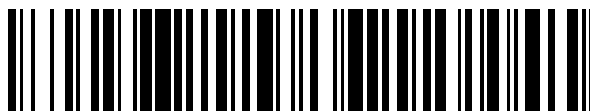


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 726**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2010 E 10723229 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2417251**

54 Título: **Procedimiento de purificación del virus de la rabia**

30 Prioridad:

08.04.2009 FR 0952310
05.08.2009 US 231394 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2014

73 Titular/es:

SANOPI PASTEUR (100.0%)
2, avenue Pont Pasteur
69367 Lyon Cedex 07, FR

72 Inventor/es:

FABRE, VIRGINIE;
ROCCA, CÉLINE;
RIFFARD, PIERRE y
CALVOSA, ERIC

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 498 726 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 de purificación del virus de la rabia

La invención tiene por objeto un método de purificación del virus de la rabia obtenido a partir de un cultivo de células.

5 De manera general, las cosechas de virus obtenidas a partir de cultivos celulares infectados contienen no sólo los virus deseados, sino también las proteínas y el ADN de las células, que son unas impurezas de las cuales conviene deshacerse. Las cantidades en proteínas y en ADN celulares liberadas son tanto más importantes si los virus son responsables de una lisis celular importante y/o si las cosechas virales se efectúan tarde. Además de las impurezas de tipo celular, las proteínas del medio en el que se encuentran las células infectadas son también unas impurezas de las que se desea también deshacerse durante la aplicación del procedimiento de purificación viral.

10 Cuando los virus sirven para la fabricación de vacunas, se busca obtener unas preparaciones que sean lo más puras posible para evitar el desarrollo de reacciones alérgicas contra las impurezas proteicas. En algunos países, existe una legislación que limita a 100 pg/dosis vacineas, incluso menos, la cantidad máxima autorizada de ADN celular en las vacunas que comprenden unos productos obtenidos a partir de las líneas celulares continuas.

En la técnica anterior, ya se han descrito diferentes procedimientos de purificación del virus de la rabia:

15 El documento US 4,664,912 describe un método de purificación del virus de la rabia por centrifugación zonal después de que se haya inactivado con la β propiolactona. Otro método consiste en combinar una cromatografía por exclusión de tamaño y una cromatografía por intercambio de aniones cuando el volumen de la cosecha del virus a purificar es importante.

20 El documento US 4,725,547 describe un método de purificación del virus de la rabia por cromatografía de afinidad sobre sulfato de celulofina (éster de ácido sulfúrico y de celulosa).

25 El documento WO 97/06243 describe un método de purificación de los virus, en particular del virus de la rabia a partir de un cultivo de células Vero infectadas. El procedimiento comprende una cromatografía por intercambio de aniones seguida de una cromatografía por intercambio de cationes y se completa por una cromatografía de afinidad por quelación metálica. Utilizando este procedimiento, la cantidad de ADN residual contenido en una dosis de vacuna es \leq a 30-40 pg, utilizando la técnica denominada del "Treshold Total DNA assay".

30 Kumar A.P. *et al.* en *Microbes and Infection* (2005) 7; 1110-1116 ha comparado dos procedimientos de purificación del virus de la rabia a partir de un sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas que se cultivaron en un medio que contiene un suero de ternera fetal. Muestra que el procedimiento de purificación basado en la utilización de una columna de cromatografía intercambiadora de aniones (DEAE-sefarosa CL -6B) es más eficaz que el procedimiento de purificación por centrifugación zonal en un gradiente de sacarosa, ya que a un grado de pureza comparable en términos de cantidad de ácidos nucleicos y de proteínas residuales, el rendimiento del virus de la rabia es mejor con el procedimiento cromatográfico.

35 Frazatti-Gallina N.M. en *Vaccine* (2004) 23; 511-517 ha descrito también un procedimiento de purificación del virus de la rabia a partir de un sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas que han sido cultivadas en un medio desprovisto de suero de ternera fetal. El procedimiento de purificación utiliza también una etapa de cromatografía por intercambio de aniones sobre un soporte a base de DEAE-celulosa después de una etapa de clarificación y de concentración de la cosecha viral. Utilizando este procedimiento, la cantidad de ADN residual medida por la técnica de hibridación sobre transferencia es $<$ 23 pg por dosis de vacuna.

40 Así, cuando el procedimiento de purificación del virus de la rabia comprende una etapa de cromatografía por intercambio de iones, se encuentra casi sistemáticamente una etapa de cromatografía por intercambio de aniones a fin de retener los ácidos nucleicos del medio que contiene el virus a purificar sobre el soporte cromatográfico.

Por otro lado, JungBauer et al. han descrito en *Journal of chromatography* (2008), vol 184, p. 62-79 las potencialidades de un nuevo soporte cromatográfico monolítico para purificar con un grado muy bueno de pureza el virus del mosaico del tabaco (VMT).

45 Un procedimiento de purificación de virus particularmente eficaz debería permitir eliminar de manera óptima las impurezas proteicas y el ADN celular, garantizando al mismo tiempo un rendimiento máximo del virus de la rabia purificado, y existe todavía la necesidad de encontrar nuevos procedimientos que responden a estos criterios.

Un objetivo de la invención es proporcionar un nuevo procedimiento de purificación que responde a estos criterios.

50 Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para purificar un virus de la rabia a partir de una cosecha de virus desprovista de suero animal o de cualquier proteína sérica, y más particularmente proporcionar un procedimiento de purificación en el que se utilizan únicamente unos productos de origen no animal.

Para ello, la presente invención tiene por objeto:

Un procedimiento de purificación del virus de la rabia que comprende una sola etapa de cromatografía por intercambio de iones, siendo dicha etapa una cromatografía por intercambio de cationes según la cual:

- 5 a. se pone en contacto el sobrenadante de un cultivo de células infectadas por este virus con un soporte de cromatografía intercambiadora de cationes que comprende una matriz de polimetacrilato sobre la que se han injertado por enlace covalente unos grupos sulfoisobutilo de manera que el virus de la rabia se fije sobre este soporte, y en segundo lugar
- b. se eluye el virus de su soporte.

Según un aspecto del procedimiento según la invención, el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de suero animal o de cualquier proteína sérica.

- 10 Según otro aspecto, el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de cualquier proteína exógena de origen animal.

Según también otro aspecto, la concentración en proteínas exógenas de origen no animal en el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia es ≤ 15 mg/l.

- 15 Según también otro aspecto, el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de cualquier producto exógeno de origen animal.

Según un modo de realización del procedimiento según la invención, el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia está previamente clarificado antes de ser puesto en contacto con el soporte de cromatografía intercambiador de cationes.

- 20 El procedimiento de purificación según la invención se caracteriza por que la cantidad de virus medida en el eluido corresponde a al menos el 70% de la cantidad de virus medida en el sobrenadante puesto en contacto con el soporte cromatográfico.

- 25 Más particularmente, está caracterizado por que la cantidad de proteínas totales medida en el eluido corresponde a menos del 40% de la cantidad de proteínas totales medida en el sobrenadante puesto en contacto con el soporte cromatográfico y por que la cantidad de ADN medida en el eluido corresponde a menos del 5%, preferentemente a menos del 2,5% y de manera aún más preferida a menos del 1% de la cantidad de ADN medida en el sobrenadante que se ha puesto en contacto con el soporte cromatográfico.

Según otro modo de realización del procedimiento según la invención, después de haber eluido el virus de su soporte cromatográfico, se concentra eventualmente y después se trata con una nucleasa.

Según un aspecto del procedimiento según la invención, la nucleasa es una endonucleasa, tal como la benzonasa.

- 30 En otro modo de realización de la invención, se somete después el eluido a una ultracentrifugación sobre un gradiente de sacarosa y se recoge la o las fracciones del gradiente que contienen el virus purificado.

En otro aspecto de la invención, se inactiva después el virus de la rabia purificado por medio de un agente de inactivación viral.

En un aspecto particular, el agente de inactivación es la β -propiolactona.

- 35 Según un aspecto preferido, todas las etapas del procedimiento según la invención se realizan por medio de productos de origen no animal.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de fabricación de una vacuna contra la rabia según el cual:

- a) se infecta un cultivo de células con el virus de la rabia,
- 40 b) se purifica el virus de la rabia a partir del sobrenadante de cultivo de células infectadas según un procedimiento de la invención,
- c) se mezcla la suspensión del virus purificado obtenido en b) en un tampón de conservación, y
- d) se reparte la suspensión del virus purificado obtenido en c) en forma de vacunas unidosis o multidosis.

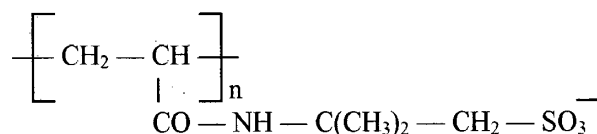
Según otro aspecto, se trata de un procedimiento de fabricación de una vacuna contra la rabia según el cual:

- a) se infecta un cultivo de células con el virus de la rabia,
- 45 b) se purifica el virus de la rabia a partir del sobrenadante de cultivo de células infectadas según un procedimiento de la invención,

- c) se mezcla la suspensión del virus purificado obtenido en b) en un tampón de liofilización,
 d) se reparte la suspensión del virus purificado obtenido en c) en forma de vacunas unidosis o multidosis, y
 e) se liofilizan las dosis de vacunas.

