

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 457**

51 Int. Cl.:

**A61L 2/00** (2006.01)

**A61L 2/10** (2006.01)

**A61M 1/36** (2006.01)

**C11D 7/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2005 E 05741342 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1753470**

54 Título: **Inactivación de un patógeno en una muestra mediante un tratamiento con formalina y luz UV**

30 Prioridad:

**27.05.2004 US 575310 P**

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

**09.12.2015**

73 Titular/es:

**NANOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
13859 Progress Blvd. Suite 300  
Alachua, FL 32615, US**

72 Inventor/es:

**REITER, MANFRED;  
MUNDT, WOLFGANG;  
BARRETT, NOEL y  
KISTNER, OTFRIED**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 553 457 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

Inactivación de un patógeno en una muestra mediante un tratamiento con formalina y luz UV

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para inactivar virus por tratamiento de una muestra que contiene virus con una concentración eficaz de formalina y por tratamiento de la muestra con una dosis eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo.

**Antecedentes de la invención**

10 La inactivación eficaz de los patógenos en productos médicos ha sido una preocupación de salud pública puesto que se descubrió que se pueden extender enfermedades desconocidas previamente rápidamente por la administración de tratamientos. Por lo tanto, los productos biotecnológicos están llegando bajo patrones cada vez más rigurosos destinados a disminuir el riesgo de transmisión de agentes mediante su uso. Los contaminantes potenciales no son sólo un problema en la fabricación de productos sanguíneos sino también en la producción de vacunas seguras.

15 Una de las etapas más críticas en la producción de vacunas contra patógenos, en particular vacunas víricas, es la inactivación vírica. En el caso de inactivación de virus, la formalina es el agente inactivador usado lo más frecuentemente en la fabricación de vacunas. La etapa de inactivación de formalina ha sido validada con procedimientos analíticos establecidos. Sin embargo, la introducción de ensayos de control de calidad muy rigurosos tales como los ensayos de cultivos celulares de mamífero, por ejemplo, el ensayo de seguridad Vero, ha demostrado evidencia de infectividad residual en algunos casos. En un esfuerzo para eliminar esto la interrupción mecánica de la infectividad residual de los agregados y/o filtración resultó no tener éxito.

20 Como una alternativa al tratamiento de formalina, se ha considerado la inactivación ultravioleta para integración en el procedimiento de fabricación. El uso de inactivación por irradiación ultravioleta para vacunas humanas ha sido demostrado anteriormente. Milzer et al. (Am. J. Pub. Health (1.954) 44: 26-33) y Wolf et al. (JAMA (1.956) 161: 775-81) han informado sobre los resultados de inmunogenicidad de estudios en seres humanos donde en usaron vacunas de poliomielitis inactivadas por ultravioleta. El poliovirus es un picornavirus sin envoltura, con un genoma de ARN monocatenario positivo en un único segmento. Como el genoma vírico es más susceptible de daño por UV que los antígenos de superficie vírica, en el caso de polio las proteínas de cápside vírica, se demostró que la inactivación con UV presenta poco efecto negativo sobre las características bioquímicas o la inmunogenicidad del producto. Los objetivos para la inactivación por UV son principalmente ácidos nucleicos en vez de proteínas que son fijadas como objetivo mediante formalina. Combinando formalina e inactivación por UV, los científicos intentaron superar las limitaciones de la inactivación mediante UV o inactivación con formalina aisladas, respectivamente, cuando se inactiva el poliovirus particularmente resistente. Véase, por ejemplo, McLean, et al., "Experiences in the Production of Poliovirus Vaccines," *Prog. Med. Virol.*, vol 1, págs. 122-164 (1.958.)

35 Las tecnologías de radiación ultravioleta presentan un amplio intervalo de aplicación en alimentos, productos farmacéuticos, cosmética y la industria de las bebidas y agua potable. La desinfección mediante UV es un procedimiento físico-químico, en el que los enlaces covalentes de las moléculas cíclicas de las bases purina y pirimidina se rompen por la energía de excitación de la radiación de longitud de onda UV, que daña a los ácidos nucleicos y la información genética que codifican. Los microorganismos tales como bacterias y levaduras, etc., así como los virus que se exponen a radiación UVC eficaz (100 a 280 nm) se inactivan en segundos. Por consiguiente, la desinfección exitosa depende de la dosis de irradiación equivalente a reducción. La dosis de irradiación microbicida media expresada en J/m<sup>2</sup> se mide en la zona de irradiación usando un biodosímetro. Sin embargo, la inactivación mediante UV sólo no es adecuada para producir vacunas seguras y eficaces.

45 Tailor et al. (J. Immunol. (1.957) 79: 265-75) describen la inactivación del virus de la poliomielitis con una combinación de formalina y ultravioleta. Molner et al. (Am. J. Pub. Health (1.958) 48: 590-8) describen la formación de un nivel medible de anticuerpos circulantes en la sangre de individuos vacunados con vacuna de poliomielitis inactivada por ultravioleta-formalina. Truffelli et al. (Appl. Microbiol. (1.967) 15: 516-27) informan sobre la inactivación de la Tumorigenicidad de Adenovirus y Virus 40 de Simio en hámsteres mediante un procedimiento de inactivación de tres fases que consta de formalina, luz UV y β-propiolactona. Miyamae (Microbiol. Immunol. (1.986) 30: 213-23) describe la preparación de inmunógenos de virus Sendai por un tratamiento con rayos UV y formalina. Ninguno de los conceptos descritos anteriormente ha sido adoptado nunca para uso general en la producción de vacunas, aunque ha habido una necesidad siempre presente de la producción de vacunas seguras y eficaces a escala industrial. Además, ninguno de los estudios citados empleó un ensayo de seguridad para determinar la efectividad residual de los "virus inactivados" que sea tan sensible como el ensayo de seguridad Vero usado en el presente estudio. Otro método para la inactivación de virus mediante un tratamiento con formaldehído e irradiación UV se conoce a partir del documento de patente británica GB-A-802048.

55 Sorprendentemente, los autores han encontrado que se puede utilizar una combinación de etapas de inactivación con formalina y UV para inactivar completamente virus en una producción de virus volumétrica en un sistema de alto rendimiento en volumen para la fabricación de virus inactivados para preparación de vacunas en una escala

industrial. Esto también se ha demostrado con una preparación vírica concentrada de alto título como se usa en los ejemplos, donde no se detecta actividad vírica residual usando el ensayo de cultivo de células Vero muy sensible. Los autores han demostrado sorprendentemente también que este método funciona particularmente bien para virus con envoltura, tales como ortomixovirus, cuando se compara con los virus sin envoltura, tales como el polio picornavirus. Este descubrimiento presenta importantes implicaciones para la rápida producción de vacunas altamente inmunogénicas, seguras, para enfermedades víricas que surgen y que cambian rápidamente tales como cepas de la influenza interpandémica y pandémica.

### Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método que permita una inactivación altamente eficaz y segura de un virus contenido en una muestra mientras que se retiene una alta antigenicidad e inmunogenicidad del virus inactivado. En particular, el método de la presente invención utiliza una etapa de inactivación de formalina en concierto con una etapa de inactivación con UV en un sistema de alto rendimiento en volumen para producir un alto contenido en antígeno, preparación vírica volumétrica segura para uso en la fabricación de vacunas.

### Descripción detallada de la invención

Según la invención, el objeto se resuelve proporcionando un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de: (i) tratar la muestra con una concentración eficaz de formalina y (ii) someter la muestra a una dosis eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo, que comprende una lámpara UV y una cámara de capa delgada en el aparato, en el que la etapa (i) se realiza previamente a la etapa (ii) o viceversa. El caudal de la muestra a través del aparato es de aproximadamente 50 litros por hora a aproximadamente 1.000 litros por hora.

