador, porcentajes de perfusión, etc., se ajustarán de conformidad con el tamaño del biorreactor.**

El procedimiento de esta invención puede ejecutarse en un cultivo de suspensión pero es preferible que sea llevado a cabo en un medio microportador para incrementar la concentración celular (y con ello el

15 **rendimiento viral). Por ejemplo, pueden seleccionarse las perlas microportadoras del tipo usualmente conocidas en la técnica como polímeros de dextrano (Cytodex™). Estos microportadores pueden utilizarse en concentraciones en la escala desde alrededor de 5-25 g/L. En una modalidad, la concentración microportadora está en la escala de alrededor de 10-25 g/L.**

20 **En una modalidad, la concentración microportadora está en la escala de alrededor de 15-20 g/L.**

Un medio de perfusión se introduce para aumentar al máximo tanto el crecimiento celular como la replicación viral en el procedimiento. La

perfusión permite el suministro constante de nutrientes mientras que proporciona simultáneamente un medio para evitar la acumulación de subproductos potencialmente tóxicos en el medio de cultivo. A través de la perfusión, el tipo de nutriente y cantidad pueden variarse durante las diversas etapas de procedimiento. Por ejemplo, se puede introducir suero a las células durante la fase de crecimiento pero idealmente debería ser eliminado en la confluencia celular y antes de introducir el virus. El caudal de perfusión aumenta gradualmente durante el crecimiento celular para proporcionar suministrar nutricionales adecuados. La perfusión continúa durante la replicación viral.

La velocidad de perfusión se ajusta a entre alrededor de 0.5 a 4 volúmenes/día de biorreactor, dependiendo de la etapa del procedimiento.

El medio de perfusión se añade al biorreactor. Incluye un medio de entrada para introducir continuamente un medio de cultivo en el biorreactor y los medios de salida para remover continuamente medio de cultivo usado del biorreactor (produciendo así un flujo continuo de medio de cultivo a través de la suspensión microportadora en el biorreactor) y un decantador asociado con el medio de salida. El decantador descrito aquí y usado en el procedimiento de la invención fue diseñado especialmente para un biorreactor de 5 L (volumen de trabajo de 3.7 L) cuando se percibió que, con un medio de perfusión como el propuesto arriba y utilizando una concentración de microportadores superior a 10 g/L, crecimiento celular se limitó por la tendencia de los microportadores a moverse hacia arriba y escapar a través

28
48

de u obstaculizar el medio de salida. Por ello, para lograr mayores concentraciones de microportador, un decantador que tuviera las siguientes características fue construido que reducen al mínimo la formación de turbulencia dentro del decantador y luego una velocidad de sedimentación de microportador que es más rápida que la velocidad de flujo ascendente de la suspensión.

De conformidad con una modalidad preferida de la invención, el decantador 10 como se muestra en la figura 1 comprende una cámara inferior 1 unida a una cámara superior más grande 2 mediante una placa radial 3. Los dos medios de salida 4 están unidos a la cámara superior 2 en la parte superior del decantador. La cámara inferior 1 y la cámara superior 2 son de forma semicilíndrica y rodean una cavidad circular central dirigida axialmente 5 pretendida para albergar la flecha giratoria central del biorreactor así como varias sondas introducidas en el biorreactor para monitorear el proceso de la invención. Paredes de metal sólido completan el decantador.

La figura 2 ilustra una vista en elevación superior de los elementos 2, 4 y 5 descritos arriba.

La figura 3 muestra una vista en elevación de fondo de la cámara inferior 1 del decantador. La cámara inferior 1 tiene una pluralidad de canales longitudinales distribuidos regularmente que están separados por divisiones longitudinales orientadas radialmente 7, los canales longitudinales estando en comunicación uno con otro vía la cámara superior 2 y la placa radial 3 del decantador. En una modalidad los canales longitudinales 6 son idénticos y

49

tienen cada uno una sección transversal circular. Adicionalmente, la pluralidad de canales longitudinales 6 se distribuyen regularmente alrededor de la cavidad circular central dirigida axialmente 5, con los canales longitudinales que lo rodean 6 estando separados uno de otro mediante las divisiones 5 longitudinales orientadas radialmente 7.

El medio de salida del medio de perfusión se intercambia de un depósito de residuos a un receptor de cosecha al momento de la infección. La cosecha continua ocurre hasta que la replicación se completa (alrededor de 4-5 días).

10 El procedimiento de la invención se lleva a cabo al sembrar el cultivo celular MDCK con virus en una multiplicidad de infección (M.O.I.) de entre $10:1-1:10^{10}$. En una modalidad, el procedimiento se lleva a cabo en una M.O.I. de entre $1:10-1:10^8$. En una modalidad, el procedimiento se lleva a cabo a una M.O.I. de alrededor de $1:10^4-1:10^7$. En una modalidad, el
15 procedimiento se lleva a cabo a una M.O.I. de alrededor de $1:10^5-1:10^6$.

En una modalidad, el crecimiento de células MDCK en el procedimiento de esta invención se lleva a cabo durante alrededor de 7 a 10 días a una temperatura de alrededor de $33-40^{\circ}\text{C}$. En una modalidad, el crecimiento de células MDCK en el procedimiento se lleva a cabo durante
20 alrededor de 7 días a una temperatura de alrededor de $36-38^{\circ}\text{C}$.

En una modalidad, el crecimiento de células MDCK en el procedimiento se lleva a cabo durante alrededor de 7 días a una temperatura de alrededor de 37°C .

En una modalidad, la replicación viral en el procedimiento de esta invención se lleva cabo durante alrededor de 4 a 6 días a una temperatura de alrededor de 37-37°C. En una modalidad, la replicación viral en el procedimiento se lleva a cabo durante alrededor de 5 días a una temperatura de alrededor de 32-34°C. En una modalidad, la replicación viral en el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura alrededor de 33°C.

Las partículas o proteínas virales se purifican en la siguiente manera. A la filtración de la cosecha de virus sigue la inactivación del filtrado con formaldehído. La suspensión viral inactivada resultante se centrifuga y se selecciona en las fracciones ricas en virus para su uso en la preparación de vacuna.

Un método para la prevención de infección por influenza en un mamífero, que comprende el paso de administrar la vacuna de la invención también se provee.

Un procedimiento en donde partículas o proteínas virales purificadas se utilizan para producir un equipo de diagnóstico para la detección de infecciones por virus de la influenza también es provisto.

El uso de partículas de virus volumétricas o proteínas aisladas para la fabricación de un equipo para la detección y diagnósticos de infección por virus de influenza en un mamífero también es provisto.

Ejemplos específicos del uso de nuestro procedimiento y la propagación de cepas seleccionadas de virus de influenza humana tipos A y B se discuten a continuación. Será evidente que varios cambios pueden hacerse

51 ~~1~~

en la disposición y componentes de la invención sin desviarse de su esencia y alcance o sacrificar todas sus ventajas materiales, las formas descritas a continuación siendo meramente preferidas para modalidades de ejemplo.

