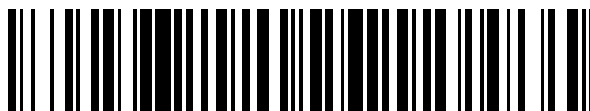


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 166**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2008** **E 08828326 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014** **EP 2192917**

54 Título: **Procedimiento para la producción de vacunas víricas**

30 Prioridad:

28.08.2007 US 966724 P

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

08.05.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)

One Baxter Parkway

Deerfield, IL 60015, US y

BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

KISTNER, OTFRIED;

TAUER, CHRISTA;

BARRETT, NOEL y

MUNDT, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 459 166 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de vacunas víricas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para la producción de vacunas víricas.

Descripción de la técnica relacionada

10

Una vacuna es una composición inmunógena de una sustancia antigénica, por ejemplo, un patógeno (no infeccioso) tal como un virus, su cubierta, partículas o sus antígenos proteicos. La administración o la vacunación dan como resultado la inmunización de un sujeto, por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano, o un ave. La vacunación podría producir una reacción específica a la vacuna y alguna inflamación leve, pero generalmente esto es mucho menos perjudicial que una infección por un virus completamente viable para cuya prevención está diseñada la

15

vacuna. El sistema inmunitario de los sujetos se adaptará por sí mismo para reconocer específicamente los antígenos de la vacuna e inactivará rápidamente el patógeno tras una exposición subsiguiente del sujeto al patógeno. Por lo tanto, a través de la vacunación se consigue un aumento en la resistencia frente al patógeno.

20

Con fines vacunales, convencionalmente se cultiva un virus en un cultivo celular adecuado o generalmente un sustrato celular. En el caso de la gripe se usan normalmente huevos de pollo embrionados. La cosecha de virus infecciosos se recoge y se purifica para eliminar los constituyentes celulares no víricos no deseados. En particular, en el caso de vacunas derivadas de sustratos de pollo, son posibles reacciones alérgicas a las proteínas del pollo/huevo en ciertos individuos susceptibles.

25

Una etapa fundamental en la producción de vacunas víricas es la inactivación del virus infeccioso. La formalina (una disolución acuosa de formaldehído) es el agente de inactivación usado con más frecuencia en la elaboración de vacunas. Habitualmente se usa en forma de una disolución acuosa saturada con una concentración de aproximadamente el 37 % de formaldehído. El formaldehído inactiva un virus mediante la reticulación irreversible con los grupos de amina primaria de las proteínas superficiales con otros átomos de nitrógeno próximos de la proteína o del ADN a través de un enlace $-CH_2-$. En particular, estas reticulaciones podrían dar lugar a enlaces con sustancias no víricas, y por lo tanto es necesario realizar alguna purificación previa sobre el virus infeccioso vivo, dado que la inactivación previa a la purificación daría lugar a una gran cantidad de puentes químicos irreversibles entre las proteínas víricas y las impurezas, que son perjudiciales para la eficacia de las operaciones de purificación y la

30

calidad del producto. Por esta razón, los virus infecciosos vivos son en primer lugar purificados al menos parcialmente en la técnica anterior, por ejemplo, mediante ultracentrifugación zonal, y después inactivados (documento US6.048.537). La etapa de inactivación con formalina ha sido validada con procedimientos analíticos establecidos.

35

Como complemento al tratamiento con formalina, se ha considerado la inactivación mediante UV para su integración en el proceso de elaboración. El uso de una inactivación mediante irradiación ultravioleta en vacunas para seres humanos ha sido mostrado previamente para virus sin cubierta y con cubierta (documento US2006/0270017). Dado que el genoma vírico es más susceptible a los daños por UV que los antígenos de la superficie del virus, se ha demostrado que la inactivación mediante UV tiene pocos efectos negativos sobre las características bioquímicas o la

40

inmunogenicidad del producto. Los objetivos para la inactivación mediante UV son principalmente los ácidos nucleicos, al contrario que las proteínas, a las que se dirige la formalina.

45

Mediante la combinación de la inactivación con formalina y UV, los científicos intentaron superar las limitaciones de la inactivación por UV o la inactivación por formalina por separado, respectivamente, para inactivar familias de virus particularmente resistentes.

50

Alternativamente, muchos fabricantes usan etapas del proceso basadas en detergentes tanto para inactivar el virus vivo como para modificar el virus. Estos procesos basados en detergentes desorganizan la cubierta lipídica del virus de la gripe para producir un antígeno de vacuna fraccionado (parcialmente desorganizado) o en subunidad (completamente desorganizado). El tratamiento con detergente a menudo reduce la reactividad del antígeno del virus, y por lo tanto reduce los efectos secundarios no deseados durante la vacunación. El virus tratado con detergente puede ser inactivado adicionalmente mediante, por ejemplo, un tratamiento con formalina. Algunos ejemplos de estos procedimientos pueden encontrarse en el documento US6.048.573, en el documento US4.522.809, y en el documento WO02/09702. Un inconveniente de esta metodología es que el virus experimenta varias etapas de purificación previas a la etapa de desorganización, y por lo tanto el virus infeccioso vivo es manipulado por el personal de fabricación en varias etapas. Esto supone una preocupación especial cuando se está produciendo una vacuna contra formas especialmente virulentas de la gripe, tales como las cepas H5N1.

55

El documento WO200035481 desvela la preparación de una vacuna fraccionada contra la gripe a través del crecimiento en, y la recolección a partir de, embriones de pollo, seguido de la inactivación, la concentración y después el fraccionamiento químico con un tensioactivo no iónico.

60

El documento WO200035481 desvela la preparación de una vacuna fraccionada contra la gripe a través del crecimiento en, y la recolección a partir de, embriones de pollo, seguido de la inactivación, la concentración y después el fraccionamiento químico con un tensioactivo no iónico.

65

El documento WO200035481 desvela la preparación de una vacuna fraccionada contra la gripe a través del crecimiento en, y la recolección a partir de, embriones de pollo, seguido de la inactivación, la concentración y después el fraccionamiento químico con un tensioactivo no iónico.

A partir del documento Vaccine, vol. 25, 2007, 6028 - 6036, se conoce el uso de líneas celulares cultivadas para el crecimiento de virus.

Resumen de la invención

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir vacunas víricas con un número reducido de etapas que requieran la manipulación del material infeccioso, produciendo antígenos víricos con una reactividad disminuida.

10 Por lo tanto la presente invención proporciona un procedimiento para la elaboración de una preparación que comprende antígenos víricos que comprende las etapas a) hasta e) de la reivindicación 1, dando como resultado una preparación que comprende antígenos víricos.

En un segundo aspecto se proporciona un procedimiento para la elaboración de una preparación que comprende antígenos víricos, que comprende las etapas a) hasta d) de la reivindicación 10, dando como resultado una preparación que comprende antígenos víricos.

El procedimiento inventivo proporciona preparaciones de vacuna preparadas a partir de los antígenos víricos producidos según los procedimientos de la invención.