Descripción detallada de la invención

5 El procedimiento de purificación del virus de la rabia según la invención comprende una sola etapa de cromatografía por intercambio de iones, siendo dicha etapa cromatográfica una cromatografía por intercambio de cationes. Por supuesto, se entiende, en el sentido de la presente invención, que el procedimiento de purificación del virus de la rabia no se limita a una sola etapa de cromatografía, sino que puede incluir una o varias etapas suplementarias en la medida en la que estas etapas no son unas cromatografías por intercambio de iones. Contrariamente a lo que deja
 10 pensar el estado de la técnica, los inventores han puesto en evidencia que los rendimientos de una cromatografía por intercambio de cationes cuyo soporte comprende una matriz de polimetacrilato sobre la que se han injertado por enlace covalente unos grupos sulfoisobutilo, son mejores que las de una cromatografía por intercambio de aniones. Sin querer estar limitado por la teoría, parece ser que el virus de la rabia posee una doble polaridad, positiva y negativa que le permite fijarse al mismo tiempo sobre unos soportes intercambiadores de aniones (tipo DEAE) y sobre unos soportes intercambiadores de cationes (tipo SO_3^-). Los "rendimientos de una cromatografía" en el sentido de la invención son calculados en base a la cantidad de virus de la rabia y de ADN que se encuentra en el eluido con respecto a la cantidad inicial de virus y de ADN que se pusieron en contacto con el soporte cromatográfico, en los límites de capacidad de carga del soporte cromatográfico. A cantidades equivalentes de virus y de ADN que se han puesto en contacto con el soporte cromatográfico, el rendimiento del soporte cromatográfico es aún mejor cuando la
 20 cantidad de virus encontrada en el eluido es importante y cuando la cantidad de ADN residual es baja. Los grupos sulfoisobutilo se injertaron a la matriz de polimetacrilato por medio de cadenas poliméricas flexibles que facilitan la interacción del virus de la rabia con el intercambiador de cationes. De manera preferida, la cadena polimérica comprende un encadenamiento de unidades monoméricas que tiene por fórmula:



25 Estas cadenas poliméricas son obtenidas por polimerización de un monómero que tiene como fórmula química: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ en presencia de un catalizador a base de cerio que permite también el injerto en la matriz de polimetacrilato. Comprenden de entre 15 y 25 unidades monoméricas de media. El soporte cromatográfico está clásicamente en forma de partículas cuyo tamaño varía generalmente entre 20 y 100 μm , de manera preferida entre 40 y 90 μm . Este tipo de soporte está comercializado en particular por MERCK bajo la
 30 denominación de Fractogel[®] EMD SO_3^- . Este tipo de soporte se coloca en una columna cromatográfica cuya longitud y diámetro se seleccionan en función del volumen de la cosecha a purificar. Los resultados presentados en el ejemplo 1 muestran que se obtienen buenos rendimientos únicamente con el soporte Fractogel[®] EMD SO_3^- en el conjunto de los soportes cromatográficos intercambiadores de aniones y de cationes que se han ensayado. Se obtienen unos rendimientos en virus muy bajos (menos del 10% del virus introducido se recupera en el eluido) con todos los otros soportes cromatográficos intercambiadores de cationes fuertes ensayados. Los rendimientos en virus obtenidos con los soportes cromatográficos intercambiadores de aniones son mejores (entre el 40 y el 70%) pero siguen siendo sin embargo inferiores al rendimiento en virus que se obtiene con el soporte Fractogel[®] EMD SO_3^- , que es generalmente superior al 70% y más frecuentemente superior al 80%. Por otra parte, se elimina menos ADN con los soportes cromatográficos intercambiadores de aniones. De manera sorprendente, sólo el soporte cromatográfico intercambiador de cationes que comprende una matriz de polimetacrilato sobre la que se han injertado por enlace covalente unos grupos sulfoisobutilo que desempeñan el papel de ligandos, permite purificar con buenos rendimientos el virus a partir de un sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia. Se elimina en una etapa cromatográfica al mismo tiempo más del 60% de las proteínas totales, al menos 2,5 \log_{10} de ADN, de manera preferida al menos 3,0 \log_{10} de ADN y de manera aún más preferida al menos 3,5 \log_{10} de ADN (lo que corresponde a una eliminación de más del 99% del ADN celular) conservando al mismo tiempo un rendimiento en virus de la rabia de al menos el 70% (es decir que se encuentra en el eluido una cantidad de virus de la rabia que corresponde al menos al 70% de la que se ha puesto inicialmente en contacto con el soporte cromatográfico) y de manera preferida de al menos el 80%. Estos rendimientos son observados en particular cuando el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia no contiene suero animal o proteína sérica como la albúmina. Así, las cantidades de proteínas totales y de ADN medidas en el eluido cromatográfico contienen, respectivamente, menos del 40% de la cantidad de proteínas totales presente en el volumen de sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia, que se ha puesto en contacto con el soporte cromatográfico, y menos del 5%, preferentemente menos del 2,5% y de manera aún más preferida menos del 1% de la cantidad de ADN también presente en el volumen de sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia, que se ha puesto en contacto con el soporte cromatográfico. Por el contrario, al menos el 70% y de manera preferida al menos el 80% de la cantidad de virus de la rabia presente en el volumen del sobrenadante que se ha puesto en contacto con el soporte cromatográfico se encuentra en el eluido.

Las "proteínas totales" en el sentido de la invención representan todas las proteínas que están presentes en el material analizado. Esto comprende las proteínas del virus de la rabia, las proteínas celulares, las proteínas del medio de cultivo celular y/o del medio de infección viral y las proteínas que son introducidas durante la aplicación del procedimiento de producción y de purificación del virus de la rabia (por ejemplo la tripsina y/o la benzonasa). Las proteínas celulares y las proteínas del medio de cultivo y/o del medio de infección viral, así como las proteínas que se han introducido durante la producción y/o la purificación del virus de la rabia representan las impurezas (impurezas proteicas) que se desea eliminar, mientras que se desea conservar al máximo las proteínas del virus de la rabia. Las proteínas del virus de la rabia son la glicoproteína G, la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, la proteína de matriz M, la ARN polimerasa L.

La cantidad de virus de la rabia se evalúa sobre la base de la medición de la glicoproteína G del virus de la rabia. Se realiza habitualmente mediante un método ELISA de tipo "sándwich" utilizando dos anticuerpos que reconocen preferentemente dos epítomos conformacionales de la proteína G, como se describe en el ejemplo 1. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo neutralizante que reconoce un epítomo conformacional localizado en el sitio antigénico IIc de la glicoproteína G (Journal of Clinical investigation (1989), vol. 84, p. 971 a 975) como anticuerpo de captura y un anticuerpo neutralizante que reconoce un epítomo conformacional localizado en el sitio antigénico III de la glicoproteína G (Biologicals (2003), vol. 31, p. 9 a 16) como anticuerpo de revelación. Los resultados son expresados en UI sobre la base de la utilización de un patrón de referencia, que ha sido calibrado con respecto a la referencia internacional del NIBSC.

Para medir la cantidad de proteínas totales, se utiliza el método de Bradford bien conocido por el experto en la materia.

Para medir la cantidad de ADN, se utiliza preferiblemente un método de PCR cuantitativa (qPCR) basado en la cuantificación de un fragmento de ADN del genoma de la célula (preferentemente se determina un fragmento de ADN que se repite numerosas veces en el genoma de la célula). Cuando el virus de la rabia está producido a partir de células Vero, la cuantificación del ADN residual durante el procedimiento de purificación del virus está basada en la cuantificación del fragmento de ADN alfa satélite del mono verde africano después de la amplificación PCR utilizando un método similar al descrito por Lebron J.A. *et al.* en Developments in Biologicals (2006), vol 123, p. 35-44 y que se detalla en el ejemplo 1. Este método es muy ventajoso, ya que permite medir todos los ADN celulares que tienen más de 200 pares de bases.

El sobrenadante de cultivo que contiene el virus de la rabia está producido a partir de un cultivo de células que han sido infectadas por el virus de la rabia. Cualquier cultivo de células en los que el virus de la rabia se replica es conveniente para el objeto de la invención. Puede tratarse de cultivos primarios de tejidos animales, como los cultivos primarios embrionarios de pollos (por ejemplo, los cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollos (PECF)), los cultivos primarios de cerebros de ratoncillos, los cultivos primarios de riñón de mono, de conejo, de hámster o de perro, pero de manera preferida, se utiliza un cultivo de células que proviene de líneas celulares establecidas que derivan de los cultivos primarios de tejidos animales. Se trata en particular de las líneas de células que provienen de primates tales como la línea VERO, WI-38, MRC5, PERC.6, la línea 293 de caballos, de vacas (tal como la línea MDBK), de carnero, de perros (tales como la línea MDCK), de gatos, de roedores (tales como la línea BHK21, HKCC o CHO).

De manera particularmente preferida, se utiliza la línea de células Vero que comprende numerosas ventajas: es una línea continua fácilmente cultivable a escala industrial, que tiene un poder mutágeno muy bajo y que es muy sensible al virus de la rabia.

Las células pueden ser cultivadas en suspensión o sobre un soporte según que tengan propiedades de adhesión o no, en modo "batch", "feed batch" o según un modo de cultivo en continuo y por perfusión. En el caso de cultivo de líneas celulares a escala industrial o semi-industrial, se utilizan generalmente unos biogeneradores, cuyo volumen es superior a 10 litros y que pueden ir hasta más de 2000 litros, que comprende un sistema de agitación, un dispositivo de inyección de una corriente gaseosa de CO₂ y un dispositivo de oxigenación. Están equipados de sondas que miden los parámetros internos del biogenerador como el pH, el oxígeno disuelto, la temperatura, la presión de la cuba o algunos parámetros fisicoquímicos de cultivo (como el consumo en glucosa, de glutamina o la producción de lactatos y de iones amonios). Las sondas de pH, de oxígeno y de temperatura están unidas a un bioprocesador que asegura permanentemente la regulación de estos parámetros. En el caso de líneas celulares adherentes cultivadas en biogeneradores, el medio de cultivo contiene unos microportadores que son unas microesferas en las que se fijan las células. Estos microportadores se mantienen en suspensión por agitación mecánica, o por medio de una corriente gaseosa. En el caso de las células de la línea Vero, se utiliza habitualmente unos microportadores cuya matriz electrostática adhesiva es a base de dextrano sustituido por unos grupos N,N-dietilaminoetilo, que son comercializados en particular por Amersham Biosciences bajo la denominación de Cytodex 1 o Cytodex 2. Se pueden utilizar también como microportadores unas microesferas de Cytodex 3 comercializadas por Amersham Biosciences.

El medio que sirve para el cultivo de las células también denominado medio de cultivo celular, puede estar complementado o no de suero de origen animal, o contener una o varias proteínas séricas como la albúmina, o estar desprovisto de cualquier proteína de origen animal, o incluso estar desprovisto de cualquier proteína. De manera

preferida, se utiliza un medio de cultivo celular desprovisto de cualquier suero animal o de cualquier proteína sérica, tal como la albúmina, que puede ser el origen del desarrollo de la reacción de hipersensibilidad en el sujeto vacunado (Swanson MC et al., Journal of Infectious Disease (1987); 155(5) 909-913). De manera particularmente preferida, se utiliza un medio de cultivo desprovisto de cualquier proteína de origen animal, o incluso de cualquier producto de origen animal. Por "proteína o producto de origen animal" se entiende una proteína o un producto cuyo procedimiento de fabricación comprenda al menos una etapa en la que se utiliza una materia que proviene del animal o del ser humano. Esto permite disminuir los riesgos de transmisión de enfermedades tales como la BSE, que pueden estar relacionadas con la utilización de productos biológicos de origen animal. El medio de cultivo contiene generalmente muy bajas cantidades de proteínas producidas, por ejemplo, en forma de proteínas recombinantes o extractos de vegetales (soja, arroz, etc.) o de levaduras. La concentración en proteínas es generalmente ≤ 15 mg/l medida mediante el método de Bradford. Frecuentemente, contiene esencialmente unas proteínas de bajo peso molecular (≤ 10 KDa) que son en realidad unos polipéptidos. Es el caso, en particular, del medio VP SFM comercializado por Invitrogen que es conveniente para el procedimiento según la invención, en particular para el cultivo de células Vero. Se citan también los medios Opti Pro™ serum-free (Invitrogen), Episerf (Invitrogen), Ex-cell® MDCK (Sigma-Aldrich), Ex-Cell™ Vero (SAFC biosciences) MP-BHK® serum free (MP Biomedicals), SFC-10 BHK express serum free (Promo cell), SFC-20 BHK express protein free (Promo cell), HyQ PF Vero (Hyclone Ref. SH30352.02), Hyclone SFM4 Megavir, el medio MDSS2 (Axcell biotechnology), el medio DMEM Iscove modificado (Hyclone), los medios nutritivos de Ham (Ham -F10, Ham-F12), el medio de Leibovitz L-15 (Hyclone), que son unos medios desprovistos de cualquier producto de origen animal y que contienen generalmente bajas cantidades de proteínas (≤ 15 mg/l).