En otro aspecto preferido del método para inactivar el virus que se tiene que inactivar es un virus de envoltura o un virus de ARN de envoltura, respectivamente, y el virus de envoltura o el virus de ARN de envoltura, respectivamente, está completamente inactivado.

En una realización preferida de la invención, la muestra se trata con una dosis eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo después de que haya sido tratada con una concentración eficaz de formalina. Aunque los autores no están ligados a ninguna teoría, se piensa que los efectos de reticulación de la formalina sobre las moléculas de la superficie del virión estabilizan el virus para los rigores de la dinámica de fluidos de alto volumen del aparato de flujo continuo de inactivación por UV.

El método de inactivación de acuerdo con la invención es eficaz y seguro como ha sido demostrado en el Ejemplo 2 y 4 (A). Además, el método de inactivación permite producir vacunas con alta antigenicidad e inmunogenicidad que provoquen una respuesta inmunitaria protectora como se muestra en el Ejemplo 4 (B).

El término "muestra" como se usa en la presente memoria incluye cualquier muestra que contenga un patógeno o una parte del mismo tal como cualquier fluido, por ejemplo, fluidos biológicos o disoluciones que se originan de un procedimiento de cultivo celular para preparar productos biológicos, médicos o farmacéuticos tales como productos sanguíneos o vacunas. Puede ser una muestra que comprenda un fluido biológico, tal como sangre o plasma. También puede ser un fluido que contenga componentes recogidos de un cultivo celular (por ejemplo, fracción de células o medio de cultivo del cultivo). En una realización preferida, la muestra es un fluido usado en la fabricación de un agente terapéutico, por ejemplo, en la producción de una vacuna, en la que el virus inactivado o una porción del mismo es el agente terapéutico. En realizaciones preferidas en particular, los componentes celulares se separan de la muestra previamente al método de inactivación, por ejemplo por filtración o centrifugación.

En una realización preferida de la presente solicitud el virus es producido a partir de una recolección de un cultivo celular, que consta del sobrenadante y las células, que se usa además para la preparación de un producto médico, por ejemplo una vacuna. En una realización más de la presente invención las células de dicho cultivo celular han sido infectadas con el patógeno. Las células pueden ser células primarias o cualquier estirpe celular cultivada adecuada para producir el virus. Los ejemplos de células que se pueden usar incluyen células de mamífero (por ejemplo, células CHO, BHK, VERO, HELA), células aviares (por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo o estirpes celulares continuas de un ave) y células de insectos (por ejemplo, células Sf9.) En realizaciones preferidas de la invención, las células y las partículas celulares de la producción de cultivo celular del volumen vírico se separan del volumen vírico previamente a la etapa de inactivación (formalina) química y/o la etapa de inactivación mediante irradiación UV.

En la presente invención, los virus que se tienen que inactivar son virus de ADN o ARN con envoltura o sin envoltura, con genomas mono o bicatenarios (ADN), de hebra transcrita o complementaria, continuos o segmentados. Los virus se pueden seleccionar del grupo que consta de: baculovirus, poxvirus, adenovirus, papovavirus, parvovirus, hepadnavirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, astrovirus, picornavirus, retrovirus, ortomixovirus, filovirus, paramixovirus, rhabdovirus, arenavirus y bunyavirus. En realizaciones preferidas de la invención, los virus se seleccionan del grupo de virus con envoltura, incluyendo, flavivirus, togavirus, retrovirus, coronavirus, filovirus, rhabdovirus, bunyavirus, ortomixovirus, paramixovirus, arenavirus, hepadnavirus, herpesvirus y poxvirus. Como se demuestra en los Ejemplos 6 y 7, los métodos de inactivación de la invención son particularmente

eficaces en virus con envoltura tales como los virus de la influenza y Ross River, cuando se compara con virus de la polio y adenovirus sin envoltura. En otras realizaciones preferidas de la invención, los virus se seleccionan del grupo de virus de ARN con envoltura, incluyendo, flavivirus, togavirus, retrovirus, coronavirus, filovirus, rhabdovirus, bunyavirus, ortomixovirus, paramixovirus y arenavirus. En una realización preferida en particular, el virus se selecciona de los ortomixovirus, por ejemplo, una cepa de virus de la influenza: las cepas de virus de la influenza pueden presentar combinaciones variables de proteínas de superficie de hemaglutinina y neuraminidasa. En otro ejemplo preferido en particular, el virus se selecciona de los togavirus, por ejemplo un alfavirus tal como el Virus Ross River (RRV, por sus siglas en inglés.) Otro grupo preferido de virus para uso como la disolución vírica volumétrica son los coronavirus, incluyendo el virus asociado al Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS, por sus siglas en inglés). Otro grupo de virus preferidos son los flavivirus, incluyendo Encefalitis Japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas (TBE, por sus siglas en inglés), virus de la fiebre de Dengue, virus de la fiebre amarilla y virus de la fiebre hemorrágica. Otro grupo preferido de virus son los poxvirus, incluyendo ortopoxvirus (tales como virus vaccinia o vaccinia Ankara modificados) y avipoxvirus.

También se incluyen partes de un patógeno vírico inactivado por la presente invención. En una realización preferida de la presente solicitud dichas partes pueden servir como un epítipo en un inmunógeno. Este epítipo se puede usar para provocar una respuesta inmunitaria contra el patógeno. En una realización preferida de la presente solicitud se usan partes de un patógeno como una vacuna contra el patógeno. En una realización especialmente preferida dichas partes de un patógeno son viriones divididos, que se pueden inactivar antes o después de ser divididos.

Dentro del significado de la presente invención, el método de inactivación según la invención se considera seguro, o completamente inactivado, cuando el virus inactivado producido usando el método pasa un ensayo de cultivo de células de mamífero, por ejemplo, el ensayo de seguridad descrito con detalle en el Ejemplo 2. Como se demostró estos ensayos son más sensibles que los otros ensayos utilizados, por ejemplo, el ensayo del huevo. Los criterios aprobado/suspense preferidos del ensayo de seguridad se detallan en el Ejemplo 1 y 2.

En una realización preferida de la presente solicitud, la reducción del título del virus debido a la inactivación del virus en la muestra es al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$ , en una realización más preferida, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  en una realización más preferida al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  y en una realización la más preferida al menos aproximadamente  $1 \times 10^{14}$ .

En una realización preferida de la presente invención, la muestra se trata con una concentración eficaz de formalina durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas. En realizaciones más preferidas, la muestra se trata con una concentración eficaz de formalina durante aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas y más preferiblemente durante aproximadamente 24 a aproximadamente 30 horas.

En una realización preferida especialmente de la presente invención, la muestra se trata con una concentración eficaz de formalina durante aproximadamente 24 a aproximadamente 24,5 horas.

En una realización adicional la etapa para tratar la muestra con una concentración eficaz de formalina se lleva a cabo a aproximadamente 10 a aproximadamente 40°C. En una realización especialmente preferida de la presente solicitud, la etapa para tratar la muestra con una concentración eficaz de formalina se lleva a cabo a aproximadamente 32°C.

Una 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 oscila preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1% (p/p), preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1% más preferiblemente entre aproximadamente 0,025% y aproximadamente 0,1% que corresponde a 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 que presenta una longitud de onda de 100 a 400 nm. La luz UV se puede seleccionar del grupo que consta de: UVC (100 a 280 nm), UVB (280 a 320 nm) y UVA (320 a 400 nm). Se pueden usar agentes fotosensibilizantes como los que se intercalan en el ADN y se activan mediante luz UV, por ejemplo, psoralenos, para mejorar el efecto inactivante de la radiación UV. En una realización preferida de la presente invención, la luz UV que es UVC que tiene una longitud de onda de aproximadamente 100 a aproximadamente 280 nm. En una realización más preferida de la presente invención, la luz UV presenta una longitud de onda de aproximadamente 240 a aproximadamente 290 nm. En una realización especialmente preferida de la presente invención aproximadamente 85% o más de la luz UV presenta 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, tecnología de lámpara de mercurio o luz UV pulsada, por ejemplo, tecnología de láser monocromático. La intensidad UV deseada se puede generar combinando dos o más lámparas. En una realización preferida, la luz UV se emite de manera continua por una lámpara de aproximadamente 110 v. En una realización preferida ilustrada en los ejemplos, la lámpara UV presenta una longitud de aproximadamente un metro, como la lámpara usada en los ejemplos (950 mm.)