5

EJEMPLOS

El ejemplo 1 describe la derivación del clon MDCK.5F1. El ejemplo 2 considera la pureza de la línea celular MDCK.5F1. El ejemplo 3 ilustra el crecimiento del virus de la influenza con y sin tripsina en la línea celular MDCK.5F1. El ejemplo 4 es un resumen de estudios de tumorigenicidad en MDCK.5F1. El ejemplo 5 discute resultados que siguen a la inoculación de ratones atímicos sin pelaje con una suspensión celular de MDCK.5F1. El ejemplo 6 es una descripción paso a paso de una modalidad particular del procedimiento. El ejemplo 7 describe los resultados de un ensayo realizado utilizando células MDCK paterna y cepa de influenza A/Shanghai/11/87 con tripsina. El ejemplo 8 describe los resultados de un ensayo realizado utilizando células MDCK.5F1 y la cepa de influenza A/Shanghai/11/87 sin tripsina. El ejemplo 9 describe los resultados de un ensayo realizado utilizando células MDCK.5F1 y la cepa de influenza B/Harbin/7/94 sin tripsina.

EJEMPLO 1**Derivación del clon MDCK.5F1**

Células MDCK No. CCL 34 se obtuvieron de la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo Rockville, Maryland. La solución madre se recibió en estado congelado en ampollas de 1 ml que contenían 3.4×10^6 células. La línea celular estaba en su paso 54.

Después del paso, las células MDCK se cosecharon en el paso 64 y se diluyeron en un medio nutritivo compuesto por medio Modified Eagle Medium (DMEM) y Medium 199 de Dulbecco en una relación 1:1 (DMDM-199) que contenía 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS). La suspensión celular diluida luego se hizo en alícuotas en placas de 96 pozos, tal que cada pozo recibió menos de una célula, asumiendo una distribución uniforme de las células en solución. Las placas se colocaron en un incubador de CO₂ a 37°C y se analizaron en intervalos semanales bajo el microscopio óptico con el fin de registrar los pozos para crecimiento.

Las características buscadas en el clon se seleccionaron a partir de:

(1) susceptibilidad superior a la línea paternal para la infección viral (es decir, el clon produce títulos superiores del virus que la línea paternal);

(2) susceptibilidad superior a más de un virus (En una modalidad, susceptibilidad a varias cepas del virus de influenza);

53 3/5

- (3) la capacidad de permitir réplica de múltiples pasos del virus de influenza sin requerir la adición de una enzima proteolítica tal como tripsina; y, opcionalmente,
- (4) dependencia de fijación (es decir, para obtener altas concentraciones de células en el cultivo).

El cuadro 1 ilustra la susceptibilidad de varios clones a infección mediante los virus de la influenza tipos A y B sin la dicción de tripsina.

CUADRO 1

Susceptibilidad clonal a infección por los virus de influenza tipo A y B

Número de clon*	Susceptibilidad al tipo A (TCID ₅₀)	Susceptibilidad al tipo B (TCID ₅₀)
3B5	ND	5.6X
5F1	5.5X	3.6X
1D11	0.5X	2.4X
5H12	8.5X	2.2X
9C2	0.5X	2.0X
9D9	ND	1.5X
P79	1.0X	1.0X
8H7	ND	0.6X
9E9	0	1.2X
7C1	0.3X	2.0X
P123	ND	2.8X
Control** (MDCK parenteral)	1X	1X
ND = No detectada Control = susceptibilidad parenteral, definida como 1X cuando se evalúa mediante TCID ₅₀ * = la susceptibilidad clonal se determina sin la adición de tripsina en el medio de cultivo ** = la susceptibilidad de control se determinó con la adición de tripsina		

“Susceptibilidad elevada” se definió como por lo menos aproximadamente 1.2 veces la susceptibilidad de la línea celular paternal cuando se prueba mediante TCID₅₀. Los clones 3B5, 5F1, 1D11, 5H12, 9C2,

9D9, P79, 9E9, 7C1, y P123 se identificaron como altamente susceptibles. Los clones 3B5, 5F1, 1D11, 5H12, 9C2, 9D9, P79, 9E9, 7C1, y P123 fueron identificados como al menos dos veces tan susceptibles como la línea paterna.

5 Los clones 5F1 y 5H12 se seleccionaron como los dos más altamente susceptibles, y 5F1 se eligió para establecer una línea celular internamente designada como MDCK.5F1.

El número de generación celular se definió como cero en el punto de clonación y se calculó mediante la enumeración celular en cada cultivo celular subsecuente. El cultivo se pasó inicialmente en cultivo en 10 placas de múltiples pozos y finalmente se transfirió a matraces de plástico.

Además, los experimentos se realizaron con virus sincitial respiratorio para medir la susceptibilidad a infección por este virus de la línea celular MDCK paterna y el clon MDCK.5F1. Los títulos virales indicaron que 15 aunque las líneas celulares MDCK son mucho menos susceptibles a infección que la línea celular Hep 2 hospedero del virus sincitial respiratorio, el clon MDCK.5F1 fue aproximadamente diez veces más susceptible a infección por este virus que la línea celular MDCK paterna.

EJEMPLO 2

Determinación de la clonalidad de MDCK.5F1

El parámetro que determina la clonalidad de cualquier clon particular seleccionado es el crecimiento porcentual en las placas de múltiples pozos a partir de los cuales se selecciona el clon. La probabilidad del cultivo seleccionado que es actualmente clonal (es decir, $P(1)$) se determina a partir de este porcentaje. (Véase Collier and Collier, *Methods in Enzymology*, vol. 121, pp. 412-417 (Academic Press, 1986)).

Dado que 5% de los pozos mostraron crecimiento en esta clonación, la probabilidad de que MDCK.5F1 de la línea celular se derive de una sola célula es $\geq 97.5\%$.

Una ampollita 299 del banco Master Cell (MCB) y una ampollita 283 del banco Manufacturer's Working Cell (WCB) se prepararon a partir de la línea celular MDCK.5F1. Estos bancos se prepararon de conformidad con las pautas canadienses en los principios de la Buena Práctica de Fabricación y se evaluaron para contaminación en forma de agentes fúngicos, de levadura, micoplasmiales, bacterianos y virales. No se encontró contaminación de ningún tipo.

De manera sostenible, los cultivos viables fueron obtenidos a partir de los bancos celulares preparados y la línea celular probada para estabilidad de la producción de producción, morfología, tumorigenicidad, y características isoenzimáticas para 50 duplicados de población más allá de

57

Estos resultados revelan que no existe diferencia sustancial cuando la influencia se elaboró para duplicar en cultivos celulares con y sin tripsina, como se muestra mediante los valores de titulación de hemaglutinación (HA).

EJEMPLO 4

Resumen de los estudios de tumorigenicidad *In Vitro*

Después del método descrito por Furesz et al (Develop. Biol. Stand. vol. 70, pp. 233-243, S. Kargel ed., Basel, 1989), cuatro ml de agar al 0.6% en un medio DMEM-199 con 10% (v/v) de FBS se dejó fijar en placas de cultivos de tejido que contienen 6 pozos de un diámetro de 35 mm. Después de ajustar, estos pozos se cubrieron con 3 ml del medio que contiene agar sin gelificar a 0.3% P/V mantenido a 42°C y una concentración celular de 60,000 células/ml. Las placas se incubaron a 37°C con 5% CO₂ al 5%. Se hicieron observaciones en el microscopio óptico en los días 3, 7, 10 y 14. Las colonias consistían en cuatro o más células que forman grupos esféricos en el agar suave. La eficacia porcentual se determinó mediante la relación en número de las colonias celulares contadas divididas entre el número celular total que se puso en placas.

58

CUADRO 3

Formación de colonias en agar suave

5

Línea celular	% de eficacia
HEP 2	22.90
VERO (paso 129)	12.70
MDCK (Línea parenteral)	0.70
MDCK.5F1 (paso 12)	0.42
MDCK.5F1 (paso 30)	0.51
MRC-5 (control neg.)	0.00

10

Los resultados del cuadro 3 muestran que la línea celular MDCK.5F1 crece con eficacia mínima en agar suave, una indicación de que puede ser no tumorigena en animales. Esta propiedad se mantuvo 18 pasos más tarde, demostrando que el fenotipo es estable.