El virus de la rabia puede provenir de cualquier origen, siempre que se reproduzca en las células sensibles al virus de la rabia. Se utiliza generalmente unas cepas de virus de la rabia establecidas a partir de aislados primarios, como la cepa Pasteur 2061, la cepa VP-11, la cepa Pitman-Moor 1.503-3 M. Estas cepas, muy virulentas, son destinadas a la fabricación de vacunas inactivadas contra la rabia. Se puede también utilizar unas cepas de virus de la rabia atenuadas con el objetivo de producir una vacuna viva atenuada contra la rabia. Se trata por ejemplo de la cepa SAD Bern o de la cepa SAD B19, o de las cepas derivadas de estas, como las cepas SAG1 y SAG2, que derivan de la cepa SAD Bern debido a la existencia de mutaciones puntuales a nivel de la glicoproteína G del virus de la rabia (EP350398, EP583998). El documento EP1253197 describe también otras cepas de virus de la rabia atenuadas más estables que comprenden una o varias mutaciones puntuales a nivel de la fosfoproteína P y de la glicoproteína G del virus de la rabia.

El sobrenadante de cultivo de las células infectadas por el virus de la rabia se obtiene utilizando un medio de infección viral que sustituye el medio de cultivo celular en el momento de la infección de las células y que sirve para la producción del virus de la rabia por las células infectadas. La composición química del medio de infección viral puede ser idéntica o diferente de la composición del medio de cultivo celular. El medio de infección viral, como el medio de cultivo celular, puede ser complementado de suero de origen animal o en una o varias proteínas séricas, pero de manera preferida, el medio de infección viral está desprovisto de cualquier suero animal o de cualquier proteína sérica por las razones invocadas anteriormente. De manera particularmente preferida, el medio de infección viral está desprovisto de cualquier proteína de origen animal, o incluso de cualquier producto de origen animal para prevenir los riesgos de transmisión de enfermedades tales como la BSE, que pueden estar relacionadas con la utilización de los productos biológicos de origen animal. Contiene generalmente muy bajas cantidades de proteínas producidas por ejemplo en forma de proteínas recombinantes o extraídas de vegetales (soja, arroz, etc.) o de levaduras. La concentración en proteínas es generalmente ≤ 15 mg/l, medida mediante el método de Bradford. Frecuentemente, contiene esencialmente unas proteínas de bajo peso molecular (≤ 10 kDa) que son en realidad unos polipéptidos. En un aspecto particular, el medio de infección viral no contiene proteína que tiene un peso molecular superior a 10 kDa. Como medio de infección viral desprovisto de cualquier producto de origen animal y poco dosificado en proteínas (concentración ≤ 15 mg/l), se cita el medio VP SFM (Invitrogen), el medio de Leibovitz L-15, el medio MEM (Sigma-Aldrich), el medio Hyclone SFM4Megavir™ (Hyclone) o eventualmente uno de los medios a base de extractos vegetales, tales como se describen en la solicitud WO 99/4768. Por ejemplo, cuando el virus de la rabia está producido a partir de un cultivo de células de la línea Vero, el sobrenadante de cultivo de las células infectadas es generalmente obtenido utilizando como medio de infección viral un medio desprovisto de cualquier proteína sérica o incluso de cualquier producto de origen animal, como los descritos anteriormente.

En función de la composición del medio de cultivo celular y del medio de infección viral, el sobrenadante de cultivo de las células infectadas por el virus de la rabia puede ventajosamente:

- estar desprovisto de cualquier proteína sérica, o
- estar desprovisto de cualquier proteína exógena de origen animal, o incluso
- estar desprovisto de cualquier producto exógeno de origen animal.

Cuando el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de cualquier proteína exógena o está desprovisto de cualquier producto exógeno de origen animal, las proteínas exógenas de origen no animal que se encuentran en el sobrenadante son en general de una concentración muy baja (≤ 15 mg/l), medida mediante el método de Bradford.

Por "proteína o producto exógeno" se entiende cualquier producto o cualquier proteína que no es un componente del virus de la rabia o de las células que sirven para la producción del virus de la rabia. Las proteínas o los productos exógenos son unos componentes introducidos durante la producción y/o la purificación del virus de la rabia. Por ejemplo, las proteínas o los productos presentes en la composición de los medios de cultivo, las enzimas tales como la tripsina o la benzonasa que son introducidas o los productos que son introducidos durante la producción y/o la purificación del virus de la rabia son unas proteínas o unos productos exógenos. Las proteínas/productos exógenos son de origen animal cuando su procedimiento de fabricación comprende al menos una etapa en la que se utiliza una materia que proviene del animal o del ser humano. Las proteínas/productos exógenos son de origen no animal cuando son fabricados por otros medios, por ejemplo utilizando una materia vegetal, por síntesis química o por recombinación genética utilizando unas levaduras, unas bacterias o unas plantas.

La cosecha de los sobrenadantes de cultivo que contienen el virus infeccioso empieza en general 2 a 3 días después de haber infectado las células, y se continúa durante una quincena, ya que el virus es poco lítico. Después de cada cosecha, se vuelven a cultivar las células infectadas con un medio de infección viral nuevo. Las proteínas que se encuentran en los sobrenadantes de cultivo tienen un origen celular, viral o provienen del medio de infección viral y, en una medida muy baja, del medio de cultivo celular. Se pueden conservar todas las cosechas o guardar únicamente las cosechas que tienen unos títulos infecciosos elevados. Las cosechas pueden ser conservadas individualmente. Se puede también mezclar varias cosechas. Se guardan habitualmente las cosechas a una temperatura próxima a +5°C o en forma congelada.

Por precaución, se clarifica en general el sobrenadante de cultivo que contiene el virus a purificar antes de la etapa de cromatografía por intercambio de cationes, a fin de eliminar los restos celulares gruesos, los agregados eventualmente presentes, y los microportadores residuales cuando el cultivo celular se ha realizado sobre microportadores. Cualquier método de clarificación bien conocido por el experto en la técnica puede ser aplicado en el procedimiento según la invención. Se puede por ejemplo centrifugar los sobrenadantes o proceder a una cromatografía por exclusión de tamaño para clarificar el sobrenadante de cultivo. Habitualmente, la clarificación se realiza por filtración tangencial, por filtración frontal sobre membrana y/o por filtración de profundidad utilizando uno o varios filtros cuya porosidad varía habitualmente entre 0,2 y 1,5 μm , preferentemente entre 0,4 y 1,0 μm . La clarificación se puede realizar por medio de una sola filtración del sobrenadante de cultivo en los casos en los que hay pocos restos y agregados. La clarificación se puede realizar también combinando al menos dos filtraciones sucesivas, realizándose la primera filtración por ejemplo con un filtro relativamente grueso que tiene por ejemplo una porosidad comprendida entre 0,3 y 1,5 μm , mientras que la segunda filtración se realiza con un filtro relativamente fino que tiene por ejemplo una porosidad comprendida entre 0,2 y 0,5 μm . Previamente, se puede también prever una etapa de prefiltración utilizando un prefiltro cuya porosidad es importante (entre 2 y 10 μm) para eliminar los restos gruesos. Como filtros que convienen al objeto de la invención, se citan los filtros de celulosa, las fibras de celulosa regeneradas, las fibras de celulosa combinadas con fibras inorgánicas (por ejemplo a base de diatomeas, de perlita, o de sílice ahumado), los filtros de celulosa combinados con unos filtros inorgánicos o unas resinas orgánicas, los filtros a base de polímeros, tales como por ejemplo los filtros de nylon, de polipropileno, de polivinilideno fluorado o de polietersulfona. Estos filtros son comercializados en particular bajo el nombre de Durapore[®], de Millipak[®], de Millidisk[™] distribuido por la compañía Millipore o los filtros distribuidos por la compañía Pall. Como sistema de filtros de profundidad, se citan los filtros de profundidad de la serie AP (AP01, de la serie CP (CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), de la serie HP (HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), de la serie CA (CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90) y de la serie SP (SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90) que son proporcionados por la compañía CUNO, los filtros CUNO Delipid y Delipid Plus, los filtros de profundidad de la serie CE (CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75) y de la serie DE (DE25, DE30, DE35; DE40, DE45, DE50, DE55, DE60, DE65, DE70, DE75) proporcionados por la compañía Millipore corp., los filtros de la serie HC (A1 HC, B1HC, COHC) y los filtros Clarigard and Polygard de la compañía Millipore corp. Como otro sistema de filtración, se citan también los filtros de profundidad distribuidos por ManCel associates (por ejemplo PR 12 UP, PR12, PR 5 UP) o los filtros de PALL y de la compañía SeitzShenk Inc (por ejemplo Bio20, SUPRA EKIP, KS-50P). De manera ventajosa, la etapa de clarificación se puede realizar por medio de una cápsula filtrante que comprende dos membranas de porosidad distintas, lo que es lo mismo que realizar dos filtraciones sucesivas en una sola etapa. Las cápsulas filtrantes Sartopore-2 comercializadas por Sartorius, que comprenden una membrana de 0,8 μm , y una membrana de 0,45 μm , son muy convenientes para clarificar el sobrenadante de cultivo. Si es necesario, se puede también incorporar previamente una etapa de prefiltración, tal como se indica anteriormente.