El contenido de la invención incluye cualquier dosis eficaz de luz UV, es decir, cualquier dosis de luz UV que inactive

con seguridad un virus determinado cuando se combina con un tratamiento con formalina como se describió anteriormente. La dosis eficaz puede depender de una variedad de factores que se conocen en general en el campo, por ejemplo, los parámetros físicos de las cámaras de inactivación UV tales como tamaño y diámetro de la lámpara y la cámara, distancia entre el medio que contiene el virus y la fuente de luz UV, las propiedades de absorción y reflexión de la luz del material de la cámara. De la misma manera, la longitud de onda e intensidad de la luz UVC así como el tiempo de contacto que el virus se expone a la luz UV también es crítico para la dosis eficaz. Por otra parte, la dosis eficaz también está influida por el propio virus, el medio que contiene el virus y sus propiedades de absorción de la luz. Preferiblemente, la dosis eficaz es suficiente para matar al menos 99,99% de virus contenidos en la muestra, más preferiblemente inactivando el virus a un nivel en el que no se detecte virus activo en un ensayo de cultivo celular de mamífero, preferiblemente el ensayo según el Ejemplo 2 o completamente inactivado. En una realización preferida usando luz UVC se expone una muestra que contiene el virus a una dosis eficaz que oscila de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mJ/cm<sup>2</sup>. En una realización preferida, la dosis eficaz está en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mJ/cm<sup>2</sup> y en otras realizaciones preferidas la dosis eficaz en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 90 mJ/cm<sup>2</sup>. Como una comparación, la dosis eficaz para matar el 99,99% de los patógenos presentes en agua potable es aproximadamente  $\geq 40$  mJ/cm<sup>2</sup>. En una realización preferida, la dosis eficaz reduce un título de virus inicial por  $1 \times 10^5$ . En la inactivación de vacuna volumétrica, la dosis eficaz debería ser suficiente para eliminar cualquier virus vivo residual que pueda estar presente después de la etapa de inactivación química (formalina) inicial. Como se ilustra en los ejemplos, esto se puede determinar mediante ensayos de infección de cultivo celular de mamífero muy sensibles, tales como el ensayo de cultivo celular Vero descrito.

Se proporcionan realizaciones preferidas adicionales de la invención y en particular de la cámara de luz UV en los ejemplos.

En una realización preferida adicional de la presente invención el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 segundos, preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 14 segundos. El tiempo de contacto se calcula preferiblemente basándose en una muestra que es aproximadamente 1 mm de espesor a lo largo de la tangente a la fuente de luz y la potencia en vatios de la lámpara UV de aproximadamente 110 v. Como apreciará un experto en la materia, las profundidades de la muestra más espesa y las fuente de luz de energía menor (potencia en vatios) aumentarían el tiempo de exposición y viceversa. En una realización más preferida de la presente solicitud, el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV es aproximadamente 1,4 a aproximadamente 7 segundos y en una realización especialmente preferida de la presente solicitud el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV es aproximadamente 2,8 a aproximadamente 4,2 segundos.

Para ensayar si un montaje determinado del método de acuerdo con la invención que emplea una dosis de luz UV determinada inactiva eficazmente a un patógeno de acuerdo con la invención, se debería ensayar en el virus inactivado la actividad vírica residual. Esto se puede llevar a cabo usando un ensayo de cultivo celular de mamífero, por ejemplo el ensayo de seguridad Vero que aplica preferiblemente el criterio detallado en los Ejemplos 1 y 2.

Según la presente invención, el tratamiento de la muestra con una dosis eficaz de luz UV se lleva a cabo en un aparato de flujo continuo, preferiblemente como se especifica en la Tabla 1 y la Fig. 1.

Según la presente invención el aparato de flujo continuo contiene una cámara de capa delgada. El espesor mínimo de la cámara permitiría suficiente flujo de la disolución vírica volumétrica para permitir un tratamiento inmediato razonable y evitar la alteración de los virus para vacunas de virus inactivados completos. Así, preferiblemente, la capa delgada es al menos aproximadamente 0,1 mm de espesor para la producción de virus inactivados completos. También, debido a la absorbancia de la radiación UV por la disolución vírica volumétrica, y la necesidad de asegurar suficiente irradiación de todos los virus en la disolución, el espesor máximo no debería permitir que ningún virión pase a través del aparato sin ser suficientemente irradiado. Así, la capa delgada no debería ser más espesa que aproximadamente 1 cm de espesor. La capa delgada tiene preferiblemente de 0,5 mm a 3 mm de espesor y más preferiblemente aproximadamente 1 mm a fin de que la distancia máxima entre la lámpara UV y el patógeno que se tiene que inactivar sea menor que aproximadamente 1 mm. Alternativamente, la muestra se puede hacer pasar por la lámpara paralelo a la longitud de la lámpara, al fin de que la muestra sea irradiada desde el diámetro externo, en vez del diámetro interno, de la cámara de la muestra. Similarmente, una lámpara dentro de una cámara de muestra dentro de una lámpara (o círculo de lámparas) se podía usar como una configuración, irradiando la cámara de muestra desde los diámetros tanto interno como externo. Además, la cámara se diseña preferiblemente a fin de que el flujo de la muestra por la cámara no sea estrictamente laminar, sino que más bien sea turbio. Esto ayudará en el mezclamiento del virus por el medio de la muestra, asegurando una exposición uniforme a la radiación UV.

En otra realización preferida de la presente solicitud, el aparato de flujo continuo contiene una cámara de inactivación mediante UV, en la que la lámpara UV presenta un diámetro de aproximadamente 30 mm y la cámara que rodea la lámpara de UV por la que fluye la muestra presenta un diámetro de aproximadamente 32 mm. En una realización preferida de la presente solicitud, la cámara presenta un volumen total de aproximadamente 92 ml.

La muestra que se tiene que irradiar se puede hacer pasar por el aparato. En una realización preferida la muestra se deja enfriar mientras pasa la cámara de irradiación UV. En una realización preferida adicional de la presente

invención, la muestra que pasa la cámara de irradiación UV presenta una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 32°C, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8°C.

Preferiblemente, el caudal de la muestra en el aparato de flujo continuo está en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000 litros por hora, más preferiblemente aproximadamente 230 a aproximadamente 480 litros. En una realización especialmente preferida, el caudal de la muestra en el aparato de flujo está en el intervalo de aproximadamente 230 a aproximadamente 250 litros por hora, más preferiblemente aproximadamente 240 litros por hora. Estos caudales preferidos, ejemplificados en los ejemplos, permiten el tratamiento económico con UV a gran escala de la disolución vírica volumétrica.

En una realización preferida, el tiempo de contacto depende de la longitud de la cámara de la muestra en la que se expone la muestra a la radiación UV y el caudal de la muestra por la cámara. Así, la dosis eficaz que se puede ajustar simplemente aumentando el número de lámparas UV dispuestas en el aparato de flujo continuo, aumentando la longitud eficaz de la cámara de la muestra expuesta a radiación UV. Alternativamente, usar un mismo número de cámaras de lámparas mayor aumentará la dosis eficaz, ya que usar un número mayor de cámaras de lámpara más pequeñas puede ser equivalente a la misma dosis eficaz.