Para soportar además este descubrimiento de no tumorigenicidad, se probó el potencial de formación del tumor de la línea celular MDCK.5F1 en ratones sin pelaje atímicos.

15

EJEMPLO 5

Evaluación de la formación de tumor en ratones atímicos sin pelaje (nu/nu) después de inoculación subcutánea de suspensión celular del clon MDCK.5F1

20

Ratones atímicos sin pelaje (nu/nu) fallaron en montar una respuesta mediada por células contra materiales extraños y por lo tanto soportarán el crecimiento de líneas celulares de tumor alogénico y

59

heterogéneo. Esto permite la evaluación de la capacidad de un inóculo para formar neoplasmas *in vivo*.

Ratones sin pelaje hembra de seis semanas de edad se inocularon subcutáneamente con aproximadamente células 1×10^7 del artículo de prueba, MDCK.5F1, seguido clínicamente durante 84 días y se sometieron a necropsia. Los ratones sin pelaje inoculados con células de control positivo y células de control negativo se probaron de igual manera. El sitio de inoculación (piel), pulmón, nodos linfáticos escapulares y lesiones grandes se procesaron, dividieron, pintaron y examinaron microscópicamente.

10 Las particularidades adicionales del experimento se presentan a continuación.

Inoculación de materiales de prueba y control

Todos los ratones dentro de cada jaula fueron tratados idénticamente.

15 Cada ratón se inoculó subcutáneamente entre la escápula con 0.2 ml de inóculo apropiado como se describió a continuación. Una aguja de calibre 22 se utilizó para inoculación y todos los ratones fueron inoculados el mismo día.

- | | | |
|----|---------------|--|
| 20 | Grupos 1 y 2: | Artículo de prueba, MDCK.5F1 (a una concentración de 5×10^7 células/ml). |
| | Grupos 3 y 4: | Control positivo (células 18C1-10T a una concentración de 5×10^7 células/ml). |
| | Grupos 5 y 6: | Control negativo (células SHE a una concentración de 1×10^7 células/ml). |

Todos los animales se observaron cada día de trabajo y el sitio de inoculación se palpó dos veces a la semana durante un periodo de hasta 84 días.

5

RESULTADOS

Descubrimientos clínicos

Todos los ratones de control positivo fueron sacrificados y sometidos a necropsia 14 días después de la inoculación, ya que todos
10 tuvieron grandes masas con por lo menos una dimensión mayor a 1 cm en el sitio de inoculación.

Todos los ratones de control negativo fueron sacrificados y sometidos a necropsia 84 días después de la inoculación.

Nueve de los diez ratones del artículo de prueba (5F1) fueron
15 sacrificados y sometidos a necropsia 84 días después de la inoculación. Uno de los ratones inoculados 5F1 fue sacrificado y sometido a necropsia 33 días después de la inoculación, ya que la lesión en el sitio de inoculación, que progresó comenzó a retroceder. Posteriormente se reveló que esta lesión era un quiste.

Palpación

Los diez ratones sin pelaje inoculados con el artículo de control positivo tuvieron lesiones palpables con por lo menos una dimensión mayor a 1 cm el día 14 después de la inoculación.

5 Las lesiones pequeñas de no progreso fueron palpables en los sitios de inoculación de diez ratones sin pelaje inoculados del artículo de control negativo. Estas lesiones primero notadas en el día 4 después de la inoculación persistieron en ocho de los diez ratones de control negativo durante el periodo de observación. Los resultados de palpación se resumen
10 en el cuadro 4.

Todos los diez ratones 5F1 tuvieron lesiones en el día 4 después de la inoculación. En nueve de los diez ratones 5F1 estas lesiones fueron pequeñas y no progresaron. Para el día 56 después de la inoculación, no hubo lesiones palpables en ocho de los ratones del artículo de prueba. Un
15 ratón inoculado 5F1 tuvo una lesión en el sitio de inoculación que progresó significativamente en tamaño entre el día 25 y 28 y disminuyó de manera importante en tamaño en el día 32 después de la inoculación. Esta lesión se identificó como un quiste mediante examinación microscópica (véase cuadro 6). El otro ratón que presentó una lesión tuvo inflamación localizada.

CUADRO 4
Resultados de la palpación

5	Días post-insubeción	4	7	11	14	18	21	25	28	32	36	39	41	46	48	53	56	60	63	66	70	74	78	81	84
	SFI																								
	Incidenia de lesión	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	7/10	8/10	4/8	4/8	4/8	3/8	6/8	2/8	1/8	1/8	2/8	2/8	1/8	1/8	1/8	2/8	3/8
10	Escala de dimensión máxima de lesiones (mm)	4-8	4-8	4-7	4-7	2-8	2-8	3-8	3-10	3-6	3-6	2-6	2-6	4-5	3-4	3-4	4	3	3	3	2	2	3	3	2-3
	Control positivo																								
	Incidenia de lesión	10/10	10/10	10/10	10/10	-	-	-	-																
15	Escala de dimensión máxima de lesiones (mm)	4-10	8-11	8-16	10-25	-	-	-	-																
	Control negativo																								
	Incidenia de lesión	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10	10/10	8/10	7/10	10/10	8/10	9/10	8/10	7/10	8/10	7/10	7/10	8/10	8/10	7/10	9/10	8/10	8/10	7/10	8/10
	Escala de dimensión máxima de lesiones (mm)	4-10	3-8	3-8	2-8	2-7	1-7	1-8	2-8	2-8	2-8	2-8	2-6	2-5	2-5	4	3-6	2-6	3-5	3-5	2-4	1-6	1-6	2-5	2-5

63 96

Descubrimientos de la necropsia grande

Los descubrimientos de la necropsia grande relacionada con el tratamiento se resumen en el cuadro 5.

5 **CUADRO 5**

Descubrimientos grandes relacionados con el tratamiento

Organo/lesión	5F1	Control positivo	Control negativo
Sitio de inoculación en la piel (No. examinada)	(10)	(10)	(10)
Masa o nódulo	3	10	6

10 Masas en los sitios de inoculación fueron encontradas en todos los animales de control positivo. Las masas o nódulos fueron encontrados en los sitios de inoculación en tres de los diez ratones 5F1 y seis de los diez ratones de control negativo.

15 **Descubrimientos microscópicos**

Las lesiones de interés se resumen en el cuadro 6.

CUADRO 6

Descubrimientos microscópicos relacionados en el tratamiento

20

Organo/Lesiones	5F1	Control Positivo	Control Negativo
Sitio de inoculación en la piel (No examinada)	(10)	(10)	(10)
Fibrosarcoma	0	10	0
Proliferación ósea	0	0	2
Inflamación subaguda	1	0	0
Quiste	1	0	0
Sin cambio corolario detectado	1	0	4

Se diagnosticó neoplasia (fibrosarcoma) en el sitio de inoculación en todos los ratones de control positivo. El fibrosarcoma consistía en células espinodales dispuestas en grupos de densidad variable con un patrón entretejido. La deposición de colágeno fue mínima. Los tejidos adyacentes fueron comprimidos, pero rara vez invadidos por el neoplasma.