El sobrenadante de cultivo, clarificado o no, es, en caso de necesidad, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8, preferentemente entre 7,0 y 7,6. Se verifica también que la conductividad del sobrenadante es ≤ 20 mS/cm, preferentemente entre 10 y 20 mS/cm y de manera particularmente preferida entre 14 y 18 mS/cm. El sobrenadante de cultivo es después introducido en una columna cromatográfica intercambiadora de cationes que contiene las partículas de Fractogel[®] EMD S03⁻ (tipo M) y cuyas dimensiones son adaptadas al volumen de sobrenadante a purificar. La columna está previamente equilibrada en un tampón de equilibración de baja fuerza iónica (≤ 200 mM). La columna es después lavada con un tampón de lavado que tiene generalmente la misma composición que el tampón de equilibración. Se encuentran en la salida de la columna, principalmente las impurezas proteicas y los ácidos nucleicos. Se eluye después el virus retenido en la columna utilizando un tampón de elución cuya fuerza iónica es de al menos 400 mM. A título de ejemplo de soluciones tampones que son muy convenientes para el objeto de la invención, se cita el tampón 20 mM, NaCl 150mM, pH=7,5 para equilibrar y lavar la columna, y el tampón

Tris 20 mM, NaCl 600 mM, pH=7,5 como tampón de elución del virus, pero también podrá convenir cualquier otra solución tampón equivalente. Las capacidades de carga de la columna son respetadas, por lo tanto se recupera en el eluido más del 70% de la cantidad de virus que ha sido inicialmente introducida en la columna, mientras que las cantidades de ADN y de proteínas totales presentes en el eluido representan respectivamente menos del 5% y menos del 40% de las cantidades iniciales de ADN y de proteínas totales introducidas en la columna. Estos resultados son obtenidos en particular en los casos en los que los sobrenadantes de cultivo infecciosos están desprovistos de suero de origen animal, o que no contienen proteína sérica, o que contienen únicamente unas proteínas exógenas de origen no animal a bajas concentraciones (≤ 15 mg/l).

Los inventores han mostrado también que combinando una etapa de cromatografía por intercambio de cationes sobre un soporte que comprende una matriz de polimetacrilato en la que se han injertado por enlace covalente unos grupos sulfoisobutilo con una etapa de digestión enzimática de los ácidos nucleicos, era también posible disminuir la cantidad de ADN residual de aproximadamente 1,5 a 2 \log_{10} suplementarios, si bien combinando estas dos etapas se llega a eliminar al menos 4,0 \log_{10} de ADN. A título comparativo, utilizando un procedimiento de eliminación de los ácidos nucleicos basado en una digestión enzimática de los ácidos nucleicos que se repite dos veces, se obtiene un nivel de eliminación de ADN que no supera 3,5 \log_{10} , no permitiendo la segunda digestión disminuir la cantidad residual de ADN más allá de 0,5 a 1 \log_{10} suplementario (véase el ejemplo 2). Como agente enzimático de digestión de los ácidos nucleicos, se pueden utilizar una o varias enzimas, preferentemente una ARNasa y/o una ADNasa, o una mezcla de endonucleasas conocida por el experto en la materia, como por ejemplo la PulmozyneTM. En el ámbito del procedimiento según la invención, se utiliza generalmente la BenzonaseTM, obtenida preferentemente por recombinación genética, en una gama de concentración generalmente comprendida entre 1 y 50 U/ml. Es una endonucleasa que actúa cortando rápidamente el ADN y el ARN celulares en forma de fragmentos muy pequeños y que reduce la viscosidad del medio. La temperatura y la duración del tratamiento enzimático son unos parámetros fácilmente controlables por el experto en la técnica y dependen de la concentración inicial de la endonucleasa en el medio de reacción. Para evitar cualquier fenómeno de agregación se puede añadir al eluido cromatográfico una cantidad muy baja de un agente tensioactivo, que es preferentemente no iónico, como el poloxamer 188 (Pluronic F 68) a una concentración muy baja. Previamente a la etapa de tratamiento enzimático, se puede eventualmente concentrar el eluido cuando el volumen es importante. La etapa de concentración está generalmente realizada por ultrafiltración sobre membrana que tiene un límite de corte comprendido entre 100 kDa y 300 kDa, de manera preferida entre 100 kDa y 200 kDa. La ultrafiltración se caracteriza por un flujo tangencial sobre la membrana induciendo una fuerza que permite la difusión de las moléculas a través de la membrana porosa. El flujo impuesto por una bomba de recirculación se reparte en dos componentes: el flujo de recirculación que asegura el barrido (o flujo retentado) y el flujo de filtrado (permeado) que atraviesa la membrana. La composición de la membrana puede ser, de manera no limitativa, de celulosa regenerada, de polietersulfona, de polisulfona o de derivados de estos productos. Puede presentarse en forma de hojas planas en el interior de casetes (en particular para la ultrafiltración tangencial) o de fibras huecas. Las membranas son comercializadas en particular por Pall bajo las denominaciones de OmégaTM, por Millipore bajo las denominaciones de membranas BiomaxTM, por Sartorius bajo la denominación de Sartocon[®]. Se puede también ejercer una contra-presión a nivel del filtrado (permeado) a fin de reducir la presión transmembranaria como se describe en el documento WO 2006/108707. A medida que el eluido atraviesa la membrana, el volumen del eluido disminuye y el virus que no atraviesa la membrana se concentra. Cuando se ultrafiltra el eluido, se puede disminuir su volumen de un factor que puede ir de 1 a 100, incluso 150, permitiendo así obtener el volumen final deseado. Esta etapa puede ser completada con una etapa de diafiltración, que permite modificar la composición del tampón sin por ello modificar el volumen del retentado. Esto se aconseja cuando la composición del tampón en el retentado, debido a la disminución de volumen del eluido, no es ya compatible con una buena actividad enzimática de la endonucleasa. Se procede entonces añadiendo al flujo de recirculación del retentado, un tampón cuya composición es compatible con una buena actividad enzimática de la endonucleasa. Se citan, a título de ejemplo y sin carácter de restricción, unas composiciones de tampón compatibles con una buena actividad enzimática de una endonucleasa como la BenzonaseTM: contienen un tampón Tris en un intervalo de concentración en molaridad que va de 10 a 50 mM, MgCl₂ en un intervalo de concentración que va generalmente de 1 a 10 mM y eventualmente otra sal tal como NaCl en un intervalo de concentración que va de 100 mM a 600 mM, situándose el pH de estas soluciones tampones en un intervalo de pH que va de 7,0 a 8,0. Como se indicó anteriormente, se puede también tratar directamente el eluido recogido después de la etapa de cromatografía añadiendo MgCl₂ en un intervalo de concentración que va generalmente de 1 a 10 mM y después una endonucleasa, tal como la BenzonaseTM a la concentración deseada.

Para completar la eliminación de las impurezas proteicas, y eliminar en particular la benzonasa, se somete el eluido tratado con la endonucleasa a una etapa de ultracentrifugación sobre gradiente de sacarosa, pudiendo repetirse esta etapa de ultracentrifugación una o varias veces. La ultracentrifugación permite el aislamiento del virus de la rabia actuando sobre la diferencia de coeficiente de sedimentación entre las diferentes entidades presentes en el eluido: las impurezas proteicas migran en las bajas densidades de sacarosa ($\leq 35\%$ de sacarosa) mientras que el virus de la rabia se sitúa en las densidades más fuertes de sacarosa ($\geq 35\%$ de sacarosa). La etapa de ultracentrifugación sobre gradiente de sacarosa está generalmente realizada según el método denominado de "flujo continuo" cuando los volúmenes a tratar son importantes o en un rotor cuando los volúmenes son relativamente bajos. La ultracentrifugación sobre gradiente de sacarosa se realiza habitualmente sobre "cojines de sacarosa" a una temperatura próxima a 5°C. El eluido tratado con una endonucleasa puede estar en forma no concentrada o concentrada 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, o incluso más. La relación entre el volumen total

del eluido a ultracentrifugar y el volumen total del gradiente de sacarosa se sitúa habitualmente entre 0,5 y 2,0 y de manera preferida entre 0,5 y 1,5. La densidad del "cojín" de sacarosa de baja densidad se sitúa habitualmente en un intervalo que va del 10 al 35% p/p mientras que la densidad del "cojín" de sacarosa de fuerte densidad se sitúa habitualmente en un intervalo que va del 40 al 60% p/p. El volumen de sacarosa de baja densidad es generalmente más importante que el volumen de sacarosa de fuerte densidad y aún más si el volumen del eluido sometido a la etapa de ultracentrifugación es importante. Habitualmente, la relación entre el volumen de sacarosa de fuerte densidad y el volumen de sacarosa de baja densidad se sitúa ente 0,3 y 0,7. La duración de la ultracentrifugación está en función de la velocidad de ultracentrifugación que es general ≥ 30000 g. Generalmente, es suficiente un tiempo de ultracentrifugación de 2 horas cuando la velocidad de ultracentrifugación es ≥ 65000 g. Después de la ultracentrifugación, el producto repartido en el gradiente es descargado en la bomba peristáltica y fraccionado. La cantidad de sacarosa contenida en cada fracción se mide con la ayuda de un refractómetro. Se mide también en cada fracción la cantidad de virus de la rabia en base al ensayo de la glicoproteína gpG por ELISA y la cantidad de proteínas totales mediante el método de Bradford. Se establece así el perfil de separación. Al final de estos análisis, las fracciones del gradiente que contienen esencialmente el virus de la rabia se seleccionan y se reúnen. Se llega a eliminar durante esta etapa más del 85% y preferentemente más del 90% de las proteínas totales, esencialmente las impurezas proteicas ya que el rendimiento en virus de la rabia es $\geq 70\%$ y preferentemente $\geq 80\%$.

Así, en el procedimiento de purificación según la invención, cuando se combina la etapa de clarificación del sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia, la etapa de cromatografía por intercambio de cationes sobre un soporte constituido de una matriz de tipo polimetacrilato en la que se injertan por enlace covalente unos grupos sulfoisobutilo, seguida eventualmente de una concentración y/o diafiltración por ultrafiltración del eluido, la etapa de tratamiento por una endonucleasa del eluido y la etapa de ultracentrifugación sobre gradiente de sacarosa, se obtiene una composición de virus de la rabia purificado que, para una cantidad en virus de la rabia que corresponde a 4,5 UI (en base a la medición de la gpG por ELISA) o a una dosis de vacuna eficaz, contiene menos de 50 pg de ADN residual, de manera preferida menos de 20 pg de ADN residual y de manera aún más preferida menos de 10 pg de ADN residual (medido por qPCR) y contiene menos de 40 μg de proteínas totales, de manera preferida menos de 20 μg de proteínas totales (medido mediante el método de Bradford). Habitualmente, al menos el 70% de las proteínas totales son unas proteínas virales. El rendimiento global en virus purificado es de al menos el 45%, de manera preferida de al menos el 50% y de manera particularmente preferida de al menos el 60%. El rendimiento global en virus purificado se calcula en base a la relación entre la cantidad de virus presente en la (las) fracción(es) del gradiente recogida(s) después de la ultracentrifugación y la cantidad de virus inicialmente presente en el volumen de sobrenadante viral que ha sido tratado. Paralelamente, se elimina más de 4 \log_{10} de ADN y más del 95% de las proteínas totales (véase la tabla I). De manera preferida, el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de cualquier proteína sérica o desprovisto de cualquier proteína exógena de origen animal, o incluso desprovisto de cualquier producto exógeno de origen animal, para garantizar en particular una seguridad biológica más alta de la composición vacvina.