20 En un aspecto de referencia, la presente memoria descriptiva proporciona el procedimiento de aumentar la resistencia a una infección vírica en un sujeto que comprende la elaboración de una preparación que comprende antígenos víricos, y la administración de dicha preparación a un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1a muestra un diagrama de flujo del procedimiento inventivo, desde la recolección del virus tras la propagación hasta la cosecha inactivada.

30 La Fig. 1b muestra una continuación del diagrama de flujo del procedimiento inventivo, desde la cosecha inactivada hasta la preparación monovalente a granel.

Descripción detallada de la invención

35 Se proporciona un procedimiento para la elaboración de una preparación que comprende antígenos víricos que comprende las etapas a) hasta e) de la reivindicación 1, que da como resultado una preparación que comprende antígenos víricos. Lo fundamental de este procedimiento es que es posible reducir el número de etapas realizadas con un virus activo, y por lo tanto el virus es inactivado después de la recolección de la cosecha primaria previa al tratamiento con detergente y/o las etapas de purificación opcionales.

40 El "antígeno vírico" de acuerdo con la presente invención es un virus con cubierta o una porción del virus que pueda inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto frente a dicho antígeno. No se requiere un éxito absoluto en el sentido de una inmunización completa del sujeto, pero éste debe entenderse en el sentido de aumentar la defensa inmunitaria o la respuesta inmunitaria frente a dicho virus que reduzca la probabilidad de desarrollar una enfermedad asociada con dicho virus tras una exposición posterior. Dicho antígeno vírico puede ser, por ejemplo, un virus completo inactivado, una fracción vírica, un virus modificado, proteínas víricas, en particular proteínas de superficie, como hemaglutinina o neuraminidasa. En lo que respecta a la invención, ésta se refiere a virus fraccionados. Una "vacuna" es una preparación de dicho antígeno vírico en una forma para su administración, tal como para su administración mediante inyección, nasal o transdérmica. La "purificación" de acuerdo con la presente invención se refiere a las etapas de eliminación de constituyentes no víricos del fluido recogido. El fluido recogido obtenible tras la etapa de recolección es preferiblemente un sobrenadante clarificado, en el que las impurezas sólidas o grandes, por ejemplo, células intactas remanentes o desechos celulares de células infectadas que se rompen durante la propagación del virus, son eliminados mediante precipitación, por ejemplo, mediante centrifugación. Por lo tanto "recolección" se refiere a cualquier etapa que produzca virus infecciosos completos en un fluido, en particular en un fluido claro. Aparte de eliminar los desechos celulares, la etapa de recolección también puede incluir etapas para eliminar otros constituyentes sólidos del medio o el sustrato de crecimiento celular, por ejemplo, cualquier tipo de sustrato en el que se cultivan las células. El virus completo propagado es liberado en dicho sobrenadante del cultivo celular, a partir del cual se recoge. Por lo tanto, en una forma de realización en particular de la invención, la etapa de recoger el virus propagado comprende la separación del virus de las células y/o los desechos celulares de dichas células tras la infección. Esta separación puede facilitarse, por ejemplo, mediante una centrifugación a baja velocidad de aproximadamente 2.000 g a 3.000 g, hasta 5.000 g, 10.000 g, 15.000 g o 20.000 g, que separa las partículas visibles del fluido. Alternativamente, la separación puede realizarse mediante filtración. En las formas de realización particularmente preferidas, dicho fluido está sustancialmente exento de alantoína, colágeno y/o albúmina, tal como ovoalbúmina, por ejemplo, mediante la elección de las células usadas para la propagación del virus, por ejemplo, cultivos celulares de mamífero, de ave o de insecto, en lugar de huevos embrionados. En formas de realización en particular de la invención, se usan células de riñón de mono verde africano (VERO) para la

propagación vírica.

Después de la etapa de recolección, el virus es inactivado mediante cualquier medio conocido para la inactivación de virus, por ejemplo, según se desvela en el número de publicación de EE.UU. 2006/0270017. En particular, la inactivación puede realizarse mediante un tratamiento con formaldehído y/o una irradiación con UV, solos o en combinación. Según se usa en esta solicitud, una "inactivación completa" o "completamente inactivado", cuando se refieren a una preparación vírica, significan que la preparación vírica no contiene unidades formadoras de placa (ufp) según se determina mediante el cultivo de la preparación vírica en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) o en células VERO.

Uno de los efectos beneficiosos de los procedimientos inventivos es la reducción de las etapas que se realizan sobre medios víricos infecciosos para lo que se requieren unas precauciones de seguridad específicas. En el estado de la técnica se consideraba que era necesario realizar una etapa de purificación sobre la cosecha primaria para eliminar o reducir sustancialmente proteínas o ácidos nucleicos no víricos que podrían reticularse con el virus durante el tratamiento con formalina. Este prejuicio fue superado con la presente invención, que demostraba que es posible o incluso ventajoso inactivar el virus directamente después de la recolección, antes de su purificación. Para evitar dicha reacción adversa durante la inactivación, el fluido que contiene el virus, o sus constituyentes no víricos, no es (son) adicionalmente concentrado(s) durante o después de la etapa de recolección. La concentración de proteínas y/o de ADN no víricos del sobrenadante natural procedente del cultivo celular se mantiene antes de la etapa de inactivación. En formas de realización en particular, la concentración de proteína completa o de proteína no vírica está en el intervalo de $\mu\text{g/ml}$, tal como por debajo de 950 $\mu\text{g/ml}$, 900 $\mu\text{g/ml}$, 850 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 700 $\mu\text{g/ml}$, 650 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 550 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 450 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 350 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ o por debajo de 1 $\mu\text{g/ml}$, en el fluido durante la inactivación o después de la recolección del virus.

Para la inactivación puede seleccionarse cualquier cantidad de dosis de formaldehído o de irradiación UV que sea eficaz para inactivar el virus, solos o en combinación. En una forma de realización preferida de la presente solicitud, la reducción en el título del virus debida a la inactivación del virus en la muestra es de al menos aproximadamente 1×10^5 , en una forma de realización más preferida, de al menos aproximadamente 1×10^7 en una forma de realización más preferida, de al menos aproximadamente 1×10^{10} , y en la forma de realización más preferida, de al menos aproximadamente 1×10^{14} .

En una forma de realización preferida de la presente invención, la muestra se trata con una concentración eficaz de formalina durante entre aproximadamente 12 y aproximadamente 96 horas. En formas de realización más preferidas, la muestra se trata con una concentración eficaz de formalina durante entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas, y más preferiblemente durante aproximadamente 24 y aproximadamente 30 horas. En una forma de realización especialmente preferida de la presente invención, la muestra se trata con una concentración eficaz de formalina durante entre aproximadamente 24 y aproximadamente 24,5 horas. Los expertos en la técnica de vacunas reconocerán que la concentración de formalina de los tiempos de tratamiento deberán ser optimizados para la cepa de virus en particular tratada, con objeto de efectuar una inactivación completa, tanto sola o junto con luz UV. En una forma de realización adicional, la etapa de tratar la muestra con una concentración eficaz de formalina se realiza a aproximadamente 10 hasta aproximadamente 40 °C. En una forma de realización especialmente preferida de la presente solicitud, la etapa de tratar la muestra con una concentración eficaz de formalina se realiza a aproximadamente 32 °C.