No se diagnóstico neoplasma en ningún ratón de control negativo, sin embargo, los foci de proliferación ósea fueron notados en los sitios de inoculación en dos de los ratones del artículo de control negativo. Se piensa que esto representa una diferencia de selección y crecimiento de las células SHE inoculadas como el control negativo.

No se diagnóstico neoplasma en ningún ratón 5F1, sin embargo, se notó un quiste en un ratón e inflamación subaguda focal se notó en otro ratón 5F1.

15

Conclusiones

Se diagnosticó fibrosarcoma en el sitio de inoculación de los diez ratones de control positivo.

No estuvieron presentes los neoplasmas en ninguno de los ratones de control negativo o del artículo de prueba.

20

Bajo las condiciones del estudio anterior, el artículo de prueba, MDCK. 5F1, no se considera tumorigénico.

EJEMPLO 6**Procedimientos generales****Multiplicación celular**

- 5 Antes de sembrar el biorreactor, las células MDCK. 5F1 (ATCC No. CRL-12042) fueron pasadas pocas veces para amplificación celular. Aproximadamente células $5-10 \times 10^6$ fueron derretidas en un baño con agua a 37°C, transferidas a un matraz de cultivo celular de poliestireno con medio nutritivo e incubadas a 37°C. Después de 3-4 días, las células de este matraz
- 10 fueron disociadas y se utilizaron para sembrar 5 matraces diferentes. Los 5 matraces fueron entonces utilizados para sembrar 20 matraces de la misma manera. El medio nutritivo utilizado para el crecimiento celular fue Dulbecco's Modified Eagle Medium y Medium 199 en una relación 1:1 preparada en agua desionizada y que contiene 4.5 g/l de glucosa, 0.58 g/l de glutamina y 1 g/l de
- 15 bicarbonato de sodio (DMEM-199). El medio nutritivo se suplementado con suero de bovino fetal irradiado con gama al 10% (I-FBS). La solución utilizada para disociar las células en los matraces para paso celular fue una tripsina al 0.25% con solución de ácido tetraacético de etilendiamina al 0.02% (EDTA) preparada en solución salina regulada de fosfato (PBS) sin magnesio y calcio.
- 20 Las células en los 20 matraces crecieron durante 3-4 días, se tripsinizaron, se recolectaron y utilizaron para sembrar 3 cultivos celulares microportadores en matraces giratorios de 1000-ml que contienen 3-5 g/l de perlas del microportador. Los matraces giratorios se incubaron en 37°C con la

65

agitación mantenida a aproximadamente 50 rpm. El crecimiento celular continuó durante 5-7 días después de lo cual las células fueron tripsinizadas de los microportadores y utilizadas para sembrar un biorreactor 5-L (CelliGen™ por New Brunswick of Edison, N.J.).

5 La tripsinización de las células de los microportadores se realizó de la siguiente manera. El cultivo celular del microportador se lavó dos veces con una solución de PBS y EDTA al 0.02%. Después del segundo lavado celular, aproximadamente 200 ml de solución de tripsina se vertieron en un
10 matraz y se dejaron a 37°C durante 20 minutos con agitación. Después de completar la disociación celular, como se determina mediante la microscopia óptica, las células se recuperaron de los microportadores libres utilizando DMEM-199 que contiene 2% I-FBS, posteriormente se formaron en pellas y se resuspendieron en DMEM-199 que contiene 10% I-FBS. Se realizó un conteo celular y un número apropiado de células (aproximadamente 10^{10}) se
15 utilizaron para sembrar el biorreactor.

 Las pellas esféricas o microportadores utilizados para los cultivos celulares se fabricaron por Pharmacia (Suecia) y se distribuyeron bajo el nombre comercial Cytodex 1. La densidad de los microportadores Cytodex 1 fue 1.03 (g/ml en 0.9% de NaCl) y su tamaño varía entre 131 y 220 μm con
20 un promedio de 180 μm . El área superficial próxima para crecimiento celular fue 4.500 cm^2/g microportador (peso seco), con un gamo conteniendo aproximadamente 6.8×10^6 microportadores.

b) Siembra celular y crecimiento en el bioreactor

Una concentración de 15-25 g/l de microportadores Cytodex 1 se introdujo en un biorreactor 5-L (3.7 l de volumen de trabajo). La siembra del biorreactor se realizó de la siguiente manera. Aproximadamente células 4×10^9 - 1×10^{10} obtenidas de la materia previamente preparada (véase arriba) se colocaron en una botella de vidrio tubular. A partir de una solución estéril de 20 g/L de microportadores, 55.5-92.5 g de microportadores (dependiendo de la concentración deseada en el cultivo) se enjuagaron dos veces con DMEM-199 y se agregaron a las células en la botella de vidrio. La botella se llenó subsecuentemente con DMEM-199 que contiene 10% I-FBS a un volumen final de 3.7 L. Los contenidos de la botella (células, microportadores en DMEM-199) entonces se vertieron en el recipiente del biorreactor con el eje central girando a aproximadamente 20 rpm. Con el recipiente lleno, la agitación se incrementó a 50 rpm, la temperatura se ajustó a 37°C y el contenido de oxígeno disuelto se mantuvo entre 5-50% de saturación de aire. El pH del cultivo también se mantuvo a 6.8-7.4. La perfusión del cultivo celular del microportador se inicia en el día 1 en 0.5 volúmenes/día utilizando DMEM-199 con 2.5% I-FBS y 0.5 g/L de sulfato de magnesio. El crecimiento celular continuó durante aproximadamente 7-10 días y la velocidad de flujo de perfusión se incrementó gradualmente a 2 volúmenes/día.

c) Infección por virus

Antes de agregar el virus al cultivo celular del microportador, la perfusión se incrementó a 4 volúmenes libres de suero/día en el día de la infección, la temperatura disminuyó a 33°C y la presión parcial del oxígeno se controló a una saturación de aire del 15%. En la confluencia celular y justo antes de la infección por virus (en el mismo día), el medio de cultivo se reemplazó con el mismo medio de cultivo libre de suero y la velocidad de perfusión incrementó a 4 volúmenes/día durante 7 horas. Esto aseguró que el contenido de suero del cultivo se redujera a un nivel mínimo antes de la infección. Después de ese periodo, la perfusión se detuvo y el virus de la influenza de humano tipo A o B se introdujo en el cultivo celular del microportador. El virus se diluyó normalmente con medio nutritivo (medio DMEM-199 que contiene 6.5 g de glucosa/L) antes de la introducción en el biorreactor con el fin de obtener un M.O.I. en la escala de 1:10 a 1:10⁸. El siguiente día, la perfusión se mantuvo a 2 volúmenes/día hasta que se completó el efecto citopático. La destrucción total de las células MDCK se observó típicamente en 5 días. El efluente que contiene la suspensión del virus de influenza entonces se recolectó y procesó para producir una vacuna, como es bien sabido en la técnica.

20

d) Inactivación y purificación

La purificación del virus de influenza monovalente se realizó de la siguiente manera. El virus cosechado recolectado del biorreactor,

generalmente entre 15-30 L, se clarificó primero a través de un filtro de 1.2 μm (Sartorius Sartopure GF®, con una longitud de 25.4 cm, 0.6 m^2) con el fin de remover el deshecho celular grande. La suspensión clarificada que contiene el virus de la influenza se inactivó subsecuentemente mediante la adición de 0.125% (V/V) de formaldehído (concentración final) durante 16 horas. La suspensión viral inactivada se purificó entonces mediante intercambio iónico, tratamiento por ADNasa y filtración por gel.