Como ejemplo, la tabla I siguiente indica para cada etapa del procedimiento de purificación del virus de la rabia a partir de un sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas, las cantidades de virus recuperadas así como las cantidades de ADN y de proteínas eliminadas.

Tabla I: Tabla que resume las diferentes etapas del procedimiento de purificación del virus de la rabia con los rendimientos asociados en virus y las cantidades de ADN y de proteínas eliminadas.

Etapa	Cantidad de virus recuperado (en %)*		Cantidad de proteínas eliminadas (en %)**		Cantidad de ADN eliminado (en \log_{10})***	
	En la etapa	global	En la etapa	global	En la etapa	global
Clarificación	90	90	ND	ND	ND	ND
Cromatografía sobre soporte EMD/SO ₃ ⁻	89	80	60	60	ND	ND
Ultrafiltración/diafiltración	97	77	18	67	2,7	2,7
Tratamiento benzonasa + Ultra centrifugación sobre cojines de sacarosa	70	54	88	96	1,6	4,3

*: la cantidad de virus de la rabia se determina en base al ensayo de la glicoproteína G del virus de la rabia por ELISA según el método descrito en el ejemplo 1

**: la cantidad de proteínas totales se mide mediante la técnica de Bradford

***: la cantidad de ADN se mide por qPCR según el método descrito en el ejemplo 1.

ND: No determinado

El virus de la rabia purificado extraído después de la etapa de ultracentrifugación está generalmente en forma demasiado concentrada que se diluye frecuentemente para evitar la formación de agregados víricos durante el almacenamiento. Se utiliza habitualmente como tampón de dilución un tampón fosfato a un pH de aproximadamente 8, eventualmente adicionado de una solución salina como, por ejemplo, una solución de cloruro de sodio. Gracias al procedimiento según la invención, la suspensión de virus de la rabia purificada obtenida se puede utilizar como vacuna de virus vivos o atenuados, o como vacuna de virus inactivados. Cuando la vacuna se destina a la medicina humana, se inactiva generalmente la suspensión de virus purificada.

Etapa de inactivación viral

El procedimiento de purificación del virus de la rabia tal como se describe en la invención se termina por una etapa de inactivación viral cuando el virus está destinado a la fabricación de una vacuna inactivada. La inactivación viral puede ser realizada por medio de agentes químicos bien conocidos por el experto en la materia tales como el formaldehído, el glutaraldehído, o la β -propiolactona. Se puede utilizar también el procedimiento de inactivación tal como se describe en el documento WO 2005/093049 que consiste en poner en contacto la solución viral purificada con un compuesto hidrofóbico fotoactivable y en exponer esta mezcla a la luz. Entre los compuestos hidrofóbicos fotoactivables se cita el azidobenceno, 1-azidonaftaleno, 4-azido-2-nitro-1-(feniltio)benceno, 1-azido-4-yodobenceno, 1-azido-5-yodonaftaleno, 3-fenil-3H-diazireno, 3-fenil-3-(trifluorometil)-3H-diazireno, 3-(3-yodofenil)-3-(trifluorometil)-3H-diazireno, 1-azidopireno, adamantanodiazireno, ácido 12-(4-azido-2-nitrofenoxi)-esteárico, ácido w-(m-diazirinofenoxi) graso, ácido 12-[(azidocarbonil)oxi]esteárico, ácido 12-azidoesteárico, ácido 11-(3-azidofenoxi)undecanoico o ácido w-(m-diazirinofenoxi)undecanoico o el 1,5-yodonaftilazido. De manera preferida, se utiliza la β -propiolactona (BPL) ya que es al mismo tiempo un agente de inactivación viral y un agente alquilante que conlleva cortes en el ADN. Por lo tanto, puede contribuir también a la reducción del nivel de ADN residual y a la inhibición de su actividad biológica. La inactivación del virus de la rabia se realiza por medio de una solución de β -propiolactona diluido entre 1/3500 y 1/4000 (concentración volúmica final en la solución que contiene el virus purificado) a una temperatura de aproximadamente 12°C. Cuanto más baja sea la concentración en β -propiolactona, más importante es el tiempo necesario para la inactivación del virus. Generalmente, la inactivación del virus se realiza en un intervalo de tiempo que va de 12h a 48h. Se neutraliza la actividad de la β -propiolactona por simple calentamiento de la solución a una temperatura de aproximadamente 37°C durante aproximadamente 2h. Se verifica después que el pH de la solución es $> 7,0$. Si es necesario, se rectifica el pH por medio de una solución de sosa diluida o alternativamente, antes del tratamiento con β -propiolactona, la solución que contiene el virus purificado se tampona por medio de una solución a base de un tampón fosfato, pH ~ 8 , lo que evita cualquier acidificación de la solución durante la hidrólisis de la β -propiolactona.

La suspensión viral purificada según el procedimiento de la invención está generalmente conservada en un tampón de conservación como, por ejemplo, en un tampón Tris o un tampón fosfato. A pesar de que se pueda mezclar directamente la suspensión viral purificada con el tampón de conservación, se procede generalmente a una etapa de diafiltración por ultrafiltración en un tampón de conservación, si es necesario completada por una etapa de concentración si el virus purificado no está suficientemente concentrado. Cuando una etapa de ultrafiltración se lleva a cabo, se utiliza una membrana cuyo umbral de corte está generalmente comprendido entre 5 kDa y 100 kDa, de manera preferida entre 8 kDa y 50 kDa. La cantidad de virus purificado así preparado se esteriliza finalmente por filtración sobre membrana que tiene una porosidad $\leq 0,2 \mu\text{m}$, después se conserva a +5°C aproximadamente o, de manera preferida, en una forma congelada antes de ser repartido en forma de vacunas unidosis o multidosis. Se puede incluir también una etapa suplementaria de liofilización de las preparaciones vacvíneas. En este caso, la composición del tampón de conservación se selecciona de tal manera que puede ser liofilizado. El rendimiento global del virus purificado inactivado calculado aquí en base a la relación entre la cantidad de virus presente en la cantidad de virus purificado obtenido después de la etapa última de filtración esterilizante y la cantidad de virus presente inicialmente en el volumen de sobrenadante viral (antes de la clarificación) que se ha tratado es aún de de al menos el 40%, lo que demuestra el interés industrial de tal procedimiento de purificación.

En definitiva, una vacuna que contiene un virus de la rabia purificado puede ser producida con un rendimiento muy bueno y con una pureza muy alta utilizando un procedimiento según el cual las etapas:

- de producción de un lote de células a partir de un banco de células, generalmente a partir de un banco celular de trabajo,
- de producción del virus de la rabia después de la infección del lote de células, y
- de purificación del virus de la rabia a partir del sobrenadante de cultivo de células infectadas,

son todas realizadas utilizando unos productos exógenos de origen no animal.

Gracias a este procedimiento, la vacuna obtenida está desprovista de cualquier producto exógeno de origen animal.

Por lo tanto, la invención tiene también por objeto un procedimiento de fabricación de una vacuna contra la rabia según el cual:

- a) se produce un lote de células,
- b) se infecta el lote de células con un virus de la rabia,
- c) se purifica el virus de la rabia a partir del sobrenadante de cultivo de células infectadas según el procedimiento de la invención,
- 5 d) se mezcla la suspensión de virus purificado en un tampón de conservación, y
- e) se reparte la mezcla en forma de vacunas unidosis o multidosis.

Según una variante del procedimiento de fabricación de la vacuna, el tampón de conservación es un tampón de liofilización. En este caso, se mezcla la suspensión de virus purificado con el tampón de liofilización, se reparte la mezcla en forma de vacunas unidosis o multidosis y después se liofilizan las dosis vacvíneas.

- 10 Según una variante preferida del procedimiento de fabricación de la vacuna, todas las etapas del procedimiento se realizan utilizando unos productos de origen no animal. En este caso, la vacuna obtenida está desprovista de cualquier producto exógeno de origen animal y ofrece así una mayor seguridad biológica.

15 El virus de la rabia contenido en la vacuna obtenida según el procedimiento de la invención puede ser inactivado o atenuado. El análisis densitométrico del perfil electroforético de una muestra de vacuna obtenido después de la electroforesis sobre gel de poliacrilamida y revelación con azul de Coomassie muestra en efecto que más del 70% de las proteínas son de origen viral. Se encuentran esencialmente las 5 proteínas del virus de la rabia (es decir la glicoproteína G, la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, la proteína de matriz M, la ARN polimerasa L) sobre un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) realizado en presencia de 2-mercaptoetanol.

20 Además, el análisis granulométrico de una muestra de vacuna por medio del aparato Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) que mide el movimiento browniano de las partículas sobre la base de la difusión "casi elástica" de la luz (Dynamic Light scattering) muestra la existencia de una sola población de partículas comprendida entre 100 y 300 nm con un valor medio de 180 nm que corresponde al tamaño medio del virus de la rabia. El análisis de una muestra de vacuna por microscopio electrónico revela también la presencia de partículas virales que tienen la forma clásica de obús. La vacuna obtenida según el procedimiento de la invención está por lo tanto en forma de una suspensión homogénea de virus de la rabia purificados enteros, caracterizada por que el análisis granulométrico por medio del aparato zetasizer Nano ZS muestra la existencia de un solo pico comprendido entre 100 y 300 nm aproximadamente. Esta suspensión homogénea de virus de la rabia purificados con las características de pureza tales como se las descritas, se obtiene aplicando el procedimiento de purificación tal como se ha descrito en la invención.

30 El ensayo admitido por la OMS para evaluar la eficacia de la vacuna antirrábica es el ensayo NIH (descrito en particular en la monografía de la Farmacopea Europea nº 216 referente a las vacunas de la rabia preparadas a partir de un cultivo de células y destinadas a la medicina humana). Para ser eficaz, una dosis de vacuna debe contener al menos 2,5 UI según el ensayo NIH. La administración de una dosis eficaz de vacuna antirrábica (es decir, al menos 2,5 UI según el ensayo NIH) por vía intramuscular en el ser humano según los protocolos de vacunación o de serovacunación habitualmente recomendados induce el desarrollo de una inmunidad protectora. Por otra parte, se ha puesto en evidencia que cuando la cantidad de virus de la rabia contenida en una dosis de vacuna obtenida según el procedimiento de la invención es de al menos 4,5 UI en base a la medición de la glicoproteína G por ELISA, esta cantidad corresponde a al menos una dosis eficaz de vacuna (es decir, que contiene al menos 2,5 UI según el ensayo NIH).