Según la presente invención, la etapa de someter la muestra a una dosis eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo se repite de una manera cíclica o en serie. Se repite para 2 a 10 veces. En una realización preferida de la presente solicitud, la etapa de someter la muestra a una dosis eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo se repite durante aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces y en una realización más preferida de la presente solicitud se repite durante aproximadamente 2 a aproximadamente 3 veces. Un beneficio añadido a usar múltiples cámaras de lámparas en serie o flujo recirculado por la misma lámpara, es que la muestra se puede mezclar más cuidadosamente entre cámaras o ciclos para asegurar la exposición uniforme del virus a la radiación UV.

Después de que el virus en la muestra ha sido inactivado, el virus inactivado se puede purificar después para uso en diversas aplicaciones, incluyendo vacuna y otras composiciones farmacéuticas. Según otra realización preferida de la invención, el método de inactivación comprende además una etapa de purificación del virus inactivado en la muestra para pureza farmacéutica y formular el virus purificado en una composición farmacéutica para ser usado como una vacuna. La purificación se puede llevar a cabo por medios conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, filtración o diafiltración, cromatografía (por ejemplo, de exclusión por tamaño, de intercambio iónico, inmunoafinidad y similar) o centrifugación. Alternativamente, el virus se puede purificar previamente a inactivación por los métodos de la invención.

Según otra realización preferida de la invención, el método de inactivación comprende además una etapa de purificación, es decir, se somete la muestra a una etapa de purificación para retirar la formalina residual en la muestra. Dicha purificación es útil si quedan niveles de formalina que sean mayores que los niveles farmacéuticamente aceptables. El virus inactivado, después de etapas de purificación opcionales, se puede formular después en una composición farmacéutica. Las formulaciones pueden incluir opcionalmente portadores (por ejemplo, disolución salina fisiológica o tampones), excipientes, estabilizantes (por ejemplo, albúmina, sacáridos y/o aminoácidos), sales y/o adyuvantes (por ejemplo, alumbre). Alternativamente, el virus inactivado se puede modificar además para uso farmacéutico, por ejemplo, por encapsulación en liposomas.

La presente invención se ilustrará además en los siguientes ejemplos, sin ninguna limitación a los mismos. Habiéndose descrito la invención con detalle, será evidente que son posibles modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención definido en las reivindicaciones adjuntas.

## Figuras

La Figura 1 muestra una cámara de capa delgada de UV que se puede usar para la etapa de inactivación por UV de la presente invención.

La Figura 2 muestra un sistema de inactivación por UV provisto de sensor UV. El sensor UV y el caudalímetro son características opcionales. En una realización adicional de la presente solicitud la bomba y/o el caudalímetro se pueden instalar en el tubo de salida.

La Figura 3 muestra un sistema de inactivación por UV que utiliza varias cámaras de capa delgada de UV (reactor UV) conectadas entre sí para someter repetidamente la muestra a una dosis eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo. El número de cámaras de capa delgada de UV puede variar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10. El sensor UV y el caudalímetro son características opcionales. En una realización adicional de la presente solicitud la bomba y/o el caudalímetro se pueden instalar en el tubo de salida. Un generador de UV continuo con cámaras de inactivación conectadas en serie puede ser usado en un procedimiento de fabricación a gran escala, permitiendo así alto rendimiento de una muestra.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Principio del ensayo de seguridad del huevo estándar.

5 Se usó un ensayo de seguridad del huevo estándar para ensayar la infectividad residual de cepas de influenza inactivadas. Se inyecta un producto volumétrico monovalente, es decir, un antígeno de virus purificado después de centrifugación con gradiente de sacarosa y ultra-diafiltración, en 10 huevos (0,2 ml/huevo). Después de incubar durante 3 días a 32°C, se recogieron los huevos, se juntaron y se inyectaron de nuevo en 10 huevos (0,2 ml/huevo). Después de otra etapa de incubación durante 3 días a 32 °C, se recogieron los huevos, se juntaron y se ensayó la hemaglutinina (HA).

10 El ensayo de la HA se basa en el hecho de que los virus de la Influenza pueden unirse a eritrocitos usando su hemaglutinina de proteína superficial. El ensayo se lleva a cabo en un entorno estéril. Una suspensión de virus de la Influenza con un título de HA definido sirve como un control positivo y una disolución de NaCl al 0,9% sirve como un control negativo. Se proporcionan 50 µl de una dilución 1:2 en NaCl al 0,9% de una muestra que se tiene que ensayar en un pozo de una placa de 96 pozos. Para cada placa se añaden 50 µl de una disolución que contiene eritrocitos de pollo. Con posterioridad, se incuban las placas durante 30 o 45 minutos a temperatura ambiente.  
15 Después la hemaglutinación se determina de manera visual, en la que, si cinco pozos que contienen la misma muestra no muestran ninguna hemaglutinación, la muestra aprueba el ensayo de HA.

Ejemplo 2: Principio del ensayo de seguridad Vero estándar.

El ensayo de seguridad Vero estándar es un ensayo de calidad muy riguroso para la infectividad residual de cepas de influenza inactivadas. El ensayo también es aplicable a otros virus.

20 Se añade un producto volumétrico monovalente, es decir, antígeno de virus purificado después de centrifugación en gradiente de sacarosa y de ultra-diafiltración, a 5 matraces Roux (4 ml/matraz). Después de incubar durante 7 días a 32 °C en medio de cultivo Vero, se recolectaron los cultivos celulares, se juntaron y se añaden a 5 matraces Roux (10 ml/matraz). Después de otra etapa de incubación durante 7 días a 32 °C, se recolectan los cultivos celulares, se juntan y se ensaya la hemaglutinina (HA) como se describió en el Ejemplo 1.

25 Ejemplo 3: Inactivación con formalina.

La primera etapa de inactivación con formalina se lleva a cabo sobre una recolección de virus monovalentes infecciosos, sin células, es decir, una recolección de biorreactor después de clarificación por centrifugación. Después de la recolección a 30 a 34°C, la recolección de virus monovalentes se trata con aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1 U/ml de Benzona a 30 a 34°C durante 4 a 8 horas. Después se trata con  $\leq 92$  mg/l de formalina durante 20 a 24,5 horas a  $32 \pm 2$  horas.  
30

Ejemplo 4: Experimentos de inactivación con lámpara UV de 65 v.

Se lleva a cabo una serie de experimentos de inactivación con virus inactivados con formalina usando una cámara de inactivación con una lámpara UV de 65 v y una cámara de capa delgada. Aunque la inactivación completa de la recolección de virus monovalentes se puede demostrar cuando se usan caudales de 100 litros por hora durante tres ciclos, este montaje no permitió la medición on-line de la señal UV. El medio de cultivo celular Vero usado para producción de Influenza contiene varios compuestos orgánicos que son responsables de la absorción de la señal UV. Por lo tanto, el sistema, está provisto de una lámpara de 110 v que permite un seguimiento continuo de la señal UV durante el tratamiento de la recolección de virus monovalentes.  
35

Ejemplo 5: Experimentos de inactivación con una lámpara de UV de 110 v.

40 Se usa recolección de Influenza Panamá monovalente tratada con formalina como un sustrato de modelo para los estudios de inactivación. Para inactivación continua con tecnología UV de capa delgada se usa un sistema WEDECO VISA (Alemania) provisto de una lámpara VISA (110 v/4 V). La cámara de capa delgada de UV es un dispositivo de acero inoxidable 1,4435 con un tubo de cuarzo de 30 mm de diámetro (cf. Tabla 1). Un sensor de UV calibrado permite el control on-line de la señal UV. La cámara de capa delgada de UV se hacer funcionar a un caudal de  $240 \pm 10$  litros por hora a temperatura ambiente. Las condiciones del caudal se controlan mediante un caudalímetro calibrado (cf. Fig. 2).  
45

Tabla 1

Características de la cámara de inactivación UV.