Una forma de realización preferida de la presente invención incluye el tratamiento de la muestra con una concentración eficaz de formalina, en la que la concentración eficaz de formalina varía preferiblemente de desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 1 % (p/p), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,1 % más preferiblemente entre aproximadamente el 0,025 % y aproximadamente el 0,1 % que se corresponde con aproximadamente 92 mg/l y aproximadamente 368 mg/l de formalina, respectivamente, cuando se usa una disolución de formalina al 37 % para ajustar la concentración eficaz.

En la presente solicitud, el término "luz UV" significa radiación ultravioleta con una longitud de onda de 100 a 400 nm. La luz UV puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en UV C (de 100 a 280 nm), UV B (de 280 a 320 nm) y UV A (de 320 a 400 nm). Pueden usarse agentes fotosensibilizantes, tales como los que se intercalan en el ADN y son activados por la luz UV, por ejemplo, psoralenos, para mejorar el efecto de inactivación de la radiación UV. En una forma de realización preferida de la presente invención, la luz UV es UV C con una longitud de onda de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 280 nm. En una forma de realización más preferida de la presente invención, la luz UV tiene una longitud de onda de desde aproximadamente 240 hasta aproximadamente 290 nm. En una forma de realización especialmente preferida de la presente invención, aproximadamente el 85 % o más de la luz UV tiene una longitud de onda de aproximadamente 254 nm.

La emisión de luz UV puede ser una forma continua de emisión de luz UV, por ejemplo, una tecnología de lámpara de mercurio, o luz UV pulsada, por ejemplo, una tecnología de láser monocromático. La intensidad de UV deseada puede ser generada mediante la combinación de dos o más lámparas. El asunto en cuestión de la invención engloba el uso de cualquier dosis eficaz de luz UV, es decir, cualquier dosis de luz UV que inactive de forma segura un virus

dado, preferiblemente cuando se combina con un tratamiento con formalina. Los expertos en la técnica de vacunas reconocerán que la longitud de onda de la luz UV y la exposición pueden requerir ser optimizadas para la cepa de virus en particular tratada con objeto de efectuar una inactivación completa, tanto sola como junto con un tratamiento con formalina. La dosis eficaz puede depender de diversos factores que son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, los parámetros físicos de las cámaras de inactivación por UV tales como el tamaño y el diámetro de la lámpara y la cámara, la distancia entre el medio que contiene el virus y la fuente de luz UV, la absorción de luz y las propiedades de reflexión del material de la cámara. Por la misma razón, la longitud de onda y la intensidad de la luz UV C, así como el tiempo de contacto del virus expuesto a la luz UV también son críticos para la dosis eficaz. Adicionalmente, la dosis eficaz también se verá afectada por el propio virus, por el medio que contiene el virus y por sus propiedades de absorción de luz. Preferiblemente, la dosis eficaz es suficiente para inactivar al menos el 99,99 % del virus contenido en la muestra, más preferiblemente para inactivar el virus hasta un nivel en el que no se detecte virus activo en un cultivo de ensayo de células de mamífero o de ave, o esté completamente inactivado. En una forma de realización preferida mediante el uso de UV C, se expone una muestra que contiene el virus a una dosis eficaz que varía desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 mJ/cm². En una forma de realización preferida, la dosis eficaz está en el intervalo de desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 100 mJ/cm², y en otras formas de realización preferidas, la dosis eficaz está en el intervalo de desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 90 mJ/cm². En una forma de realización preferida, la dosis eficaz reduce el título inicial de virus en 1×10^5 . En la inactivación de vacunas a granel, la dosis eficaz debería ser suficiente para eliminar cualquier virus vivo residual que pueda estar presente tras la etapa de inactivación química (formalina). Como se ilustra en los ejemplos, esto puede determinarse mediante ensayos de infección en cultivos celulares de mamífero, tales como el cultivo de células Vero descrito en el Ejemplo 1.3.

Después de la inactivación, los antígenos víricos son purificados. La purificación se realiza preferiblemente mediante ultracentrifugación a, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 100.000 g, como al menos 50.000 g, 60.000 g, 70.000 g, 80.000 g o 90.000 g, o de hasta 200.000 g, 180.000 g, 160.000 g, 140.000 g, 120.000 g o 110.000 g. La ultracentrifugación es un método conocido habitualmente en la técnica y se usa en la elaboración rutinaria de vacunas víricas según se describe, por ejemplo, en el documento US6.048.537. Preferiblemente, la ultracentrifugación se realiza en un gradiente de densidad de sacarosa que se establece por sí mismo durante la centrifugación. En formas de realización particulares preferidas, el gradiente de sacarosa se forma mediante el uso de una disolución de aproximadamente el 42 % al 55 % (p/p %) de sacarosa (o cualquier otro carbohidrato o azúcar adecuado conocido en la técnica). Para la ultracentrifugación puede usarse una centrífuga de flujo continuo. Los parámetros para el fraccionamiento tras la ultracentrifugación dependen de las características de las cepas de virus usadas. Los parámetros para la recolección de las fracciones del pico agrupadas son evaluados y determinados individualmente para cada cepa de virus, y están en el intervalo de aproximadamente el 46 - 50 % al 34 - 38 % de sacarosa. Preferiblemente, el material no vírico (por ejemplo, en esta etapa, el virus inactivado completo) se elimina mediante una separación por densidad. Los fragmentos de membranas celulares, incluyendo liposomas y proteínas, tienen cada uno una densidad específica característica. Los virus con una composición característica de proteínas, ácidos nucleicos, y en el caso de virus con cubierta, también de la membrana, pueden ser purificados según su densidad específica a partir de material no vírico. En particular, los antígenos víricos completos pueden ser purificados a partir de porciones incompletas de virus, o viceversa.

Esta etapa de purificación de virus inactivados comprende al menos la eliminación parcial del material soluble no vírico procedente del virus. En particular, el material soluble no vírico comprende las proteínas celulares los ácidos nucleicos celulares procedentes de la célula del medio o del cultivo celular original. El material no vírico, incluyendo porciones incompletas de virus, se reduce preferiblemente en una cantidad de al menos el 20 %, preferiblemente de al menos el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 % o de al menos el 90 % durante la purificación.

En formas de realización en particular, el fluido recogido se trata con una nucleasa para degradar los ácidos nucleicos de las células hospedadoras. Dicha nucleasa puede ser, por ejemplo, benzonasa.