40 El ensayo NIH es un ensayo de prueba realizado en el ratón según el cual se determina la cantidad de una vacuna de ensayo necesaria para obtener la misma protección de los ratones contra los efectos letales de una preparación de virus de la rabia previamente titulada y administrada por vía intracerebral, como la que se observa con una cantidad de una preparación de una vacuna antirrábica de referencia. La preparación de la vacuna antirrábica de referencia se calibra en unidades internacionales (UI). La unidad internacional (UI) es la actividad contenida en una cantidad determinada de un estándar internacional. La equivalencia en UI del estándar internacional está establecida por la OMS. Después de haber verificado que los parámetros de control del ensayo de eficacia son bien respetados, se determina entonces a partir de los valores de la dosis protectora al 50% de la vacuna ensayada y de la preparación de referencia (calibrado en UI), el número de UI contenidos en la vacuna de ensayo. Debe ser de al menos 2,5 UI por dosis para ser eficaz en la vacunación.

50 La dosis eficaz de la vacuna inyectada por vía intramuscular en el ser humano está generalmente contenida en un volumen de 0,5 a 1 ml de una suspensión líquida lista para usar u obtenida por simple descongelación, o también obtenida extemporáneamente por reconstitución de un liofilizado con un disolvente.

55 Los protocolos vacvíneos utilizados para proteger al ser humano contra la rabia son bien conocidos y diferentes según se trate de una vacunación preventiva o curativa. Habitualmente, en el caso de una vacunación preventiva, el protocolo de primovacunación comprende dos o 3 inyecciones intramusculares de una dosis eficaz de vacuna. Los recordatorios de vacunas se realizan después, a intervalos regulares por administración de una sola dosis eficaz de

vacuna. En el caso de una vacunación curativa, los protocolos de vacunación difieren según si el individuo expuesto al virus de la rabia ya se vacunó o no, y según los países. El protocolo de vacunación habitualmente recomendado en los sujetos no inmunizados o mal inmunizados paralelamente a la administración de un suero antirrábico comprende 5 inyecciones sucesivas de una dosis eficaz de vacuna por vía intramuscular en un periodo de 1 mes seguido de un recordatorio a 3 meses. El número de inyecciones se reduce a 3, incluso a uno cuando los sujetos expuestos al virus han recibido previamente una vacunación preventiva completa. En el ámbito de la presente invención, pueden ser utilizados otros protocolos de vacunación en el ámbito de la vacunación curativa en unos sujetos no inmunizados o mal inmunizados que permiten reducir el número de inyecciones y/o de cantidad de antígeno vacvíneo administrado. Se trata en particular del protocolo "Zagreb" que comprende 4 inyecciones de una dosis eficaz de vacuna por vía intramuscular (con 2 inyecciones en sitios diferentes que se realizan a día D0, seguido de una inyección a D7 y después a D21) o de protocolos de vacunación por vía intradérmica.

La presente invención se entenderá mejor a la luz de los ejemplos siguientes que sirven para ilustrar la invención sin, no obstante, limitar su contenido.

Ejemplo 1: comparación de diferentes soportes cromatográficos en el procedimiento de purificación del virus de la rabia

1-1) Producción del virus de la rabia sobre células VERO en medio sin suero

Las células de la línea VERO, después de adaptarlas a condiciones de cultivo en medio sin suero como se describe en el documento WO 01/40443, se transfieren en un biogenerador de 10 a 20 litros que contiene unos microportadores de citodex 1 en el medio VP SFM (Invitrogen). Después de un periodo de cultivo de 3 a 4 días a 37°C manteniendo un pH de aproximadamente $7,2 \pm 0,2$, una saturación en oxígeno del $25\% \pm 10\%$ y sometiendo el medio a una baja agitación, las células se infectan con un virus de la rabia con una multiplicidad de infección de 0,01 en un medio de infección viral que contiene un medio VP SFM (Invitrogen). En el caso de los ensayos realizados con el soporte cromatográfico Fractogel EMD-SO₃⁻, la producción del virus de la rabia se realiza a escala de 150 litros utilizando unos biogeneradores de 150 litros. Se han extraído los sobrenadantes de cultivo de las células infectadas en los días D7 (R1); D11 (R2) y D15 (R3). Después de cada cosecha, se reintroduce un medio de infección viral nuevo.

1-2) Clarificación y análisis de las cosechas

La etapa de clarificación se realizó utilizando dos filtraciones frontales sucesivas; la primera utilizando un prefiltro de polipropileno de 8 µm (Sartopure PP2, SARTORIUS) que elimina los pocos microportadores aspirados durante la cosechas, las células Vero despegadas de los soportes y los restos celulares de tamaño importante; la segunda utilizando un filtro PES, compuesto de la combinación de dos filtros de 0,8 µm y 0,45 µm (Sartopure 2, SARTORIUS) que elimina los agregados.

La cantidad de virus de la rabia presente en las cosechas clarificadas se determina midiendo la cantidad de glicoproteína G (gpG) medida mediante el método ELISA siguiente:

Se reparten en los pocillos de una microplaca ELISA aproximadamente 0,12 µg/100µl de una solución de un anticuerpo monoclonal 1112-1 anti-gpG (cuyas características son descritas en Journal of Clinical investigation (1989), volumen 84, páginas 971 a 975) previamente diluida en un tampón de "coating" (tampón carbonato/bicarbonato 0,2 M, pH 9,6). Después de una incubación durante una noche en cámara fría, seguida de varios lavados con un tampón de lavado (tampón fosfato adicionado de Tween 20, 0,05%) se distribuyen en cada pocillo 100 µl de un tampón de saturación (tampón fosfato adicionado de suero de albúmina bovina al 1%). Después de una incubación de una hora a 37°C, seguida de varios lavados, se realiza una gama de dilución de cada muestra a ensayar en un tampón de dilución (tampón fosfato adicionado de Tween 20 al 0,05% y de suero albúmina al 0,1%). En paralelo, se realiza en cada microplaca una gama de dilución de un patrón de referencia, que ha sido calibrado con respecto a la referencia internacional de NIBSC (por ejemplo PISRAV). Después de una nueva incubación de una hora a 37°C, seguida de varios lavados, se distribuyen en cada pocillo 100 µl de una solución de un anticuerpo monoclonal D1 de ratón anti-gpG (cuyas características son descritas en Biologicals (2003), volumen 31, páginas 9 a 16) biotinilado y utilizado después de la dilución al 1/5000 en el tampón de dilución. Las placas se dejan durante 1 hora a 37°C y después se lavan varias veces antes de distribuir en cada uno de los pocillos 100 µl de una solución de estreptavidina acoplada con la peroxidasa (Southern Biotechnology Associates) previamente diluida al 1/15000 en el tampón de dilución. Después de una nueva incubación de una hora a 37°C seguida de varios lavados, se distribuyen en cada pocillo 100 µl de una solución de un tampón citrato 0,05 M, pH 5 que contiene el sustrato de revelación (O-fenilendiamina). Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz, se detiene la reacción de revelación añadiendo 50 µl/pocillo de una solución de H₂SO₄ 2N. La lectura espectrofotométrica de las microplacas se realiza a dos longitudes de onda (492 nm y 620 nm). La densidad óptica medida es la diferencia entre las dos lecturas para tener en cuenta la absorción del plástico. El cálculo de la actividad relativa se efectúa mediante el método de las rectas paralelas según las recomendaciones de la Farmacopea Europea. El valor del virus de la rabia de la muestra se basa en la determinación de la concentración en glicoproteína G del virus de la rabia expresado en UI/ml con respecto a la referencia.

La cantidad de proteínas totales presente en las cosechas clarificadas se midió utilizando el método clásico de Bradford comercializado en forma de un Kit por Biorad (Ref.: 500-0006).

La cantidad de ADN presente en las cosechas clarificadas se midió por q-PCR. El protocolo de realización es similar al descrito por Lebron J.A. *et al.* en *Developments in Biologicals* (2006), vol. 123, p. 35-44. Después de haber extraído por medio del kit comercial DNA Extractor de Wako Pure Chemicals el ADN residual de las cosechas clarificadas, se ha introducido en cada muestra una cantidad fija de un ADN exógeno que sirve de control interno de la amplificación por PCR. En paralelo, se ha preparado una muestra de ADN genómico que proviene de células Vero lisadas por congelaciones/descongelaciones sucesivas, tratadas después con ARNasa A a razón de 2 mg de ARNasa A por $2,5 \cdot 10^5$ células, y que después se ha purificado finalmente utilizando el kit QIAamp Virus BioRobot 9604 (QIAGEN). El ADN purificado se cuantificó por espectrometría a 260 nm. A partir de este ADN purificado (ADN estándar) se ha realizado un rango de calibración realizando unas diluciones a razón de 10. Las muestras que provienen de las cosechas clarificadas así como las muestras del rango de calibración se han sometido después a un ciclo de amplificación por PCR después de haber añadido para cada ensayo la sonda fluorescente Alfa-MPr3, los dos cebadores, la premezcla 2X QuantiTect Probe Master Mix (Qiagen) en un volumen de agua desprovisto de cualquier nucleasa (csp 50 μ l). El ciclo de amplificación se realizó utilizando el aparato Light Cycler 480 (Roche Applied Science) utilizando el programa 95°C, 15 min.; 40 ciclos que comprende dos etapas 95°C, 15 s; 60°C, 60 s. Después, se calculó por interpolación la cantidad de ADN residual extraído de las cosechas clarificadas en base a la medición de la fluorescencia observada con respecto al rango de calibración establecido con el ADN estándar. La cantidad de ADN residual se ajustó mediante un factor correctivo que corresponde al rendimiento de carga medido para la muestra por medio de la cuantificación del ADN exógeno. En general, las concentraciones en glicoproteína G (que corresponde al valor en virus de la rabia), en proteínas totales y en ADN en las cosechas clarificadas se situaban en unos intervalos que van de 1 a 3 UI/ml para la glicoproteína G, de 50 a 100 μ g/ml para las proteínas totales y de 5 a 50 ng/ml para el ADN.

1-3) Medición de los rendimientos de diferentes soportes cromatográficos por su capacidad para eliminar los ácidos nucleicos y para retener el virus de la rabia.