Lámpara de UV	110 v
longitud de la lámpara	950 mm
Lámpara de UV Ø	30 mm
cámara que rodea a la lámpara de UV Ø	32 mm
capa delgada	1 mm
volumen total/cámara	92 ml
tiempo de contacto/cámara	1,4 segundos

- 5 La recolección monovalente se expone a 10 ciclos UV. Después de cada ciclo se retiran 20 litros de la recolección monovalente tratada con UV y se purifica además por purificación en gradiente de sacarosa usando condiciones de ultracentrifugación continuas con un gradiente de sacarosa al 42% extendido en tampón Tris 20 mM y una recolección monovalente purificada definida (PMVH, por sus siglas en inglés) de 48% a 36% de sacarosa usando una centrifuga Sorvall CC40 sin preclarificador (Hitachi Koki Co, LTD., Tokio, Japón).

Tabla 2

- 10 Resumen de realizaciones de ultracentrifugación de formalina e Influenza Panamá tratada con UV.

Realización de ultracentrifugación	Condiciones de inactivación
UZ-INF-45-03	no UV
UZ-INF-48-03	240 l/hora, 1 ciclo
UZ-INF-52-03	240 l/hora, 2 ciclos
UZ-INF-51-03	240 l/hora, 3 ciclos
UZ-INF-50-03	240 l/hora, 4 ciclos
UZ-INF-49-03	240 l/hora, 5 ciclos
UZ-INF-58-03	240 l/hora, 7 ciclos
UZ-INF-57-03	240 l/hora, 10 ciclos

(A) Rendimiento de antígeno y pureza.

- 15 Se comparan el rendimiento y la pureza de antígeno de influenza basándose en contenido en hemaglutinina (HA), proteína total y proteína Vero (proteína de células huésped). Se compara el virus purificado sobre la base de la relación HA/proteína, relación de proteína de células huésped/HA y seguridad del virus (cf. Tabla 3). Para todas las recolecciones tratadas con UV no se pudo detectar crecimiento vírico. Por el contrario, se puede multiplicar el virus purificado procedente del procedimiento de inactivación con formalina estándar (no radiación UV aplicada) en cultivo de células Vero. Aunque se puede observar una ligera reducción en la relación HA /proteína después del ciclo 7 y 20 10, no se detecta una diferencia significativa de producto inactivado con formalina e inactivado doble con respecto a la pureza de antígeno medida como HA/proteína y la relación proteína de células huésped/HA.

Tabla 3

Virus Panamá purificado con gradiente de sacarosa después de tratamiento con formalina y UV. Comparación de la relación HA/proteína, relación proteína de células huésped/HA y seguridad después de 0 a 10 ciclos UV.

Número de ciclos UV	Tiempo de contacto (s)	Relación HA/Proteína	Relación proteína de células huésped/HA	Seguridad Vero
0	0 (no UV)	0,85	0,04	suspenso
1	1,4	1,09	0,04	aprobado
2	2,8	0,88	0,04	aprobado
3	4,2	0,91	0,04	aprobado
5	7,0	0,83	0,04	aprobado
7	9,8	0,60	0,02	aprobado
10	14	0,58	0,03	aprobado

- 5 Se realizan estudios adicionales para caracterizar el efecto de inactivación UV sobre la antigenicidad e inmunogenicidad en conejillos de indias y ratones por análisis de inhibición de hemaglutinina (HAI).

(B) Antigenicidad

Se analizará la antigenicidad mediante ensayo de HAI frente a antisueros específicos de Panamá. Aunque el tiempo de contacto UV aumentado da como resultado una ligera pérdida de HA, no se muestra efecto negativo para el título de HAI (cf. Tabla 4).

10

Tabla 4

Virus Panamá purificado con gradiente de sacarosa después de tratamiento con formalina y UV. Comparación de antigenicidad basada en título de HA y HAI con antisueros específicos de Panamá después de 0 a 10 ciclos UV.

Número de ciclos UV	Tiempo de contacto (s)	HA (µg/ml)	Título HAI
0	0 (no UV)	211	640
1	1,4	209	640
2	2,8	200	640
3	4,2	196	640
5	7,0	191	640
7	9,8	177	640
10	14	154	640

- 15 (C) Inmunogenicidad

Se analiza la inmunogenicidad inmunizando conejillos de indias y ratones con diferentes alícuotas de las Recolecciones de Virus Monovalentes Purificados seguido por un refuerzo tres semanas después de la primera inmunización. Los sueros de los animales inmunizados se recogen y se juntan después de tres y seis semanas y se analizan por ensayo de HAI frente a antígenos procedentes de huevo y procedentes de Vero. La inmunogenicidad ensayada en conejillos de indias y ratones después de 3 y 6 semanas proporciona resultados muy prometedores, no se puede observar diferencia significativa para el virus doble inactivado frente a virus tratado con formalina estándar (cf. Tabla 5).

20

Tabla 5

Virus Panamá purificado con gradiente de sacarosa después de tratamiento con formalina y UV (0 a 10 ciclos). Comparación de la inmunogenicidad ensayada en conejillos de indias y ratones. A) después de 3 semanas, B) después de 6 semanas. HAI con antígeno de la Influenza procedente de huevo y Vero.

5 A.

Número de ciclos UV	Tiempo de contacto (s)	Título de HAI de conejillos de indias después de 3 semanas		Título de HAI de ratones después de 3 semanas	
		Huevo	Vero	Huevo	Vero
0	0 (no UV)	160	320	320	1.280
1	1,4	160	320	320	1.280
2	2,8	160	640	320	1.280
3	4,2	160	320	320	1.280
5	7,0	160	320	320	1.280
7	9,8	160	320	320	1.280
10	14	160	640	320	1.280
control	-	40	20	80	80

B

Número de ciclos UV	Tiempo de contacto (s)	Título de HAI de conejillos de indias después de 6 semanas (Refuerzo)		Título de HAI de ratones después de 6 semanas (Refuerzo)	
		Huevo	Vero	Huevo	Vero
0	0 (no UV)	1.280	1.280	1.280	2.560
1	1,4	1.280	2.560	640	1.280
2	2,8	1.280	1.280	640	1.280
3	4,2	640	1.280	1.280	2.560
5	7,0	1.280	2.560	1.280	2.560
7	9,8	640	1.280	1.280	2.560
10	14	1.280	2.560	1.280	2.560
control	-	160	80	160	40

10 Los resultados resumidos en la Tabla 4 y la Tabla 5 muestran que el tratamiento con UV no da como resultado diferencias significativas en los títulos de HAI que demuestran que la antigenicidad y así la inmunogenicidad del producto no se ve afectada.

15 En todos los experimentos de doble inactivación se puede demostrar la seguridad total incluso después de 1 ciclo de tratamiento UV. Las investigaciones detalladas en laboratorio y escala final demostraron la eficacia de la etapa de irradiación con UV cuando se combina con tratamiento con formalina. La caracterización inmunológica del antígeno de virus purificado después de tratamiento con UV proporciona resultados comparables a los obtenidos sin producto no tratado con UV. No se puede detectar efecto negativo sobre las características bioquímicas ni la inmunogenicidad del producto vírico.

Ejemplos 6: Reducción del título de virus con inactivación con formalina y/o UV.

20 La reducción del título de virus por el tratamiento combinado de la muestra con una concentración eficaz de formalina y una concentración eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo se ensaya con diferentes virus. La inactivación con formalina se llevó a cabo a 32 °C durante 24 horas con una concentración final de formalina de 0,025% (p/v). La inactivación UV en el aparato de flujo continuo se lleva a cabo durante 3 ciclos a un caudal de 240 l/hora. El tiempo de contacto de la muestra con la luz UV por ciclo es 1,4 segundos.

Tabla 6

Reducción del título de virus con inactivación con formalina y/o UV.