Las células usadas para el cultivo celular y la propagación vírica son células primarias o cualquier línea celular cultivada adecuada para la producción del virus. Algunos ejemplos de células que pueden usarse incluyen células de mamífero (por ejemplo, células CHO, BHK, VERO, HELA o perC6), células de ave (por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo o líneas celulares continuas de un ave) y células de insecto (por ejemplo, células Sf9.). En formas de realización preferidas en particular, las células están en forma de un cultivo celular. El procedimiento inventivo permite una purificación eficaz, incluyendo el fraccionamiento del material, a pesar de las potenciales propiedades de reticulación de los reactivos de inactivación. Al contrario que un virus crecido en un huevo, el virus derivado de un cultivo celular tiene una mayor pureza inicial y está exento de albúmina y de colágeno, lo que representa una importante ventaja para la purificación de la cosecha tratada con formalina. La innovadora formulación del producto resultante está exenta de floculación sin necesidad de estabilizantes tales como tocoferol o laureth-9.

En la presente invención, el virus que se va a inactivar se elige de entre virus de ADN o de ARN virus con cubierta, con genomas monocatenarios o bicatenarios (ADN), sentido o antisentido, continuo o segmentado. En formas de realización preferidas de la invención, los virus son virus con cubierta, incluyendo flavivirus, togavirus, retrovirus, coronavirus, filovirus, rabdovirus, bunyavirus, ortomixovirus, paramixovirus, arenavirus, hepadnavirus, herpesvirus y

poxvirus. En otras formas de realización preferidas, los virus son flavirus, coronavirus, ortomixovirus o togavirus. Son particularmente preferidos los virus con cubierta tales como de la gripe, incluyendo las cepas de la gripe A, B o C, del Nilo occidental y el virus de Ross River (RRV.) En otras formas de realización preferidas de la invención, el virus se elige de entre el grupo de virus de ARN con cubierta, incluyendo flavivirus, togavirus, retrovirus, coronavirus, 5 filovirus, rabdovirus, bunyavirus, ortomixovirus, paramixovirus y arenavirus. En una forma de realización particularmente preferida, el virus se elige de entre los ortomixovirus, por ejemplo, una cepa del virus de la gripe: las cepas de los virus de la gripe pueden tener combinaciones variables de proteínas superficiales de hemaglutinina y neuraminidasa. En otro ejemplo particularmente preferido, el virus se elige de entre los togavirus, por ejemplo, un alfavirus tal como el RRV. Otro grupo preferido de virus para su uso como la disolución vírica a granel son los 10 coronavirus, incluyendo el virus asociado con el síndrome respiratorio agudo grave (SARS). Otro grupo de virus preferidos son los flavivirus, incluyendo de la encefalitis japonesa, de la encefalitis por garrapatas (TBE), virus de la fiebre de Dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental y virus de la fiebre hemorrágica. Otro grupo preferido de virus son los poxvirus, incluyendo los ortopoxvirus (tales como el virus de vaccinia o de vaccinia modificado de Ankara) y los avipoxvirus.

15 En formas de realización adicionales, el virus purificado es adicionalmente procesado. Después de la purificación, las etapas adicionales pueden comprender la dilución del virus purificado, en particular tras una ultracentrifugación en sacarosa con objeto de diluir la viscosa fracción agrupada del pico, que se espera que contenga aproximadamente un 40 % de sacarosa. El virus purificado puede ser homogeneizado, tratado adicionalmente con 20 nucleasa, presurizado y/o ultra/diafiltrado.

En la invención, el virus es modificado mediante un tratamiento con detergente para producir un virus de vacuna fraccionado. La modificación de la cubierta lipídica del virus se realiza mediante la solubilización con un detergente tal como Triton X100 a una concentración adecuada para desestabilizar o desintegrar el virus, en particular la 25 membrana lipídica de la cubierta vírica. El tratamiento con detergente elimina al menos en parte la membrana de dicho virus. Preferiblemente, la concentración de detergente se elimina, por ejemplo, mediante diafiltración o procesos cromatográficos, los detergentes para su uso en la etapa de tratamiento con detergente incluyen detergentes iónicos (catiónicos, aniónicos, bipolares) o detergentes no iónicos. Algunos detergentes adecuados incluyen el grupo de detergentes de Tween (por ejemplo, Tween 80) y el grupo de detergentes de Triton (por 30 ejemplo, Triton 100.)

Opcionalmente, la preparación de antígenos víricos es adicionalmente estabilizada mediante un tratamiento adicional con formaldehído o la adición de un estabilizante, tal como mediante el uso de detergentes según se desvela en el documento WO02/097072 A2. Dichos detergentes son, por ejemplo, detergentes adecuados para 35 estabilizar la proteína HA, tales como Tween 80, Triton X100, desoxicolato, laureth-9 y tocoferol. Se cree que las proteínas superficiales se mantienen solubilizadas mediante complejos de micelas de los constituyentes de la membrana y los detergentes.

En formas de realización preferidas en particular, el virus es adicionalmente procesado hasta un virus fraccionado 40 que comprende una cualquiera de las siguientes etapas de dilución, homogeneización, tratamiento con nucleasa, filtración a presión, ultra/diafiltración, solubilización, diafiltración, estabilización mediante tratamiento con formaldehído, dilución, ultra/diafiltración, adición de estabilizante (detergente), una segunda homogenización y filtración estéril.

45 El virus puede ser adicionalmente procesado hasta una vacuna en subunidad que comprende el aislamiento de subunidades víricas individuales o de proteínas víricas, en particular proteínas de superficie como hemaglutinina o neuraminidasa. El aislamiento puede realizarse, por ejemplo, mediante purificación por afinidad y/o procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico.

50 Sorprendentemente, el procedimiento de la presente invención es adecuado para la producción a escala industrial de vacunas fraccionadas de antígenos de virus con cubierta. Por lo tanto, preferiblemente, la inactivación o cualquier otra etapa, tal como la inoculación, la propagación, la recolección la purificación, se realiza sobre unas cantidades o unos rendimientos de al menos 0,5 l, 1 l, 2 l, 3 l, 4 l, 5 l 6 l, 7 l, 8 l, 9 l, 10 l, 12 l, 14 l, 16 l, 18 l, 20 l, 25 l, 30 l, 35 l, 40 l, 60 l, 80 l, 100 l, 120 l, 140 l, 160 l, 180 l, 200 l de un fluido que comprende un virus o un antígeno vírico.

55 En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un procedimiento para la elaboración de una preparación que comprende antígenos víricos que comprende las etapas a) hasta d) de la reivindicación 10, dando como resultado una preparación que comprende antígenos víricos. Por supuesto, también es posible usar fluidos que contengan virus infecciosos *per se*, que pueden proceder de cualquier sobrenadante celular como se ha descrito 60 anteriormente, para su inactivación, tratamiento con detergente y purificación. Preferiblemente, dicho fluido que comprende virus infecciosos se obtiene a partir de un cultivo celular.