La eliminación del ADN celular en las cosechas clarificadas se evaluó sobre los soportes cromatográficos siguientes:

Soporte aniónico

- Fractogel[®] EMD TMAE (Merck) (intercambiador de aniones fuerte)

- Fractogel[®] EMD DEAE (Merck) (intercambiador de aniones bajo)

30 - Membrana cargada positivamente Sartobind[®] Q (Sartorius)

- Membrana cargada positivamente Mustang[®] Q (Pall)

Soporte catiónico

- Fractogel[®] EMD S03⁺ (Merck) (intercambiador de cationes fuerte)

35 Se han realizado unos ensayos preliminares sobre la membrana cargada positivamente Sartobind[®] a fin de identificar la mejor concentración en sal para eluir el virus por cromatografía intercambiadora de aniones. Estos ensayos han mostrado que el virus era eluido a lo largo el gradiente de sal, incluso a 1M. Esto era también así para los otros soportes aniónicos ensayados. Los perfiles de elución obtenidos han llevado a seleccionar una fuerte concentración en NaCl para eluir el máximo de virus. El ADN empieza a ser eluido a partir de 350-400 mM, por lo tanto el compromiso fue seleccionar una concentración en NaCl de 450 mM.

40 Los soportes aniónicos se equilibraron en tampón TRIS 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,5. Las cosechas clarificadas se pusieron después en contacto con los diferentes soportes estudiados. Los soportes aniónicos se aclararon después en tampón Tris 20 mM, NaCl 150mM, pH 7,5. Se desenganchó después el virus mediante un tampón de elución Tris 20 mM, NaCl 450 mM, pH 7,5.

45 Los ensayos sobre columna de Fractogel[®] se realizaron utilizando la cosechas clarificada R1. Entre 35 y 50 UI de virus de la rabia y entre 13 y 25 μ g de ADN se inyectaron por ml de gel.

Los ensayos sobre membrana se realizaron utilizando la cosecha clarificada R2. Se inyectaron 13 UI de virus de la rabia y entre 350 y 450 ng de ADN por cm² de membrana.

50 Las condiciones de realización utilizadas para la cromatografía intercambiadora de cationes sobre el soporte Fractogel[®] EMD S03⁺ también se optimizaron. El soporte Fractogel[®] EMD S03⁺ se equilibró utilizando un tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH =7,5. Se realizaron los ensayos sobre el soporte Fractogel[®] EMD S03⁺ utilizando la cosecha clarificada R1. Se controló la conductividad del medio (entre 14 mS/cm y 18 mS/cm) y el pH (entre 7,5 y 7,7). Se inyectaron aproximadamente 50 UI (en base a la determinación de la glicoproteína G) de virus de la rabia por ml de gel. Después de extraer el filtrado para medir la cantidad de virus que no está fijado sobre la columna, el soporte se lavó en tampón Tris 20mM, NaCl 150mM, pH= 7,5. Se eluyó después el virus en el tampón Tris 20mM,

NaCl 600 mM, pH=7,5 con recuperación del pico viral en una fracción independiente. Finalmente, el soporte se regeneró en tampón Tris 20mM, NaCl 1M, pH=7,5. Los resultados obtenidos figuran en la tabla II siguiente:

Tabla II: Rendimientos de los diferentes soportes cromatográficos

Características del soporte cromatográfico	Rend ^t , en virus	Valor ADN residual (ng/ml)	Cantidad ADN eliminado (en %).
Mustang Q	47 %	4**	93%
Sartobind Q	50%	1**	98%
Fractogel EMD-TMAE	54%	196**	48%
Fracto gel EMD-DEAE	70%	161**	73%
Fracto gel EMD-SO ₃ ⁻	89%	4,15***	99,7%***

*: el valor en virus de la rabia se determinó en base a la medición de la glicoproteína G por ELISA
 **: el valor en ADN residual se midió por qPCR directamente en el producto recogido
 ***: el valor en ADN residual se midió por qPCR después de la concentración del eluido de un factor 6 por ultrafiltración.

5 Los soportes membranarios cargados positivamente (Sartobind[®] (Sartorius) o Mustang[®] Q (Pall)) facilitan la eliminación del ADN (más del 90% del ADN está eliminado en la fracción recogida) pero por el contrario los rendimientos de virus extraídos son relativamente bajos ($\leq 50\%$). En lo referente a los soportes a base de geles cargados positivamente (Fractogel[®] EMD TMAE (Merck), Fractogel[®] EMD DEAE (Merck) se observa más la tendencia inversa, a saber un mejor rendimiento en virus extraído ($\geq 50\%$) pero en detrimento de la eliminación del ADN (73% del ADN es eliminado en el mejor de los casos). Por el contrario, cuando se utiliza el soporte catiónico Fractogel[®] EMD SO₃⁻, se observa al mismo tiempo una eliminación muy buena del ADN (más del 95% del ADN está eliminado en la fracción recogida) y un rendimiento muy bueno en virus extraído ($\geq 70\%$). Los rendimientos cromatográficos del soporte catiónico Fractogel[®] EMD SO₃⁻ son por lo tanto mejores que los que se constatan con los soportes cromatográficos aniónicos.

1-4) Medición de los rendimientos cromatográficos de diferentes soportes cromatográficos catiónicos

15 Los ensayos anteriores han mostrado que el soporte cromatográfico intercambiador de catión fuerte tenía mejores rendimientos que los soportes aniónicos, se ha buscado determinar las características del soporte cromatográfico intercambiador de cationes fuerte que da los mejores rendimientos ensayando diferentes soportes cromatográficos intercambiadores de cationes fuertes, que se distinguen en particular por su matriz y sus grupos (ligandos). Las características de los diferentes soportes ensayados están descritas a continuación:

20 - Membrana cargada negativamente Sartobind[®] S (Sartorius): membrana celulósica en la que se han injertado unos grupos (ligandos) de ácido sulfónico;

- Membrana cargada negativamente Mustang[™] S (Pall): membrana de polietersulfona en la que se han injertado unos grupos (ligandos) de ácido sulfónico;

25 - Gel Capto[™] S (GE Healthcare): gel cuya matriz es a base de agarosa en la que se han injertado unos grupos (ligandos) sulfo-etilo por medio de brazos espaciadores a base de dextrano;

- Gel SP Sepharose XL (GE Healthcare): gel cuya matriz es a base de agarosa en la que se han injertado unos grupos (ligandos) sulfo-propilo por medio de brazos espaciadores a base de dextrano;

- Toyopearl[®] SP-650 C (Tosoh): resina cuya matriz es a base de polimetacrilato en la que se han injertado unos grupos (ligandos) sulfo-propilo.

30 - Fractogel[®] EMD SO₃⁻ (Merck): gel cuya matriz es a base de polimetacrilato en la que se han injertado unos grupos sulfoisobutilo por medio de brazos espaciadores constituidos de cadenas poliméricas obtenidas por polimerización del monómero que tiene por fórmula química: CH₂=CH-CO-NH-C(CH₃)₂-CH₂-SO₃⁻.

Los geles cuyos ligandos han sido injertados sobre la matriz por medio de brazos espaciadores tienen generalmente una estructura denominada "tentacular" que facilita en general la interacción ligando/proteína.

35 Se evaluaron diferentes parámetros para la cromatografía sobre membrana Sartobind[®] S (Sartorius) (volumen de soporte: 7 ml): el pH de la cosecha clarificada inyectada que se situaba en un intervalo que va de 7,5 a 8,0, la conductividad de la cosecha clarificada que se situaba en un intervalo que va de 4,5 mS/cm a 17,9 mS/cm y la carga viral inyectada que se situaba en un intervalo que va de 4 UI/ml a 11 UI/ml de soporte. Sean cuales sean los parámetros estudiados, los rendimientos en virus obtenidos han sido siempre $\leq 35\%$.

En el caso de la cromatografía sobre membrana Mustang™ S (Pall) (volumen del soporte: 10 ml), el pH y la conductividad de la cosecha clarificada eran respectivamente de 7,5 y de 14 mS/cm mientras que la carga viral inyectada era de 32 UI/ml de soporte. El rendimiento en virus obtenido fue muy bajo ($\leq 10\%$).

- 5 Se aplicó el mismo protocolo de realización que el utilizado para la cromatografía sobre soporte Fractogel® EMD SO₃⁻ para efectuar las otras cromatografías sobre gel (véase el párrafo 1-3). La única distinción se refiere a la regeneración del gel Toyopearl® SP-650 C que se lleva a cabo en un tampón Tris 20mM, NaCl 2M pH 7,5. Se utilizaron las mismas condiciones de pH y de conductividad que las de la cromatografía sobre Fractogel® EMD SO₃⁻. Se respetaron también los límites de capacidad de carga de los diferentes soportes cromatográficos durante la inyección de la carga de virus contenido en el sobrenadante clarificado.
- 10 Salvo el soporte Fractogel® EMD SO₃⁻ en el que se encuentra en el filtrado aproximadamente el 5% de la cantidad total de virus inyectado, las cantidades de virus encontrados en los filtrados de las cromatografías realizadas sobre los 3 otros tipos de soportes (Gel Capto™ S, Gel SP Sepharose XL y gel Toyopearl® SP-650 C) representaban entre el 80 y el 99% de la cantidad total de virus inyectado. Los rendimientos obtenidos en los eluidos son por lo tanto muy bajos (<10%).
- 15 La estructura de los ligandos y de la matriz en los soportes cromatográficos intercambiadores de cationes fuertes desempeñan por lo tanto un papel importante, ya que sólo un soporte que comprende una matriz de polimetacrilato en la que se han injertado unos grupos sulfoisobutilo permite obtener un eluido en el que se recuperan al menos el 70% del virus de la rabia. En conclusión, en el conjunto de los soportes cromatográficos aniónicos y catiónicos ensayados, el soporte Fractogel® EMD SO₃⁻ (Merck) es el único que presenta unos rendimientos que sean realmente explotables en el plano industrial, ya que el rendimiento en virus de la rabia es $\geq 70\%$ mientras que se elimina más del 95% del ADN.
- 20

Ejemplo 2: Interés de la combinación de una etapa de cromatografía sobre soporte Fractogel® EMD SO₃⁻ con una etapa de tratamiento con benzonasa en el procedimiento de purificación del virus de la rabia.

- 25 Para evaluar el interés de esta asociación, se ha comparado este método con un método de purificación del virus de la rabia por doble tratamiento con benzonasa. El tratamiento con benzonasa se utiliza clásicamente para eliminar los ácidos nucleicos que se encuentran en un producto biológico. Cuando se repite este tratamiento enzimático se aumenta aún más la eliminación del ADN.

- 30 Se ha comparado un procedimiento de purificación del virus de la rabia que utiliza un "doble tratamiento con benzonasa" con el protocolo de la invención según el cual se combina una etapa de cromatografía intercambiadora de cationes sobre soporte Fractogel® EMD SO₃⁻ con un tratamiento con benzonasa.