Virus	Tipo de virus	Reducción del título de virus medida después de tratamiento con formalina (log reducción)	Reducción del título de virus medida después de tratamiento con UV (log reducción)	Reducción del título de virus calculada después de tratamiento con formalina y UV (log reducción)
Influenza Nueva Caledonia	A/H1N1/20/99	≥7,4	≥7,3	≥14,7
Influenza Panama	A/H3N2/2007/99	≥8,4	≥6,7	≥15,1
Influenza Shangdong	B/7/97	≥6,7	≥7,2	≥13,9
Polio	Tipo 1	3,0	4,9	7,9
Adeno	Tipo 5	3,1	2,5	5,6

5 Los resultados muestran que por un tratamiento con formalina y UV combinado de los virus se obtiene una reducción drástica de los respectivos títulos de los virus.

Ejemplos 7: Inactivación UV de una vacuna de candidato de Virus Ross River (RRV, por sus siglas en inglés).

10 El Virus Ross River (RRV) es un alfavirus sufrido por el mosquito que causa una enfermedad en seres humanos conocida como poliartritis epidémica (EPA, por sus siglas en inglés). Los síntomas incluyen artritis, en particular en las rodillas y en las articulaciones pequeñas de las manos y los pies, con frecuencia acompañados por fiebre, erupción y otros cambios constitucionales no específicos. Los síntomas de la artritis comúnmente duran 30-40 semanas y el 25% de los pacientes aún presentan síntomas residuales 1 año después del comienzo. Es endémica en Australia, con más de 8.000 casos cada año y por toda la región del Pacífico. En 1.979/80 las epidemias de infección por Virus Ross River también tienen lugar en Fiji, Samoa, las Islas Cook y Nueva Caledonia. En la actualidad no existe vacuna.

15 (A) Inoculación con RRV de 1.200 litros de cultivos de fermentadores de células Vero basados en microportador sin suero e inactivación con formalina.

20 Se inocularon 1.200 litros de cultivos de fermentador de células Vero sin suero basadas en microportador con virus de producción Ross River. Se incubaron los cultivos durante 3 días a 37°C. Se extrajeron muestras cada día para valoración. El día 3, cuando se recogió el 100% de las células fue destruido mediante virus CPE (efecto citopático). Después de separación de partículas celulares y microportadores de la recolección de virus infeccioso y una primera etapa de filtración (1,2 µm/0,2 µm), se añadió benzonasa para degradación de ácidos nucleicos (ADN/ARN). Se llevó a cabo inactivación con formalina con concentración final de formalina del 0,1% (p/v) durante ocho días. Se llevó a cabo una segunda y una tercera etapa de filtración después de dos horas y 24 horas, respectivamente. Se añadió benzonasa una segunda vez a las 24 horas para eliminar los ácidos nucleicos residuales. Se extrajeron muestras para valoración de virus = dosis infecciosa de cultivo de tejido 50 (TCID<sub>50</sub>/ml) en células Vero y ensayos de seguridad en células C6-36 y células Vero según la Tabla 7.

30 Un día después de inoculación de un fermentador de 1.200 litros con RRV, se pudo demostrar un título de virus de log TCID<sub>50</sub>/ml de 5,8, que aumentó a 7,8 (día 2), 8,1 (día 3 antes de la recolección) y 8,0 después de la recolección de virus. Después de separación, primera filtración y adición de benzonasa, los títulos de virus cayeron a 7,5, 7,2 y 7,4, respectivamente. Después de adición de formalina, se determinaron los títulos después de eliminación de la suspensión de formalina citotóxica por centrifugación y suspensión de nuevo del botón de virus (Tabla 7, columna: TCID<sub>50</sub>/ml TL 100). 15 minutos después de que se añadiera formalina a la recolección de virus, los títulos cayeron drásticamente a 1,6. 12 h después de inactivación con formalina, no se pudo demostrar más título de virus.

35 24 horas después del comienzo de la inactivación con formalina se sometieron las muestras a ensayos de seguridad en células C6-36 y células Vero. Mientras después de 24 h y 26 h después de inactivación se pudieron demostrar 1 muestra positiva (CPE) y 4 muestras negativas en células Vero, se obtuvieron 4 muestras positivas y 1 muestra negativa con la estirpe celular C6-36 mucho más sensible. Desde el día 2 hacia adelante, todas las muestras fueron negativas en células Vero. La estirpe celular C6-36 aún mostró CPE con 1 muestra los días 2 y 3 y 4 muestras negativas, respectivamente. Los días 4 y 5 todas las muestras ensayadas fueron negativo en células C6-36, pero los días 6 y 7 una muestra mostró de nuevo CPE. Después del día 8 no se pudieron mostrar más muestras positivas ni en células Vero ni en células C6-36.

Tabla 7 Resultados de seguridad de una recolección de virus Ross River de un fermentador de 1.200 litros.

Muestra	TCID <sub>50</sub> /ml	TCID <sub>50</sub> /ml TL100	Seguridad C6-36	Seguridad Vero
Día 1 infección	5,8	n.h.	n.h.	n.h.
Día 2 infección	7,8	n.h.	n.h.	n.h.
Día 3 infección	8,1	n.h.	n.h.	n.h.
Recolección	8,0	n.h.	n.h.	n.h.
después de Separador	7,5	n.h.	n.h.	n.h.
después 1 Filtración (1,2 µm/0,2 µm)	7,2	n.h.	n.h.	n.h.
después de adición de Benzonasasa	7,4	n.h.	n.h.	n.h.
Formalina 0 h (15 minutos)	n.h.	1,6	n.h.	n.h.
Formalina 1 h	n.h.	1,4	n.h.	n.h.
Formalina 2 h (antes de 2 filtración)	n.h.	1,4	n.h.	n.h.
Formalina 3 h (después de 2 filtración)	n.h.	1,7	n.h.	n.h.
Formalina 6 h	n.h.	1,1	n.h.	n.h.
Formalina 12 h	n.h.	< 0,2	n.h.	n.h.
Formalina 18 h	n.h.	< 0,2	n.h.	n.h.
Formalina 24 h (antes 3 filtr., antes de 2. adición de Benzonasasa)	n.h.	< 0,2	4 positivo 1 negativo	1 positivo 4 negativo
Formalina 26 h (después 3. filtr., después de 2. adición de Benzonasasa)	n.h.	< 0,2	4 positivo 1 negativo	1 positivo 4 negativo
Día 2 formalina	n.h.	< 0,2	1 positivo 4 negativo	5 negativo
Día 3 formalina		< 0,2	1 positivo 4 negativo	5 negativo
Día 4 formalina		< 0,2	5 negativo	5 negativo
Día 5 formalina		< 0,2	5 negativo	5 negativo
Día 6 formalina		< 0,2	1 positivo 4 negativo	5 negativo
Día 7 formalina		< 0,2	1 positivo 4 negativo	5 negativo
Día 8 formalina		< 0,2	5 negativo	5 negativo

## (B) Experimentos de transfección e infección con ARN de RRV

5 Los resultados de los ensayos de seguridad mencionados anteriormente elevaron la sospecha de que se podía liberar ARN de RRV genómico durante el procedimiento de inactivación. Esto a su vez podía conducir a la incorporación de ARN de RRV genómico en las respectivas células. Aunque el tratamiento con benzonasa debería conducir a completar la degradación de ARN, la formación de liposomas u otros mecanismos como enmascaramiento del ARN de RRV genómico con partículas proteínicas, podía explicar la estrategia de escape de ARN intacto.

10 Se aisló ARN genómico de RRV de viriones purificados por gradiente. Se pudo determinar por RT-PCR el número de equivalentes de partículas. En un primer experimento (Tabla 8, N° 1) se diluyeron los equivalentes de partículas (ARN genómico) en etapas de diez veces en ambos medios de transfección (es decir, transfección) y medio regular (por ejemplo, infección). Se inocularon las dos mezclas de células C6-36 y células Vero. Después de un intercambio de medio, se incubaron los cultivos celulares durante varios días. Las muestras de los respectivos sobrenadantes se usaron para titulación de virus y determinación de HA. Los experimentos de infección con ARN genómico se llevaron a cabo varias veces (Tabla 8, N° 1-5).