En aspectos de la desvelación, los antígenos víricos, en particular los antígenos víricos fraccionados, son estabilizados mediante la adición de una cantidad eficaz de Tween 80, en particular se prefiere a una concentración 65 de aproximadamente el 0,125 %, por ejemplo por encima del 0,01 %, del 0,05 % o del 0,4 %, y por debajo del 0,6 %, del 0,5 %, del 0,4 %, del 0,3 % o del 0,2 %. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva también proporciona en un

aspecto adicional el procedimiento de estabilizar antígenos víricos mediante la adición de Tween 80. Se averiguó que un detergente Tween 80 es menos potente para solubilizar membranas víricas que el Triton X100, pero es bastante más biocompatible y puede estar presente en una preparación de vacuna. La cantidad eficaz para estabilizar antígenos víricos es preferiblemente inferior a la cantidad para solubilizar membranas víricas en el procedimiento de solubilización de virus fraccionados mediante el uso de elevadas concentraciones de Triton X100 de, por ejemplo, el 0,5 %. Los antígenos víricos pueden estar exentos de estabilizantes. En formas de realización en particular se proporciona una producción de una vacuna fraccionada mediante un proceso en el que la cosecha del virus es completamente inactivada antes de su proceso de fraccionamiento y purificación. Sorprendentemente, el proceso de inactivación mediante un tratamiento con formalina y un tratamiento con UV no interfiere con los subsiguientes procesos de tratamiento y purificación con detergente.

En aspectos adicionales de la desvelación se proporciona una composición de vacuna o farmacéutica que comprende uno o más antígenos víricos. Dicha composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un portador y/o un coadyuvante farmacéutico. Dichos portadores farmacéuticos son, por ejemplo, sales estabilizantes, emulsionantes, solubilizantes u osmorreguladoras, agentes suspensores, agentes espesantes, componentes redox que mantienen un potencial redox fisiológico. Algunos coadyuvantes preferidos incluyen sales de aluminio microemulsiones, partículas lipídicas y/u oligonucleótidos, usados para aumentar la respuesta inmunitaria. Un aspecto adicional de la presente memoria descriptiva es una composición o una preparación farmacéutica como vacuna que comprende un antígeno. Una vacuna puede usarse, por ejemplo, para una inyección como un medio profiláctico frente a una enfermedad asociada a un virus. En aspectos preferidos en particular, la composición o la vacuna comprende más de un antígeno, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en particular, de diferentes cepas, subtipos o tipos de virus tales como de la gripe A y de la gripe B, en particular seleccionados de entre uno o más de los subtipos humanos H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, de los subtipos de la gripe porcina H1N1, H1N2, H3N1 y H3N2, de los subtipos de la gripe canina o equina H7N7, H3N8 o de los subtipos de la gripe aviar H5N1, H7N2, H1N7, H7N3, H13N6, H5N9, H11N6, H3N8, H9N2, H5N2, H4N8, H10N7, H2N2, H8N4, H14N5, H6N5, H12N5.

Algunos coadyuvantes adecuados pueden seleccionarse de entre geles minerales, hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones o emulsiones oleosas tales como de agua en aceite o de aceite en agua, o una combinación de los mismos. Por supuesto, la selección del coadyuvante depende del uso previsto. Por ejemplo, la toxicidad puede depender del organismo sujeto destinado y puede variar entre ninguna toxicidad y una toxicidad elevada.

Otro aspecto preferido de la composición o de la vacuna de la presente memoria descriptiva comprende adicionalmente sustancias tamponantes. Las sustancias tamponantes pueden ser seleccionadas por el artesano experto para establecer una condición fisiológica en una disolución de esta composición. Las propiedades tales como el pH y la fuerza iónica, así como el contenido iónico, pueden ser seleccionadas según se desee.

Las composiciones o las vacunas pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable.

El término "portador" se refiere a un diluyente, por ejemplo, agua, disolución salina, excipiente o vehículo con el que puede administrarse la composición. Para una composición sólida, los portadores de la composición farmacéutica pueden comprender un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona (polividona o povidona), goma de tragacanto, gelatina, almidón, lactosa o lactosa monohidratada; un agente disgregante, tal como ácido algínico, almidón de maíz y similares; un lubricante o tensioactivo, tal como estearato magnésico o laurilsulfato sódico; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina.

En un aspecto de referencia de la desvelación también se proporciona el procedimiento para aumentar la resistencia a una infección vírica en un sujeto que comprende la elaboración de una preparación que comprende uno o más antígenos víricos diferentes y la administración de dicha preparación que comprende uno o más antígenos víricos, según se describió anteriormente, a un sujeto. La preparación es preferiblemente una vacuna como parte de la desvelación, también se contempla proporcionar los antígenos víricos según se han preparado mediante la presente invención como una vacuna o para aumentar la resistencia a una infección vírica en un sujeto mediante la administración de dichos antígenos víricos.

Ejemplos

Ejemplo 1: inactivación de un virus infeccioso

Se produjeron tres cepas diferentes de la gripe, dos cepas A Hiroshima (HR, H3N2), una cepa Nueva Caledonia (NC, H1N1) y una cepa B, Malasia (MA) en cultivos de células Vero. Después de la propagación del virus, el virus infeccioso recogido es inactivado antes de la purificación, según se indica en el diagrama de flujo de la fig. 1a.

1.1. Inactivación con formalina

La primera etapa de inactivación con formalina se realiza sobre una cosecha de virus infeccioso monovalente exenta

de células, es decir, una cosecha de biorreactor tras una clarificación mediante centrifugación. Después de la recolección a entre 30 y 34 °C, la cosecha de virus monovalente se trata con entre aproximadamente 0,9 y aproximadamente 1,1 U/ml de benzonasa a entre 30 y 34 °C durante entre 4 y 8 horas. Después, se trata con ≤ 92 mg/l de formalina durante entre 24 y 24,5 horas a 32 $\pm$ 2 °C.

5

1.2. Inactivación por UV

Se llevaron a cabo varios experimentos de inactivación con virus inactivados por formalina mediante el uso de una cámara de inactivación con una lámpara de UV de 65 W y una cámara de capa fina. Aunque la completa inactivación de la cosecha de virus monovalente puede demostrarse cuando se usan unos caudales de 100 litros por hora durante tres ciclos, este conjunto no permitió la medición *on line* de la señal UV. El medio de cultivo de células Vero usado para la producción del virus de la gripe contiene varios compuestos orgánicos responsables de la absorción de la señal UV. Por lo tanto, el sistema está equipado con una lámpara de 110 W que permite una monitorización continua de la señal de UV durante el tratamiento de la cosecha de virus monovalente.