Las fracciones del virus enriquecidas se seleccionaron y representaron el material principal a ser utilizado en la preparación de vacuna. Estas fracciones entonces se agruparon y diluyeron para dar una concentración final de 15 μg de HA por cepa por dosis como se recomienda actualmente por las autoridades internacionales.

e) Preparación de la vacuna

Las proteínas virales se diluyeron a 15 μg para cada dosis de vacuna. Thimerosal (0.01%) se agregó para conservación y estabilización, respectivamente, para completar la vacuna.

Para una vacuna trivalente estándar, se mezcla una dosis monovalente de cada una de las tres cepas circulantes y se añade al agente conservador y estabilizador antes descritos.

Para la preparación de la vacuna, se pueden utilizar otros agentes conservadores conocidos tales como aminometil propanol, ácido sórbico y poliaminopropil biguanida, nitrato fenilmercúrico, borato

fenilmercúrico, 2-fenoxietanol con formaldehído, fenol, cloruro de bencetenoio y 2-fenoxietanol. La concentración de estos agentes conservadores necesitará ser aceptable para estándares industriales.

5

EJEMPLO 7**Infección de línea celular paterna con cepa A/Shanghai/11/87 con la adición de tripsina**

Se cultivaron células MDCK a partir de la línea paterna en un
10 biorreactor CellinGen™. El volumen de trabajo del biorreactor era de 3.7 litros, la concentración del microportador era de 25 g/L y la agitación se ajustó a 50 rpm. En el séptimo día, el cultivo se infectó con virus de influenza humano designado A/Shanghai/11/87. La M.O.I. fue 1:133,000 y se añadieron 2.5 µg/ml de tripsina para intensificar la replicación viral. El cuadro 7 expone los
15 datos referentes al ensayo, mientras que el cuadro 8 resume los resultados. El rendimiento de vacuna fue de 9,828 dosis monovalentes de 15 µg de HA, con base en un volumen de cosecha total de 18 L y valores de ensayo de Difusión Radial Sencilla (SRD) de 7.38 µg de HA/ml y 9 µg de HA/ml. (Ver cuadro 8).

21
17

CUADRO 7

Datos para ensayo con línea celular paternal y cepa A/Shanghai/11/87
con la adición de tripsina

5

Cultivos (días)	Post-Infección (días)	Temp (°C)	pH	O ₂ disuelto (% de saturación de aire)	Presión de aire (Kg/cm ²)	Presión de O ₂ (Kg/cm ²)	Perfusión (vol/día)	% de suero	Conc. Celular (x 10 ⁶ células/ml)
0		37	6.40	5	<<0.0703	<<0.0703		10	1.45
0.16		37	6.40	5	<<0.0703	<<0.0703	1	5	
1		37	6.53	5	<<0.0703	<<0.0703	2	5	1.38
2		37	6.90	5	<<0.0703	<<0.0703	2	5	1.67
3		37	7.01	5	<<0.0703	<<0.0703	3	5	
4		37	6.85	2	<<0.0703	<<0.0703	3	5	
5		37	6.98	3	<<0.0703	0.175	3	5	6.26
6		37	6.70	3	<<0.0703	0.175	3	0	7.69
7	0	34	6.50	5	<<0.0703	0.105	3	0	9.34
8	1	34	6.80	5	<<0.0703	0.105	2	0	
9	2	34	6.70	5	<<0.0703	0.105	2	0	
10	3	34	7.20	5	<<0.0703	0.105	2	0	
11	4	25	7.24	68	<<0.0703	0.106			
12	5	25	7.40	57	<<0.0703	0.105			

10

El número total de células al momento de infección se calcula de la siguiente manera: 9.34 x 10⁶ células MDCK / ml x 3700 ml es igual a 34,558 x 10⁶ células.

CUADRO 8

15

Resultados de ensayo con líneas celular paternal y cepa
A/Shanghai/11/87 con la adición de tripsina

20

	HA	TCID ₅₀ /ML (10 ⁴)	SRD (µg) HA/ml)	Volumen (L)	No. de Dosis
Semilla	1.92	3.2			
Muestra de biorreactor (tiempo de post-infección)					
17 hrs.	neg.	≤2.3			
2 días	192	3.8			
3 días	512	3.8			
5 días	192	3.2	13.2		
Muestra de cosecha (tiempo de post-infección)					
0-24 hrs.	neg.	≤1.8			
1-2 días	64	4.0	neg.		
2-3 días	512	3.9	7.38	9	4,428
3-4 días	384	3.9	9.00	9	5,400
Total				18	9,828

El cálculo de la cantidad total de HA se determina de la siguiente manera: $9,828 \text{ dosis} \times 15\mu\text{g} / \text{dosis} = 147,420 \mu\text{g}$ de HA total.

Cuando se divide entre 34558×10^6 células =

$4.26 \mu\text{g HA}/10^6$ células MDCK.

5

EJEMPLO 8

Infección del clon MDCK.5F1 con la cepa A/Shanghai/11/87 sin tripsina

Se cultivaron células derivadas del clon MDCK.5F1 (número de
10 ATCC CRL-12042) en un biorreactor CelliGen™ con una concentración de
microportador de 25 g/L. El volumen de trabajo de biorreactor fue de 3.7 L y la
agitación se ajustó a 50-55 rpm. En el séptimo día, el cultivo se infectó con
virus de influenza humano designado A/Shanghai/11/87. No se añadió tripsina
al biorreactor para intensificar el crecimiento del virus. La M.O.I. fue 1:133,000
15 y el ensayo produjo 32 L con un valor SRD de $9.2 \mu\text{g}$ de HA/ml, dando como
resultado 19,626 dosis monovalentes. El cuadro 9 resume los datos para el
ensayo y el cuadro 10 lista los resultados.

2379

CUADRO 9

Datos para ensayo con clon MDCK.5F1 y cepa A/Shanghai/11/87 en ausencia de tripsina

Cultivo (días)	Post-Infección (días)	Temp. (°C)	pH	O ₂ disuelto (% de saturación de aire)	Presión de aire (kg/cm ²)	Presión de O ₂ (kg/cm ²)	Perfusión (vol/día)	% de suero	Conc. Celular (x 10 ⁶ células/ml)
0		37		5	<<0.0703	<0.0703		10	2.3
1		37	6.88	5	<<0.0703	<0.0703	2	5	1.9
2		37	6.94	5	<<0.0703	0.0703	2	5	
3		37	6.59	5	<0.0703	0.0703	3	5	
4		37	6.85	5	<<0.0703	0.0703	3	5	7.9
5		37	6.84	4	<<0.0703	0.210	3	5	11
6		37	6.82	4	<<0.0703	0.210	3	5	14.4
7	0	33	6.83	4	<<0.0703	0.246	3-4	0	16.8
8	1	33	6.93	4	<<0.0703	0.246	2	0	
9	2	33	6.95	7	<<0.0703	0.246	2	0	
10	3	33	7.23	7	<<0.0703	0.246	2	0	
11	4	33	7.31	6-7	<<0.0703	0.246	2	0	

El número total de células al momento de infección se calcula de la siguiente manera: 16.8 x 10⁶ células MDCK/ml x 3700 ml es igual a 62,160 x 10⁶ células.