15 Los experimentos de transfección mostraron resultados positivos en TCID<sub>50</sub> tanto en células C6-36 como células Vero. Los sobrenadantes de células Vero también presentaron Títulos de HA. La infección de las células Vero con un alto número de equivalentes de partículas (10<sup>8</sup>) mostró un título de virus de 6,8 log TCID<sub>50</sub>/ml y presentó un título de HA de 128, pero fracasó para infectar células C6-36. Otro experimento de infección con ARN de RRV genómico (N° 4) dio como resultado tanto células C6-36 como células Vero infectadas, con títulos de 8,4 y 6,6 log TCID<sub>50</sub>/ml, respectivamente. Los intentos de infección 2, 3 y 5 no proporcionaron resultados positivos sobre células Vero. El intento de infección N° 3 proporcionó un título bajo de 1,6 log TCID<sub>50</sub>/ml en células C6-36.

25 Aunque no todos los intentos para infectar las células con ARN de RRV genómico puro mostraron resultados positivos, parece que el ARN genómico a altas concentraciones puede infectar células de manera aleatoria. Todos los experimentos usando un reactivo de transfección liposómica mostraron resultados positivos. Por lo tanto, la proteína que enmascara ARN o los mecanismos de formación de liposomas explicarán los ensayos de seguridad positivos después de inactivación con formalina y degradación con benzonasa de ADN/ARN libre en la Tabla 7.

Tabla 8  
Experimentos de transinfección e infección con ARN de RRV

Nº	Muestra	PA infect.*	Transinfección ARN (DMRIE-C)						Infección ARN		
			C6-36			Vero			C6-36		Vero
			log TCID <sub>50</sub>	HA	log TCID <sub>50</sub>	HA	log TCID <sub>50</sub>	HA	log TCID <sub>50</sub>	HA	log TCID <sub>50</sub>
1	ARN-1	1 x 10 <sup>8</sup>	7,4	neg	7,1	128	0,2	128	6,8	128	
		1 x 10 <sup>7</sup>	5,5	neg	7,1	64	0,2	neg	n.h.		
		1 x 10 <sup>6</sup>	7,6	neg	7,2	128	0,2	neg	n.h.		
		1 x 10 <sup>5</sup>	5,2	neg	5,6	128					
		1 x 10 <sup>4</sup>	0,2	neg	0,2	neg					
2	ARN-1	1 x 10 <sup>8</sup>				0,2		0,2	n.h.		
3	ARN-1	1 x 10 <sup>8</sup>	7,5	n.h.	4,6	n.h.	1,6	0,2	n.h.		
4	ARN-2	1 x 10 <sup>8</sup>	7,2	n.h.	4,2	n.h.	8,4	6,6	n.h.		
	ARN-2	1 x 10 <sup>7</sup>	7,0	n.h.	5,0	n.h.					
5	ARN-2	1 x 10 <sup>8</sup>				0,2		0,2	n.h.		

\* PA: equivalentes de partículas infecciosas

n.h.: no hecho

(C) Inactivación UV de RRV infeccioso.

5 Para las consideraciones mencionadas anteriormente, se llevaron a cabo experimentos a pequeña escala para inactivar RRV por irradiación UV. Los sobrenadantes de RRV PV fueron irradiados con UV durante diferentes cantidades de tiempo con dos intensidades UV: 2,1 mv/cm<sup>2</sup> (muestras 1-10) y 3,3 mv/cm<sup>2</sup> (muestras 11-20). Con posterioridad, estas muestras se sometieron a titulación de virus, titulación de antígeno (EIA) y se determinó el título de hemaglutinación. Las muestras, que fueron irradiadas durante más de 3 minutos (Nos. 6-10 y 14-19), también fueron sometidas a ensayo de seguridad en células C6-36 (Tabla 9).

10 Los títulos de virus cayeron después de 10 minutos de irradiación UV de 7,4 log TCID<sub>50</sub>/ml (control, muestra 1) a 1,5 log TCID<sub>50</sub>/ml con ambas intensidades de UV. La hemaglutinación permaneció estable durante 15 minutos a una intensidad UV de 2,1 mv/cm<sup>2</sup> con un título de HA de 9, pero descendió a 8 a una intensidad de UV de 3,3 mv/cm<sup>2</sup>. Los títulos de antígeno (EIA) también permanecieron estables durante 15 minutos de irradiación, dentro de un intervalo entre 640-1.280. Los ensayos de seguridad, llevados a cabo con muestras irradiadas durante 3 y 5 minutos a una intensidad de UV de 2,1 mv/cm<sup>2</sup> (muestra N° 6 y 7), aún mostraron CPE en cultivo celular y proporcionaron títulos de virus de 8,2 y 8,6 log TCID<sub>50</sub>/ml, respectivamente. Los ensayos de seguridad, llevados a cabo con muestras irradiadas durante 2, 3 y 5 minutos a la mayor intensidad UV de 3,3 mv/cm<sup>2</sup> (muestra N° 6 y 7), aún mostraron CPE en cultivo celular y dieron como resultado títulos de virus de 8,2, 8,6 y 8,7 log TCID<sub>50</sub>/ml, respectivamente. Después de 10 minutos de irradiación, todos los ensayos de seguridad fueron negativos.

20 La irradiación con UV a las intensidades de tanto 2,1 mv/cm<sup>2</sup> como 3,3 mv/cm<sup>2</sup> durante más de 10 minutos inactivó las preparaciones de RRV completamente. La antigenicidad, como se muestra en los ensayos de HA y EIA, permaneció no dañada a las dos intensidades de irradiación durante 15 minutos. Después de 30 minutos, la antigenicidad se vio afectada.

Tabla 9  
Inactivación UV de virus infecciosos

N° Muestra	Tratamiento	Tiempo (segundos)	TCID <sub>50</sub> /ml	HA	EIA	Intensidad UV mv /cm <sup>2</sup>	UV Total mJ/cm <sup>2</sup>	Seguridad C6-36 TCID <sub>50</sub> /ml
1.RRV PVI/Sp5/57/4/98	material de partida	-	7,4	9	640	-	0	n.h.
2.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 30 s	30	4,4	9	640	2,1	63	n.h.
3.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 60 s	60	3,7	9	640	2,1	126	n.h.
4.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 90 s	90	1,7	9	640	2,1	189	n.h.
5.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 2 min	120	1,8	9	640	2,1	252	n.h.
6.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 3 min	180	3,2	9	1280	2,1	378	+ (8,2)
7.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 5 min	300	1,5	9	1280	2,1	630	+ (8,6)
8.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 10 min	600	1,5	9	1280	2,1	1260	- (0,2)
9.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 15 min	900	1,5	9	640	2,1	1890	- (0,2)
10.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 5 cm, 30 min	1800	1,5	7	320	2,1	3780	- (0,2)
11.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 30 s	30	3,8	9	640	3,3	99	n.h.
12.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 60 s	60	3,0	9	640	3,3	198	n.h.
13.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 90 s	90	1,7	9	640	3,3	297	n.h.
14.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 2 min	120	2,2	9	640	3,3	396	+ (8,2)
15.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 3 min	180	1,6	8	640	3,3	594	+ (8,6)
16.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 5 min	300	1,5	8	1280	3,3	990	+ (8,7)
17.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 10 min	600	1,5	8	640	3,3	1980	- (0,2)
18.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 15 min	900	1,5	7	640	3,3	2970	- (0,2)
19.RRV PVI/Sp5/57/4/98	4 ml, 3 cm, 30 min	1800	1,5	2	160	3,3	5940	- (0,2)
20. control positivo		-	7,2	9	-	-	-	n.h.