15

La cosecha de virus de la gripe de Panamá monovalente tratada con formalina se usa como modelo de sustrato para la inactivación. Para la inactivación continua con una tecnología UV con capa fina se usa un sistema WEDECO VISA (Alemania) equipado con una lámpara VISA (110 W). La cámara de UV con capa fina es un dispositivo de acero inoxidable 1.4435 con un tubo de cuarzo de 30 mm de diámetro. Un sensor de UV calibrado permite el control *on line* de la señal de UV. La cámara de UV de capa fina es operada a un caudal de 240 $\pm$ 10 litros por hora a temperatura ambiente. Las condiciones del caudal son controladas por un caudalímetro calibrado. La cosecha monovalente se expone a 10 ciclos de UV. Después de cada ciclo se extraen 20 litros de la cosecha monovalente tratada con UV y se purifican adicionalmente mediante una purificación en gradiente de sacarosa mediante el uso de una ultracentrifugación continua.

25

1.3. Ensayo de seguridad

El ensayo de seguridad estándar de Vero es un ensayo de calidad muy riguroso para la infectividad residual de cepas de la gripe inactivadas. El ensayo también es aplicable a otros virus. Se añade un producto a granel monovalente, es decir, antígeno vírico purificado tras una centrifugación en gradiente de sacarosa y una ultrafiltración, en 5 matraces Roux (4 ml/matraz). Después de incubar durante 7 días a 32 °C en un medio de cultivo Vero, los cultivos celulares se recoge, se agrupan y se añaden a 5 matraces Roux (10 ml/matraz). Después de otra etapa de incubación durante 7 días a 32 °C, los cultivos celulares se recogen, se agrupan y se ensayan para valorar la hemaglutinina (HA).

35

El ensayo de la HA se basa en el hecho de que el virus de la gripe puede unirse a los eritrocitos mediante el uso de su proteína superficial hemaglutinina. El ensayo se realiza en un entorno estéril. Una suspensión de virus de la gripe con un título definido de HA sirve como control positivo, y una disolución de NaCl al 0,9 % sirve como control negativo. Se añaden 50 μ l de una dilución 1:2 en NaCl al 0,9 % de una muestra que se va a ensayar en un pocillo de una placa de 96 pocillos. A cada pocillo se añaden 50 μ l de una disolución que contiene eritrocitos de pollo. Posteriormente, las placas se incuban durante entre 30 y 45 minutos a temperatura ambiente. Entonces se determina visualmente la hemaglutinación, en la que, si cinco pocillos que contienen la misma muestra no muestran hemaglutinación, la muestra ha superado el ensayo de la HA.

45

Ejemplo 2: purificación mediante ultracentrifugación

Durante la purificación del antígeno del virus de la gripe, la cosecha monovalente (MVH) se concentra mediante centrifugación. Puede aplicarse un procedimiento de centrifugación en flujo continuo para elaboración de la vacuna vírica crecida en un cultivo de células Vero en un gradiente de sacarosa formado mediante el uso de una disolución acuosa de sacarosa. El modelo de centrífuga usado estaba equipado con un preclarificador. Se llevaron a cabo experimentos a pequeña escala con un gradiente de densidad formado mediante el uso de una disolución de sacarosa a aproximadamente un 42 % y un 55 % (p/p) en tampón Tris 20 mM en diferentes condiciones de centrifugación. Además, la ultracentrifugación sin preclarificador pero con un aumento en la fuerza g resultó ser una valiosa herramienta para mejorar el rendimiento.

55

Las cosechas de virus de la gripe monovalentes (MVHs) se usaron para los estudios comparativos. Las MVHs se purificaron mediante una ultracentrifugación continua con una centrífuga de laboratorio del modelo RK-6 a 35.000 rpm.

Ejemplo 3: purificación / procesado

Para una vacuna antigripal candidata, se purificaron y se recogieron tres cepas diferentes del virus de la gripe procedentes de la ultracentrifugación, según se describió en el ejemplo 2. Los rendimientos de antígeno eran diferentes en los picos agrupados. La cepa del virus de la gripe de Nueva Caledonia tenía el menor rendimiento de antígeno, seguida de Hiroshima y finalmente de Malasia. El contenido proteico era mayor en la de Malasia y menor en la de Hiroshima. Las proporciones entre el SRD (ensayo de inmunodifusión radial individual (cuantificación de la

HA)) y la proteína total eran comparables en los picos agrupados de Malasia y Nueva Caledonia, pero mayores en Hiroshima (Tabla 1).

Tabla 1: resultados analíticos de los picos agrupados

5		HR05/61	MA04/61	NC99/51
	Cepa de la gripe	Hiroshima	Malasia	Nueva Caledonia
	Cantidad (ml (g))	840,4 (1.000)	420,2 (500,1)	420,2 (500)
	SRD (µg/ml)	246,2	426,6	194,9
10	Concentración de proteínas (µg/ml) mediante Bradford	487	1.495	764
	Proporción SRD/proteína	0,51	0,28	0,26
	Concentración de proteínas VERO (µg/ml) mediante ELISA	6,2	19,7	18,9

15 El proceso adicional se realizó de acuerdo con el siguiente resumen:

3.1. Dilución de los picos agrupados

20 Los picos agrupados se diluyeron 3 veces con tampón de TBS para reducir la concentración de sacarosa, para una reducción de la viscosidad.

3.2. Primera homogeneización de los picos agrupados

25 Los picos agrupados diluidos se tratan con un homogeneizador a alta presión "NS 1001L Panda" (Niro Soavi S.p.A.). La suspensión de virus se hace pasar a través del homogeneizador 3 veces con 800 bar. Esta presión es suficiente para mejorar las subsiguientes etapas de procesado, al desorganizar los agregados de virus.

3.3. Adición de benzonasa

30 Se añade benzonasa, una nucleasa recombinante producida en *E. coli*, a la suspensión de virus, a una concentración final de 3 U/ml, para degradar el ADN derivado de las células.

3.4. Filtración a presión

35 Después de la adición de benzonasa, se realiza una filtración a presión a 0,22 µm para mantener la suspensión de virus exenta de organismos accidentales tales como bacterias durante el subsiguiente periodo de incubación. La incubación se realiza a 32 °C durante una noche.

40 3.5. Ultra/diafiltración

Una vez finalizada la incubación con benzonasa, se realiza una ultra/diafiltración con una membrana de ultrafiltración de 30 kD de canal suspendido (Pall) con un área de filtración de 0,1 m² a pequeña escala y de 0,5 m² a escala piloto. El ultrarretenido se diafiltra con 10 volúmenes de retenido de TBS (disolución salina tamponada con Tris) + Triton X100 al 0,008 % (p/p).

3.6. Adición de Triton X100 para la solubilización y la incubación para el fraccionamiento vírico

50 Se añade Triton X100 a una concentración final de 0,5 % (p/p) y se incuba durante una noche a temperatura ambiente.

3.7. Diafiltración II

55 Para la eliminación de la elevada concentración de Triton X100, la diafiltración se realiza con una membrana de ultrafiltración de 30 kD de canal suspendido (Pall). El ultrarretenido se diafiltra con 15 volúmenes de retenido de TBS (disolución salina tamponada con Tris).