CUADRO 10

Resultados de ensayo con clon MDCK.5F1 y cepa A/Shanghai/11/87 en ausencia de tripsina

	Ha	TCID ₅₀ /ml (10 ⁶)	SRD (µg HA/ml)	Volumen (L)	No. de Dosis
Semilla	512		14.21		
Muestra de biorreactor (tiempo post-infección)					
17 hrs.	Neg.	3.4			
2 días	384	6.1	7.63		
3 días	512	5.1	13.94		
4 días	128	5.2	6.87		
Muestra de cosecha (tiempo de post-infección)					
0-4 días	192	5.2	9.2	32	19,626
Total				32	19.626

74

El cálculo de la cantidad total de HA se determina de la siguiente manera: $19,626 \text{ dosis} \times 15 \text{ } \mu\text{g/dosis} = 294,390 \text{ } \mu\text{g}$ de HA total. Cuando se divide entre $62,160 \times 10^6$ células = $4.73 \text{ } \mu\text{g HA}/10^6 \text{ células MDCK}$.

5

EJEMPLO 9

Infección del clon MDCK.5F1 con la cepa B/Harbin/7/94 sin tripsina

Se cultivaron células derivadas del clon MDCK.5F1 según lo descrito en el ejemplo 3 pero con una concentración de microportador de 15 g/l. En el octavo día, el cultivo se infectó con virus de influenza humano designado B-Harbin/7/94. La M.O.I. fue 1:10,000. No se añadió tripsina para promover la replicación viral. Los datos y resultados de este ensayo se reproducen en los cuadros 11 y 12. El rendimiento fue de 38,150 dosis, con base en una cosecha de 35 L y un valor SRD de $16.35 \text{ } \mu\text{g}$ de HA/ml.

4
75

CUADRO 11

Datos para ensayo con clon MDCK.5F1 Y CEPA B-Harbin/7/94 son
tripsina

5	Cultivo (días)	Post- Infección (días)	Temp. (°C)	pH	O ₂ disuelto (% de saturación de aire)	Presión de O ₂ (kg/cm ²)	Presión de O ₂	Perfusión (vol/día)	% de suero	Con. Celular (x 10 ⁶ células/ml)
	0		37		8	<0.0703	<0.0703		10	1.20
	1		37	6.87	5	<0.0703	<0.0703	0.5	2.5	1.79
	2		37	<7.0	5			0.5	2.5	2.66
	3		37	≈7.0	5			0.5	2.5	
	4		37	≈7.0	4			1	2.5	
	5		37	≈7.0	5			1.5	2.5	3.88
	6		37	≈7.0	3			1.5	2.5	11.37
10	7		37	≈7.0	2.3			2	2.5	13.33
	8	0	33	≈7.1	2			4	0	16.70
	9	1	33	7.15	13			3		
	10	2	33	7.1	16			2	0	
	11	3	33	7.2	16			2	0	
	12	4	33	≥7.2			0.105	2	0	
								4		

El número total de células al momento de infección se calcula de
la siguiente manera: 16.7 x 10⁶ células MDCK/ml x 3700 ml es igual a 61,790
x 10⁶ células.

76

CUADRO 12

**Resultados de ensayo con clon MDCK.5F1 y cepa B-Harbin/7/94 en
ausencia de tripsina**

5

	HA	TCID ₅₀ /ml (10 ⁶)	SRD (µg HA/ml)	Volumen (L)	No. de dosis
Semilla	128	7.22			
Muestra de biorreactor (Tiempo post-infección)					
19 hrs.	Neg.	7.3			
2 días	2048	8.72			
3 días	1024	7.88			
4 días	96	5.97	<7.885		
Muestra de cosecha (Tiempo post-infección)					
0-4 días	512	7.88	16.35	35	38,150
Total				35	38,150

10

El cálculo de la cantidad total de HA se determina de la siguiente manera: 38,150 dosis x 15 µg / dosis = 572,250 µg de HA total. Cuando se divide entre 61,790 x 10⁶ células =
9.26 µg HA/10⁶ células MDCK.

15

Una vez más, se muestra que el procedimiento de esta invención da rendimientos que son iguales o mayores a los rendimientos dados por los procedimientos de la técnica anterior que requieren la presencia de tripsina.

77

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Una línea celular derivada de riñón canino de Madin-Darby (MDCK) caracterizada porque tiene una mayor susceptibilidad a la infección viral que su línea celular MDCK paternal.

2.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dicha mayor susceptibilidad se define como por
10 lo menos aproximadamente 1.2 veces el título de virus producido en dicha línea celular paternal.

3.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada además porque dicho virus se selecciona del grupo que consiste en: influenza, virus sincitial respiratorio, papovavirus, parainfluenza,
15 estomatitis vesicular, vaccinia, Coxsackie, reovirus, parvovirus, adenovirus, poliomiелitis, sarampión, rabias, y virus del herpes.

4.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque dicho virus es influenza o virus sincitial respiratorio.

20 5.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada además porque dicho virus de influenza comprende cepas humana, equina, porcina o aviar.

6.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada además porque dicho virus de influenza se selecciona de virus de influenza humano tipo A, B, o C.

5 7.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada además porque dicho virus de influenza se selecciona del tipo A o B.

8.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada además porque dicha línea celular es altamente susceptible a ambos tipos de virus de influenza A y B.

10 9.- Una línea celular derivada de MDCK caracterizada porque no es tumorigénica.

10.- La línea celular de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada además porque no es tumorigénica.

15 11.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada además porque dicha no tumorigenicidad se define como una ausencia de nódulos palpables en ratones sin pelaje después de aproximadamente 3 meses de observación.

12.- Una línea celular la cual tiene las propiedades biológicas de ATCC CRL-12042.

20 13.- Una línea celular definida como ATCC CRL-12042.

14.- La línea celular de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada además porque depende de fijación.

79

15.- El uso de la línea celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la producción de partículas virales o proteínas virales para propósitos profilácticos, de diagnóstico, inmunoterapéuticos o terapéuticos.

5 16.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 15, en donde dichas partículas o proteínas virales se utilizan para la elaboración de una vacuna utilizada para la prevención de una infección viral.

17.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 16, en donde dicha infección viral es ocasionada por el virus de influenza.

10 18.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 17, en donde dicho virus de influenza comprende cepas humana, equina, porcina o aviar.

15 19.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 18, en donde dicho virus de influenza se selecciona de los tipos de influenza A, B, o C.

20.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 19, en donde dicho virus es virus de influenza humano tipo A o B.

20 21.- El uso de una línea celular definida como ATCC CRL-12042, para la producción de partículas virales o proteínas virales que serán utilizadas para la elaboración de una vacuna para la prevención de una infección por virus de influenza.

22.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 21, en donde dicha infección por virus es ocasionada por el virus de influenza humano tipo A o B.

23.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 21, en
5 donde dicha infección por virus es ocasionada por ambos tipos de virus de influenza humano A y B.

24.- Un procedimiento para la producción de partículas o proteínas de virus de influenza, que comprende: a) cultivar una línea celular renal canina de Madin-Darby (MDCK) capaz de replicar dicho virus de
10 influenza; b) infectar dicha línea celular con una cepa de virus de influenza y c) incubar para permitir la replicación de dicho virus; y cosechar dicho virus replicado.

25.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque comprende adicionalmente purificar partículas o
15 proteínas virales a partir de las mismas.

26.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dicha línea celular MDCK se define por tener las propiedades biológicas de ATCC No. CRL-12042.

27.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24,
20 caracterizado además porque dicha línea celular MDCK se define como ATCC No. CRL-12042.

28.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dicho virus de influenza comprende cepas humana, equina, porcina o aviar.

5 29.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dicho virus se selecciona del grupo que consiste en influenza humana tipos A, B y C.