En el caso del doble tratamiento con benzonasa (UF-Bz-UF-Bz) el protocolo de purificación utilizado corresponde al que se describe en la Tabla III siguiente:

Tabla III - Purificación del virus de la rabia por doble tratamiento con benzonasa (UF-Bz-UF-Bz).

Cosecha clarificada 0,45 µm	
Concentración/ diafiltración por ultrafiltración Concentration $\approx 20 \times C$	
Ajuste MgCl ₂ 2mM	
Benzonasa 15U/ml de recolección	
Concentración / diafiltración por ultrafiltración Concentración $\approx 5 \times C$	
Ajuste MgCl ₂ 2mM	
Benzonase® 15 U/ml de cosecha	
Ultracentrifugación sobre gradiente de sacarosa	

En el caso del tratamiento que combina una cromatografía intercambiadora de cationes sobre soporte Fractogel® EMD SO₃⁻ y un tratamiento con benzonasa (CEX-UF-Bz) el procedimiento de purificación utilizado corresponde al que se describe en la Tabla IV siguiente:

Tabla IV

- 5 Purificación del virus de la rabia por combinación de una cromatografía intercambiadora de cationes sobre soporte Fractogel® EMD SO₃⁻ y tratamiento con benzonasa (CEX-UF-Bz)

Cosecha clarificada 0,45 µm	
Cromatografía Fractogel EMD SO ₃ ⁻	
Concentración / diafiltración por ultrafiltración Concentración≈ 100 x C	
Ajuste MgCl ₂ 2mM	
Benzonase® 15 U/ml de cosecha	
Ultracentrifugación sobre gradiente de sacarosa	

En los dos casos, el procedimiento de purificación se ha realizado partiendo de una misma cosecha R1 clarificada de un volumen de aproximadamente 20 litros dividida en dos partes iguales.

- 10 En el caso del procedimiento UF-Bz-UF-Bz las dos concentraciones se realizaron sobre membranas PES Medium Screen 100KDA (PALL) combinadas con una diafiltración en tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5 por ultrafiltración, llevando la primera etapa de ultrafiltración a una reducción de un factor de aproximadamente 20 el volumen de cosecha clarificada, mientras que la segunda ultrafiltración llevó a una reducción de un factor global de aproximadamente 100 el volumen de la cosecha clarificada. Antes de cada tratamiento con benzonasa, se añadió una solución de MgCl₂ de manera que la concentración en el retentado era 2 mM. El tratamiento con benzonasa se realizó añadiendo 15 U/ml de cosecha bruta al medio de reacción y dejando el medio de reacción durante 2 horas a temperatura del laboratorio.

- 15 En el caso del procedimiento CEX-UF-Bz, la etapa cromatográfica se realizó según las modalidades descritas en el párrafo 1-3. El eluido que contiene el virus purificado se concentró después de un factor de aproximadamente 5 y se diafiltró y después trató con benzonasa utilizando el mismo protocolo utilizado en el procedimiento UF-Bz-UF-Bz.

- 20 En los dos procedimientos, la etapa de ultracentrifugación se realizó sobre cojines de sacarosa 34-60% con un rotor 45 tipo Ti a 21000 rpm durante 2h a +5°C. Las fracciones del gradiente que contiene el virus se cosecharon, se reunieron y después se analizaron para su contenido en ADN, en virus y en proteínas totales.

- 25 La tabla V siguiente indica en las diferentes fases de purificación los valores en ADN, en gpG y en proteínas totales, obtenidos en función del procedimiento utilizado.

Tabla V: Resultado de los dos procedimientos de purificación

Fase de purificación	parámetros	Proc. UF-Bz-UF-Bz	Proc. CEX-UF-Bz
Cosecha clarificada	Volumen	9620 ml	9620 ml
	Valor ADN (ng/ml)	270	
	Valor gpG (UI/ml)	1,7	
	ADN/gpG	713 x 10 ³ pg/4,5 UI	
UF-Bz-UF	Volumen	100 ml	
	Valor ADN (pg/ml)	NT	
	Valor gpG (UI/ml)	106,6 UI/ml	

Fase de purificación	parámetros	Proc. UF-Bz-UF-Bz	Proc. CEX-UF-Bz
CEX-UF	Volumen		100 ml
	Valor ADN (pg/ml)		NT
	Valor gpG (UI/ml)		113 UI/ml
Después de UC	Volumen	800 ml	800 ml
	Valor ADN (pg/ml)	1,1 x 10 ³	<0,1
	Valor gpG (UI/ml)	9,7	8,46
	Proteínas totales/gpG	36 µg/4,5 UI	24 µg/4,5 UI
	Valor ADN/gpG	510 pg/4,5 UI	<50 pg/4,5 UI
Log ₁₀ reducción ADN total		3,47	>4,5
Rendimiento en virus*		63%	55%
<p>UF/Bz/UF: corresponde al retentado obtenido después de la segunda ultrafiltración y justo antes del segundo tratamiento con benzonasa en el protocolo UF-Bz-UF-Bz.</p> <p>CEX/UF: corresponde al retentado obtenido después de la etapa de ultrafiltración y justo antes del tratamiento con benzonasa en el protocolo CEX-UF-Bz</p> <p>Después de UC: corresponde a la fase en la que las fracciones del gradiente que contiene el virus purificado se reunieron tras la ultracentrifugación y tras ajustar el volumen total de tal manera que sea 12,5 veces más concentrado que el volumen de la cosecha clarificada.</p> <p>*: el rendimiento en virus se calcula en base de los valores ELISA gpG.</p>			

5 Los resultados de la tabla V muestran que la combinación de una cromatografía sobre soporte Fractogel[®] EMD SO₃⁻ seguida de un tratamiento con benzonasa (procedimiento CEX-UF-Bz) es mucho más eficaz en la eliminación del ADN que un doble tratamiento con benzonasa (procedimiento UF-Bz-UF-Bz). Se logra reducir de al menos 1 log₁₀ suplementario la cantidad de ADN residual utilizando el procedimiento CEX-UF-Bz. Estos resultados también se confirmaron a escalas de volúmenes diferentes.

10 Se señala también que el procedimiento CEX-UF-Bz elimina también de manera más eficaz las proteínas contaminantes que el procedimiento UF-Bz-UF-Bz ya que se encuentran casi dos veces menos de proteínas totales por unidad de virus (expresada en forma de UI de gpG) (5,4 µg en el procedimiento CEX-UF-Bz en lugar de 8 µg por UI de gpG en el procedimiento UF-Bz-UF-Bz. Esto resulta del hecho de que más del 65% de las proteínas son eliminadas durante la etapa de cromatografía sobre soporte Fractogel[®] EMD SO₃⁻. Estos resultados muestran que la combinación de una etapa de cromatografía sobre soporte Fractogel[®] EMD SO₃⁻ con una etapa de tratamiento con benzonasa en el procedimiento de purificación del virus de la rabia ejerce una acción conjugada sobre la eliminación del ADN en las cosechas clarificadas de virus de la rabia que es muy superior al efecto observado durante un doble tratamiento con benzonasa.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación del virus de la rabia que comprende una sola etapa de cromatografía por intercambio de iones, siendo dicha etapa una cromatografía por intercambio de cationes según la cual:
- 5 a) se pone en contacto el sobrenadante de un cultivo de células infectadas por este virus con un soporte de cromatografía intercambiadora de cationes que comprende una matriz de polimetacrilato en la que se han injertado por enlace covalente unos grupos sulfoisobutilo de tal manera que el virus de la rabia se fija sobre este soporte, y
- b) se eluye el virus de su soporte.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, según el cual el sobrenadante de cultivo de las células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de suero animal o de cualquier proteína sérica.
- 10 3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, según el cual el sobrenadante de cultivo de las células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de cualquier proteína exógena de origen animal.
4. Un procedimiento según la reivindicación 3, según el cual la concentración en proteínas exógenas de origen no animal en el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia es $\leq 15\text{mg/l}$.
- 15 5. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, según el cual el sobrenadante de cultivo de las células infectadas por el virus de la rabia está desprovisto de cualquier producto exógeno de origen animal.
6. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, según el cual el sobrenadante de cultivo de células infectadas por el virus de la rabia está previamente clarificado antes de ser puesto en contacto con el soporte de cromatografía intercambiador de cationes.
- 20 7. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la cantidad de virus medida en el eluido corresponde a al menos el 70% de la cantidad de virus medida en el sobrenadante puesto en contacto con el soporte cromatográfico.
- 25 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que la cantidad de proteínas totales medida en el eluido corresponde a menos del 40% de la cantidad de proteínas totales medida en el sobrenadante puesto en contacto con el soporte cromatográfico y por que la cantidad de ADN medida en el eluido corresponde a menos del 5%, preferentemente a menos del 2,5% y de manera aún más preferida a menos del 1% de la cantidad de ADN medida en el sobrenadante puesto en contacto con el soporte cromatográfico.
9. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, según el cual se concentra eventualmente el eluido y después se trata con una nucleasa.
- 30 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, según el cual la nucleasa es una endonucleasa tal como la benzonasa.
11. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, según el cual se somete después el eluido a una ultra-centrifugación sobre un gradiente de sacarosa y se recoen la o las fracciones del gradiente que contienen el virus purificado.
- 35 12. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, según el cual se inactiva después el virus de la rabia purificado por medio de un agente de inactivación viral.
13. Un procedimiento según la reivindicación 12, según el cual el agente de inactivación viral es la β -propiolactona.
14. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, según el cual todas las etapas del procedimiento se realizan por medio de productos de origen no animal.
15. Un procedimiento de fabricación de una vacuna contra la rabia según el cual:
- 40 a) se infecta un cultivo de células con el virus de la rabia,
- b) se purifica el virus de la rabia a partir del sobrenadante de cultivo de células infectadas según un procedimiento tal como se describe en una de las reivindicaciones 1 a 14,
- c) se mezcla la suspensión de virus purificado obtenido en b) en un tampón de conservación, y
- d) se reparte la suspensión de virus purificado obtenido en c) en forma de vacunas unidosis o multidosis.
- 45 16. Un procedimiento de fabricación de una vacuna contra la rabia según el cual:
- a) se infecta un cultivo de células con el virus de la rabia,

- b) se purifica el virus de la rabia a partir del sobrenadante de cultivo de células infectadas según un procedimiento tal como se describe en una de las reivindicaciones 1 a 14,
 - c) se mezcla la suspensión de virus purificado obtenido en b) en un tampón de liofilización,
 - d) se reparte la suspensión de virus purificado obtenido en c) en forma de vacunas unidosis o multidosis, y
- 5 e) se liofilizan las dosis de vacunas.