3.8. Adición de formaldehído e incubación

60 Se añade formalina al ultra/diarretenido hasta una concentración final del 0,025 % para estabilizar al antígeno. La incubación se realiza durante 18 - 24 horas a temperatura ambiente. La formalina es una disolución saturada acuosa de gas formaldehído al ~ 36 - 37 %.

3.9. Triton X100

65 La determinación mediante HPLC de la concentración mediante las subsiguientes etapas de procesado consiste en

una etapa de dilución y una ultra/diafiltración adicional. Con objeto de ser capaces de diluir el UDR por debajo de la CMC para el Triton X 100 (TX 100, ~0,015 %, 250 µM, en disolución acuosa), se introdujo una etapa de determinación analítica del TX100 para definir la concentración de TX100. El factor de dilución es dependiente de esta concentración de TX100.

5

3.10. Dilución del UDR por debajo de la concentración micelar crítica para el TX 100

El ultra/diarretenido, que contiene un TX100 residual de aproximadamente el 0,1 - 0,2 % (determinado mediante HPLC), se diluye con TBS hasta una concentración final de TX100 del 0,008 %, una concentración claramente por
10 debajo de la CMC (concentración micelar crítica).

3.11. Ultra/diafiltración III

Se realiza una ultra/diafiltración con la misma membrana de ultrafiltración de 30 kD de canal suspendido. El
15 ultrarretenido se diafiltra con 5 volúmenes de retenido de TBS (disolución salina tamponada con Tris) + 5 VC de TBS + Triton X100 al 0,008 % (p/p).

3.12. Estabilización con detergente

20 Después de la reducción de la concentración de TX100 hasta el nivel objetivo se añade Tween 80 a la suspensión hasta una concentración final del 0,125 % ± 0,025 % para una estabilización adicional del antígeno vírico. Esto evita la reagregación debida a unas concentraciones demasiado bajas de TX100.

3.13. Segunda homogeneización

25

Se realiza una segunda etapa de homogeneización a alta presión para mantener la pérdida de antígeno baja en la etapa de filtración a 0,22 µm. Se usa el mismo homogeneizador descrito en la sección 3.2 con unos parámetros idénticos.

30 3.14. Filtración estéril

Después de la segunda etapa de homogeneización se realiza una filtración estéril mediante el uso de filtros de 0,22 µm (Millipore). El material estéril filtrado a granel se denomina Grueso Monovalente (MVB).

35 **Ejemplo 4: resultados**

Tabla 2: resultados de la purificación tras la ultracentrifugación según se ha ejemplificado para un virus fraccionado (Hiroshima):

		Pico agrupado	DIL (1:3)	HOM1	PFIL	UDR1 30 K	UDR2 30 K	UDR	HOM2	MVB
Cantidad	g	500	1.501,6	1.479,8	1.537,5	410,4	411,7	421,8	414,9	421,5
Densidad óptica	DO, a 405 nm	/	0,82	0,24	0,20	0,86	0,72	0,88	0,18	0,15
SRD (NiBSC)	µg/ml	194,9	56,7	58,1	52,9	130,9	110,3	84	86,5	74,6
SRD total	mg	81,9	77,4	78,2	73,9	53,7	45,4	35,4	35,9	31,5
Proteína	µg/ml	764	/	/	/	/	/	/	/	385
Proteína total	mg	382	/	/	/	/	/	/	/	162,3
Concentración de proteínas VERO	µg/ml mediante ELISA	18,9	4,5	4,4	3,8	10,8	6,3	4	5	4,7
Proteína Total de VERO	mg mediante ELISA	8	6,1	5,9	5,2	4,4	2,6	1,7	2,1	2
ADN de Vero	ng/ml	/	/	/	/	/	/	/	/	0,64
ADN total de Vero	µg	/	/	/	/	/	/	/	/	0,27
TX100	(%)	/	/	/	/	0,482	0,101	0,018	0,017	0,017
Tween 80	(%)	/	/	/	/	/	/	/	/	0,115

DIL (1:3): dilución del pico agrupado;

5 UDR: ultradiarretenido después de la ultradiafiltración;

HOM-1, HOM-2: homogenización 1 y 2;

PFIL: filtración a presión a 0,22 µm;

10

MVB: monovalente a granel

El SRD total en el MVB era de 73 mg. Los niveles totales de proteínas Vero se redujeron desde 5,2 mg hasta 1 mg, una reducción del 80,8 %. El ADN Vero total se redujo hasta 0,28 µg en el MVB. La proteína total se redujo desde 487 mg hasta 212 mg, lo que constituye una reducción del 56,5 %.

15

Se obtuvieron unos resultados similares para la cepa de Malasia: la proteína Vero total pudo reducirse desde 8,3 mg hasta 2,4 mg, lo que es una reducción de aproximadamente el 67,5 % del pico agrupado en el MVB. El contenido en ADN Vero en el MVB era de 1,8 µg. La reducción de la proteína total durante la purificación era del 58,6 %, desde 748 mg hasta 310 mg.

20

Para la cepa Nueva Caledonia al final de la purificación, la proteína Vero total pudo reducirse desde 8 mg en el pico agrupado hasta 2 mg en el MVB, que lo que es una reducción del 75 %. El contenido en ADN Vero total en el MVB era de 0,27 µg. La proteína total se redujo desde 382 mg en el pico agrupado hasta 162 mg en el MVB, lo que constituye una reducción del 57,6 %.

25

El proceso de purificación es muy coherente y robusto. La exitosa reducción de la proteína y el ADN de la célula hospedadora dio como resultado una preparación vírica muy purificada, así como productos químicos del proceso como benzonasa, sacarosa, formaldehído y Triton X100, así como la ausencia de endotoxinas. Todas las preparaciones eran estériles tras la producción. Las proporciones entre SRD y proteínas cumplían la normativa en los tres MVBs.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la elaboración de una preparación que comprende antígenos víricos que comprende
5 a) inoculación de células con virus con cubierta infecciosos en un fluido, en la que dichas células son células primarias o una línea celular cultivada,
b) propagación de dichos virus en dichas células, en la que dichas células están en forma de un cultivo celular,
10 c) recoger dicho virus propagado,
d) inactivar completamente dicho virus recogido directamente después de la recolección del virus antes de cualquier etapa de purificación, y en la que el fluido que contiene el virus o sus constituyentes no víricos no es (son)
15 adicionalmente concentrados antes de dicha etapa de inactivación, y
e) tratar dicho virus inactivado con detergente para producir una vacuna vírica fraccionada, dando como resultado una preparación que comprende antígenos víricos.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de recoger dicho virus propagado comprende la separación del virus de las células y/o de los desechos celulares de dichas células después de la infección.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha inactivación se realiza mediante la adición de
25 formaldehído, o se realiza mediante irradiación con UV.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho virus propagado es liberado en dicho fluido.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que después de la recolección, el fluido recogido se trata
30 con una nucleasa.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células son células de mamífero o de ave.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células son células epiteliales.
35
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho virus es un virus de la gripe.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración de proteína no vírica durante dicha inactivación está por debajo de 350 µg/ml.
40
10. Un procedimiento para la elaboración de una preparación que comprende antígenos víricos que comprende
a) obtener un fluido que comprende virus con cubierta infecciosos, inoculado en células, en el que dichas células son
45 células primarias o una línea celular cultivada,
b) inactivar dicho virus recogido de la etapa (a), antes de cualquier etapa de purificación del virus y en el que el fluido que contiene el virus o sus constituyentes no víricos no es (son) adicionalmente concentrados antes de dicha etapa de inactivación,
50 c) tratar dicho virus inactivado con detergente para producir una vacuna vírica fraccionada, y
d) purificar dicho virus inactivado, dando como resultado una preparación que comprende antígenos víricos.
- 55 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho fluido se obtiene a partir de un cultivo celular.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente la etapa de estabilizar dichos antígenos víricos.