30.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dicho procedimiento se lleva a cabo en un biorreactor.

10 31.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado además porque dicho biorreactor tiene aproximadamente 5 litros de tamaño.

32.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado además porque dicho biorreactor tiene de aproximadamente 5 a
15 5000 litros de tamaño.

33.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque en el paso a), dicha células se cultivan en un medio que contiene medios microportadores; y en el paso b), dicha incubación se lleva a cabo con medios de perfusión.

20 34.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado además porque dichos medios de perfusión comprenden un decantador para evitar fuga de microportadores en dicha cosecha.

82(3)

35.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado además porque dichos medios microportadores comprenden perlas del microportador a una concentración de aproximadamente 5-25 g/l.

5 36.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado además porque dicha concentración de perlas del microportador está en la escala de aproximadamente 10-25 g/l.

37.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado además porque dicha concentración de perlas del microportador está en la escala de aproximadamente 15-20 g/l.

10 38.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque dicha perfusión se lleva a cabo a una velocidad de aproximadamente 0.5-4.0 volúmenes de biorreactor al día.

39.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque en el paso b), dicho virus de influenza se
15 siembra a una multiplicidad de infección de aproximadamente $10:1-1:10^{10}$.

40.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dicho virus de influenza se siembra a una multiplicidad de infección de aproximadamente $10:1-1:10^8$.

41.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24,
20 caracterizado además porque dicho virus de influenza se siembra a una multiplicidad de infección de aproximadamente $1:10^4-1:10^7$.

42.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dicho virus de influenza se siembra una multiplicidad de infección de aproximadamente $1:10^5$ - $1:10^6$.

5 43.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque en el paso a), dicha línea celular MDCK se cultiva durante aproximadamente 7 días.

44.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado además porque dicha línea celular MDCK se cultiva a una temperatura en la escala de aproximadamente 33-40°C.

10 45.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 43 caracterizado además porque dicha línea celular MDCK se cultiva a una temperatura en la escala de aproximadamente 36-38°C.

15 46.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque en el paso b), dicho virus de influenza se replica a una temperatura de aproximadamente 30-37°C.

47.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado además porque dicho virus de influenza se replica a una temperatura de aproximadamente 32-34°C.

20 48.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado además porque dicho virus de influenza se replica a una temperatura de aproximadamente 33°C.

49.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dichas partículas o proteínas virales purificadas

se utilizan para producir una vacuna para prevenir infecciones por virus de influenza.

50.- Una vacuna para la prevención de infección por virus de influenza en un mamífero, elaborada de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 49.

51.- La vacuna de conformidad con la reivindicación 50, caracterizada además porque dicho mamífero es un humano.

52.- Un método para la prevención de infección de influenza en un mamífero, que comprende el paso de administrar la vacuna de la reivindicación 50 o 51.

53.- Una vacuna para la prevención de infección por virus de influenza en un mamífero, que comprende las partículas virales o proteínas virales aisladas de acuerdo con la reivindicación 24, en combinación con un agente conservador.

54.- El uso del procedimiento de la reivindicación 24, para la elaboración de una vacuna.

55.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque dichas partículas o proteínas virales purificadas se utilizan para producir un equipo de diagnóstico para la detección de infecciones por virus de influenza.

56.- El uso de partículas o proteínas virales voluminosas aisladas de acuerdo con la reivindicación 24 para la elaboración de un equipo para la detección y diagnóstico de infección por virus de influenza en un mamífero.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento a escala comercial para la producción de virus de influenza o antígenos para propósitos
5 profilácticos, de diagnóstico, inmunoterapéuticos o terapéuticos; particularmente, la invención provee una línea celular derivada de riñón canino de Madin-Darby (MDCK), línea celular y un procedimiento a base de cultivo celular para la producción de una vacuna contra influenza y en particular, una vacuna humana que comprende influenza tipos A y B.

10

15

20

8A*3A*4A/aom*igp*mmf*kra*

P06/2075F

PATENT COOPERATION TREATY

ms ms/msk
RECEIVED

SEP 09 2005 86

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

SEED INTELLECTUAL PROPERTY
LAW GROUP PLLC

To:

SEED INTELLECTUAL PROPERTY LAW
GROUP PLLC
Attn. Rosok, Mae Joanne
Suite 6300
701 Fifth Avenue
Seattle, WA 98104-7092
UNITED STATES OF AMERICA

no supp. IDS-

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

NO - Demand Due (priority)
Mar. 20, 2006
ENTERED IN DOCKET

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

02/09/2005

Applicant's or agent's file reference

480094.429PC

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2005/017606

International filing date
(day/month/year)

20/05/2005

Applicant

ID BIOMEDICAL CORPORATION

RT - Volun. Amend.
Nov. 2, 2005
ENTERED IN DOCKET

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Stefanie Büchler

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

37 20

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

388

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 48.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 480094.429PC	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/017606	International filing date (day/month/year) 20/05/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 20/05/2004
Applicant ID BIOMEDICAL CORPORATION		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2005/017606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N7/02 C12N5/00 A61K39/12 A61K39/145 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HALPERIN S A ET AL: "Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 7-8, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 1240-1247, XP004332997 ISSN: 0264-410X the whole document -/-	1-56

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2005

Date of mailing of the international search report

02/09/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sommerfeld, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2005/017606

10-9

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERCHESON P B ET AL: "A PHASE I, RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL TO STUDY THE REACTOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF A NEW SPLIT INFLUENZA VACCINE DERIVED FROM A NON-TUMORIGENIC CELL LINE" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, KARGER, BASEL, CH, vol. 98, 26 September 1997 (1997-09-26), pages 127-132, XP009008177 ISSN: 0301-5149 the whole document	1-56
A	"CELL CULTURE AS A SUBSTRATE FOR THE PRODUCTION OF INFLUENZA VACCINES: MEMORANDUM FROM A WHO MEETING" BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. BULLETIN DE L'ORGANISATION MONDIALE DE AL SANTE, GENEVA, CH, vol. 73, no. 4, 1995, pages 431-435, XP002040695 ISSN: 0366-4996 cited in the application the whole document	
A	US 6 455 298 B1 (GROENER ALBRECHT ET AL) 24 September 2002 (2002-09-24) the whole document	
A	WO 03/054174 A (BAXTER HEALTHCARE S.A; REITER, MANFRED; MUNDT, WOLFGANG) 3 July 2003 (2003-07-03) * claims *	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/017606

92

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 52 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/017606

93

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6455298	B1	24-09-2002	DE 19612966 A1	02-10-1997
			CA 2250714 A1	09-10-1997
			EP 0904351 A1	31-03-1999
			WO 9737000 A1	09-10-1997
			JP 2000507448 T	20-06-2000
			JP 2004331673 A	25-11-2004
			US 2003073223 A1	17-04-2003
WO 03054174	A	03-07-2003	US 2003108860 A1	12-06-2003
			AU 2002358662 A1	09-07-2003
			CA 2469644 A1	03-07-2003
			CN 1617924 A	18-05-2005
			WO 03054174 A1	03-07-2003
			EP 1453956 A1	08-09-2004
			HU 0402415 A2	28-02-2005
			JP 2005512564 T	12-05-2005

PATENT COOPERATION TREATY

94 47

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/017606

International filing date (day/month/year)
20.05.2005

Priority date (day/month/year)
20.05.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N7/02, C12N5/00, A61K39/12, A61K39/145, C12N5/06

Applicant
ID BIOMEDICAL CORPORATION

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Sommerfeld, T

Telephone No. +49 89 2399-7197



AS ✓

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/017606

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☐ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

96 58

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/017606

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, Inventive step and Industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 52

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 52 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

97 47

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/017606

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, Inventive step or
Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	30-48, 55, 56
	No: Claims	1-29, 49-54
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-56
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-51, 53-56
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

93 98

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/017606

Reference is made to the following documents:

- D1: HALPERIN S A ET AL: "Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 7-8, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 1240-1247, XP004332997 ISSN: 0264-410X
- D2: PERCHESON P B ET AL: "A PHASE I, RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL TO STUDY THE REACTOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF A NEW SPLIT INFLUENZA VACCINE DERIVED FROM A NON-TUMORIGENIC CELL LINE" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, KARGER, BASEL, CH, vol. 98, 26 September 1997 (1997-09-26), pages 127-132, XP009008177 ISSN: 0301-5149

Introduction

The present application discloses a process for commercial-scale production of influenza virus for use as vaccine, by using a MDCK-derived cell line with higher infectivity than the parental cell line.