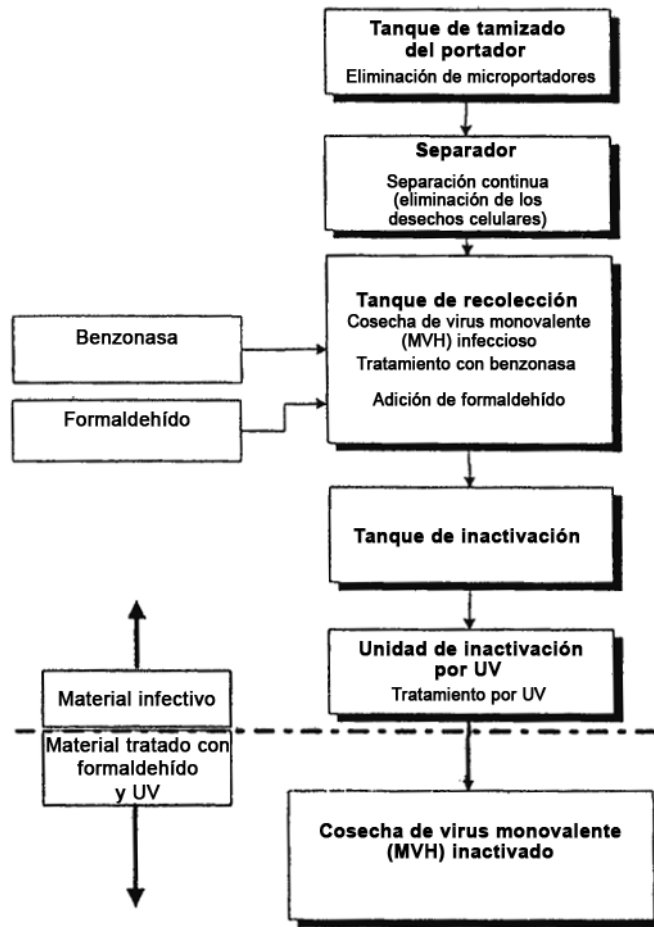


Fig. 1a

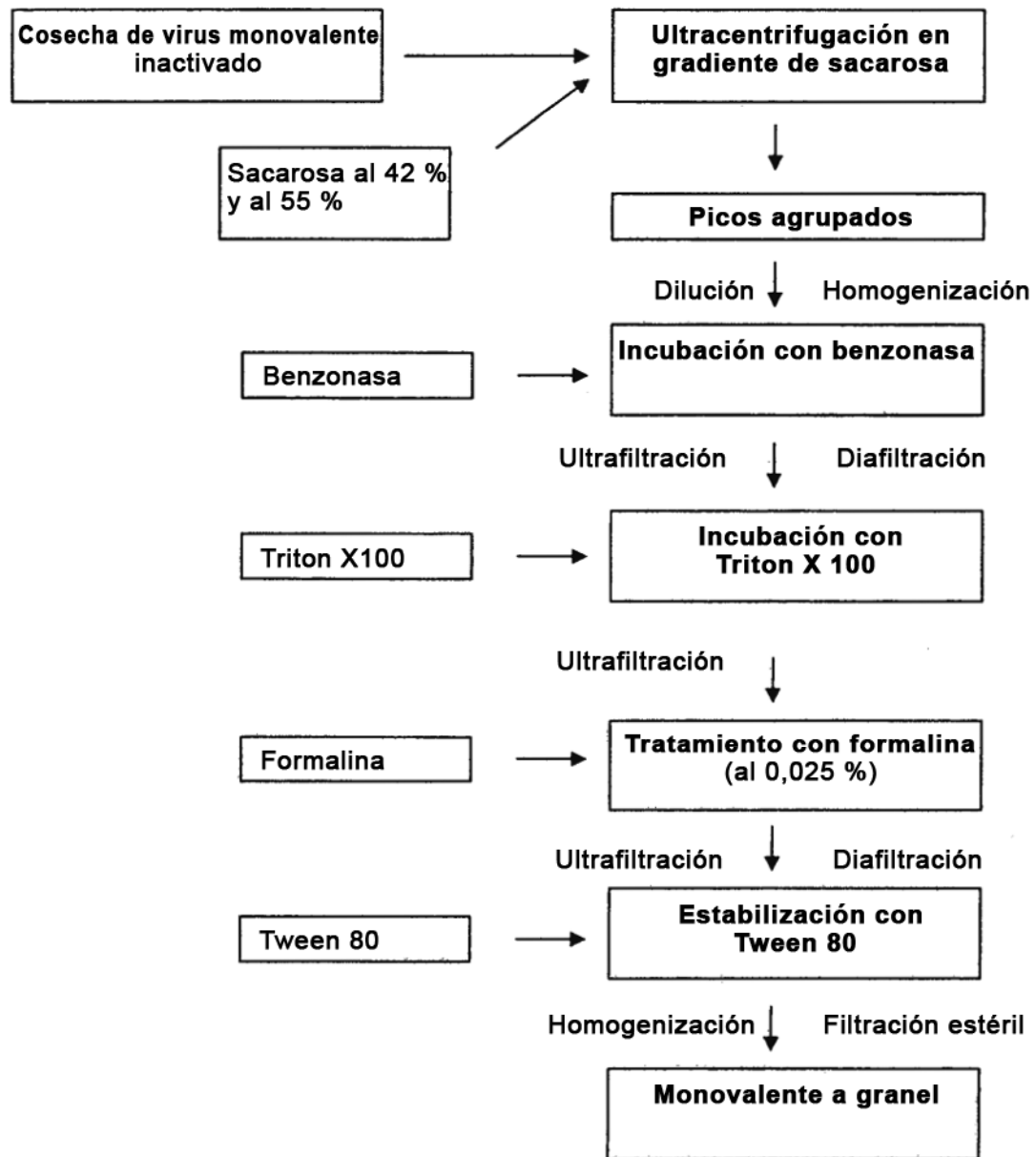


Fig. 1b