Section III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claim 52 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Section V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Both documents D1 and D2 disclose an influenza vaccine produced by a MDCK-derived cell line designated BV-5F1, which allows for large-scale production of influenza virus using microcarriers (D2 abstract). This cell line is further disclosed as

995

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/017606

being non-tumorigenic and free from contaminants (D1 page 1246 right column lines 2 and 3 from bottom; D2 page 129 section "Results and Discussion" and abstract). This cell line appears to be the same as the one of the present application with the ATCC number CRL-12042 (see e.g. page 18 lines 4-6). Documents D1 and D2 are thus considered novelty destroying for the subject-matter of at least claims 1-29 and 49-54 (Art. 33(2) PCT).

2. Further claims, if at all novel, merely add features which are considered technical variations of a non-novel subject-matter and are thus considered to lack an inventive step (Art. 33(3) PCT).

1002

PATENT COOPERATION TREATY

Int'l Appln. No.: PCT/US2005/017606

Int'l Filing Date: 20 May 2005

Applicant(s): ID Biomedical Corporation

Title: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF AN INFLUENZA
VACCINE

Docket No.: 480094.429PC

Transmittal Date: 6 November 2006

Via Facsimile Only (011 41 22 338 82 70)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

**REQUEST FOR UPDATE IN ADDRESS OF APPLICANT FOR ALL STATES
EXCEPT THE UNITED STATES**

Dear Sir or Madam:

Applicants respectfully request that the address for the corporate applicant, ID Biomedical Corporation, be updated as indicated below and that the notice confirming the recordation be provided to the Applicants' Agent of Record via Form PCT/IB/306.

**ID Biomedical Corporation
525 Cartier Boulevard West
Laval, Quebec H7V 3S8 CANADA**

Respectfully submitted,
Seed Intellectual Property Law Group PLLC



**Mac Joanne Rosok
U.S. PTO Registration No. 48,903**

MJR:mla

Seed Intellectual Property Law Group PLLC
701 Fifth Avenue, Suite 6300
Seattle, Washington 98104-7092 U.S.A.
Facsimile: (206) 682 6031

860324_1.DOC

RECEIVED

JUL 21 2005

SEED INTELLECTUAL PROPERTY
LAW GROUP PLLC

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 12 July 2005 (12.07.2005)		To: ROSOK, Mac, Joanne Seed Intellectual Property Law Group PLLC Suite 6300 701 Fifth Avenue Seattle, WA 98104-7092 ETATS-UNIS D'AMERIQUE	
Applicant's or agent's file reference 480094.429PC ✓		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/US2005/017606		International filing date (day/month/year) 20 May 2005 (20.05.2005)	
International publication date (day/month/year)		Priority date (day/month/year) 20 May 2004 (20.05.2004)	
Applicant ID BIOMEDICAL CORPORATION et al			

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
20 May 2004 (20.05.2004) ✓	60/572,812	US	04 July 2005 (04.07.2005)

10-7

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Beate Giffo-Schmitt (Fax 338-87-20) Facsimile No. (41-22) 338.87.20 Telephone No. +41 22 338 9241
---	---

Facsimile No. +41 22 338 82 70
Form PCT/IB/304 (January 2004)

CIP9DBJ8

FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS

Royal
Technologies S.A.
Calle 100 No. 100, Bogotá, D.C.

Expediente No		06119202	No de Folio
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	1	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

Contiene 2 figuras

102

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la Invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Fdo B
Firma Responsable

Fecha 24-NOV-6

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

90-DIC 06

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: ID BIONMEDICAL CORPORATION Dirección: 525 Carver Boulevard West Laval, Québec H7V 3S8 Canada Nacionalidad o domicilio: Québec Canada Lugar de constitución: Canada		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO Cual _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTR ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
	4) INVENTOR (ES) (72) Nombre: 1. TREPANIER, Pierre; 2. DUGRE, Robert; 3. HASSELL, Tom Dirección: 1. 1 Place Bellerive, Laval, Québec H7V 1B1, Canada; 2. 375 Des Camellias, Ste-Therese, Québec J7E 5L8 Canada; 3. 28-Sommerset Way, Apt. 1226, North York, Notario M2N 6W7 Canada Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Canadienses		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2005/017606 Fecha: Mayo 20, 2005 Publicación Internacional No. WO2005/113758 A1 Fecha: Dic. 1, 2006 ?			
6) Título (54) PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA CONTRA LA INFLUENZA			
7) Clasificación Internacional: C12N 7/01, 5/00, A61K 39/12, 39/145, C12N 5/06			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Mayo 20 de 2004
		(31) Número de Solicitud	60/572,612
9) Compromiso de pago No. 08-88-956 Fecha: May 17, 2006			

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

5 1.- Una línea celular derivada de riñón canino de Madin-Darby (MDCK) caracterizada porque tiene una mayor susceptibilidad a la infección viral que su línea celular MDCK patenal.

 2.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dicha mayor susceptibilidad se define como por
10 lo menos aproximadamente 1.2 veces el título de virus producido en dicha línea celular patenal.

 3.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada además porque dicho virus se selecciona del grupo que consiste en: influenza, virus sincitial respiratorio, papovavirus, parainfluenza,
15 estomatitis vesicular, vaccinia, Coxsackie, reovirus, parvovirus, adenovirus, poliomieltitis, sarampión, rabias, y virus del herpes.

 4.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque dicho virus es influenza o virus sincitial respiratorio.

20 5.- La línea celular de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada además porque dicho virus de influenza comprende cepas humana, equina, porcina o aviar.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

871

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	6 119202
	Solicitud internacional	PCT/US2005/017606
	Fecha inicio fase nacional	20/12/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	14705

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
4. Debe aclarar la fecha de publicación internacional por cuanto difiere el petitorio presentado en fase nacional del presentado en fase internacional.

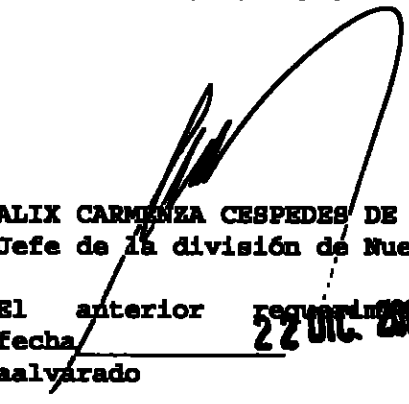
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese al presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:6 119202



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 22 DIC. 2008
a alvarado