(D) Inactivación UV de una recolección de fermentador de 1.200 litros inactivada con formalina.

5 La recolección de virus de fermentador de 1.200 litros tratada con formalina fue irradiada con UV con 3 ciclos a un caudal de 300 l/h, 3 ciclos a 150 l/h y 3 ciclos a 75 l/h. Una segunda alícuota de una recolección de virus de fermentador de 1.200 litros tratada con formalina fue irradiada con UV con 10 ciclos a un caudal de 300 l/h, pero esta vez después de diafiltración, para retirar altas concentraciones de pequeñas proteínas restantes. Los títulos de HA, los títulos de antígeno-EIA, los títulos de virus y la seguridad (CPE) se determinaron después de cada realización (Tabla 10).

10 Los títulos de virus en el primer experimento (sin diafiltración) disminuyeron después de 1 ciclo de irradiación con UV a una velocidad de flujo de 150 l/h desde 6,13 log TCID<sub>50</sub>/ml por debajo del límite de detección. Los ensayos de seguridad tampoco mostraron CPE. Sin embargo, después de 3 ciclos de irradiación UV a un caudal de 150 l/h, los ensayos de seguridad en cultivo celular mostraron resultados positivos y fueron también positivos en titulación de virus (6,7 log TCID<sub>50</sub>/ml). 3 ciclos de irradiación UV a un caudal de 75 l/h permanecieron negativos tanto en titulación de virus como en ensayos de seguridad. En el segundo experimento los ensayos de seguridad y la titulación de los virus permanecieron negativos después de 5 y más ciclos de irradiación. En el primer experimento, todas las dosis de irradiación no influyeron en los títulos de HA y EIA con 11 y 1:320, respectivamente. En el segundo experimento, todos los títulos de HA y EIA fueron 10 y 1:320, respectivamente, con la excepción de 6 ciclos de irradiación, que dieron como resultado un título de EIA de 1:640.

15 La doble inactivación de una recolección de fermentador de RRV con formalina y cinco o más ciclos de irradiación con UV a un caudal de 300 l/h es suficiente para destruir completamente la infectividad sin dañar la antigenicidad.

Tabla 10  
Inactivación UV de una recolección de fermentador de 1.200 litros de RRV

Muestra	Título HA	Título AG-EIA	TCID <sub>50</sub> (después Pase C6-36)	Lectura final de seguridad CPE
RRV F07-31 Recolección + material de partida de formaldehido	11	1:320	6,13	++++
RRV F07-31 Ultrafiltrado	4	1:80	7,04	+ - - -
RRV F07-31 Material de partida diafiltrado	11	1:320	5,95	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 1x UV 300l/h	11	1:320	6,29	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 2x UV 300l/h	11	1:320	5,71	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 3x UV 300l/h	11	1:320	6,31	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 1x UV 150l/h	11	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 2x UV 150l/h	11	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 3x UV 150l/h	11	1:320	6,70	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 1x UV 75l/h	11	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 2x UV 75l/h	11	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina 3x UV 75l/h	11	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 1x UV 300l/h	10	1:320	6,71	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 2x UV 300l/h	10	1:320	6,71	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 3x UV 300l/h	10	1:320	6,82	++++
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 4x UV 300l/h	10	1:320	2,82	+ - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 5x UV 300l/h	10	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 6x UV 300l/h	10	1:640	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 7x UV 300l/h	10	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 8x UV 300l/h	10	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 9x UV 300l/h	10	1:320	0,21	- - - -
RRV F07-31 Recolec. + Formalina diafiltrada 10x UV 300l/h	10	1:320	0,21	- - - -

(E) Eficacia de preparaciones de vacuna de candidato de RRV dobles inactivadas. Dosis eficaz (ED<sub>50</sub>), Dosis protectora (PD<sub>50</sub>) y titulaciones ELISA en ratones inmunizados.

5 Se ajustó una vacuna de candidato de RRV inactivada con formalina y una doble inactivada (formalina + irradiación por UV) 100 µg por dosis y después se diluyó en etapas 4 veces. Cada dilución se inyectó a un grupo de 10 ratones. Después de 3 semanas, se reforzaron los ratones con la correspondiente cantidad de la vacuna. Se extrajeron muestras de sangre la semana 3, antes del refuerzo y la semana 6, 3 semanas después del refuerzo. Se analizaron los sueros por un ELISA de anticuerpo de RRV. La dosis eficaz 50 (ED<sub>50</sub>), esto es la dosis de antígeno que es suficiente para inducir seroconversión en el 50% de los ratones inmunizados, se calculó después.

10 La semana 3, antes del refuerzo, el ED<sub>50</sub> del grupo inactivado con formalina fue 635 ng y del grupo con la doble inactivación con formalina y UV 202 ng. Después del refuerzo, los valores de ED<sub>50</sub> fueron 33 ng y 10 ng, respectivamente. El análisis de los títulos ELISA, sin embargo, demostró que el grupo con la doble inactivación presentaba titulaciones de anticuerpo incluso mayores, por ejemplo la semana 3, 9 ratones con un título ELISA de 1.000 frente a 16 ratones con 1.000 en el grupo de doble inactivación y ningún ratón con 10.000 en el grupo de la formalina frente a 4 ratones con 10.000 en el grupo de doble inactivación. Después del refuerzo, de nuevo los títulos del grupo de doble inactivación fueron mayores: 8 ratones en el grupo de la formalina comparado con 11 ratones en el grupo de doble inactivación con 100.000 y 4 ratones adicionales con un título ELISA de 1 millón en el grupo de doble inactivación (Tabla 11).

15 La semana 6, 3 semanas después del refuerzo, se infectaron los ratones por vía intravenosa con 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (dosis infectiva de cultivo de tejido 50) de virus Ross River vivo (cepa T48). El día 1, 2, 3 y 4 p.i. se tomaron muestras de sangre y se determinó con posterioridad el TCID<sub>50</sub> del suero. Se calculó la dosis protectora 50 (PD<sub>50</sub>), esto es la dosis de antígeno a la que el 50% de los ratones infectados no mostró viremia. El PD<sub>50</sub> de 78 ng fue idéntico para ambas preparaciones de antígeno, la inactivada con formalina así como el antígeno doble inactivado (formalina+irradiación por UV).

Tabla 11

25 Dosis eficaz (ED<sub>50</sub>), dosis protectora (PD<sub>50</sub>) y títulos ELISA en ratones inmunizados.

		ED <sub>50</sub>			PD <sub>50</sub>	
Inactivación	Semana 3	Semana 6 (Refuerzo)		Semana 6		
Formalina	635 ng	33 ng		78 ng		
Formalina + UV	202 ng	10 ng		78 ng		

Título ELISA

Semana	Inact.	<10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	N
3	Form.	35	8	8	9	0	0	0	0	0	60
	Form. + UV	27	7	6	16	4	0	0	0	0	60
6	Form.	14	7	5	15	11	8	0	0	0	60
	Form. + UV	8	7	9	7	14	11	4	0	0	60

30 La infectividad residual encontrada principalmente en la estirpe celular C6-36 muy sensible después de tratamiento con formalina sólo, está causada lo más probablemente por ARN de RRV infeccioso. La introducción de una segunda etapa de inactivación de virus adicional (irradiación UV), afectando al genoma del virus después del tratamiento con formalina, dio como resultado preparaciones de vacuna de candidato de RRV completamente inactivadas y seguras sin afectar a la inmunogenicidad y eficacia en un modelo de ratón.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de:
- (i) tratar la muestra con una concentración eficaz de formalina y
- (ii) someter la muestra a una dosis eficaz de luz UV en un aparato de flujo continuo,
- 5 en el que el aparato de flujo continuo comprende (1) una lámpara UV y (2) una cámara de capa delgada, teniendo la capa delgada de la cámara de capa delgada un espesor no mayor que 1 cm y en el que la muestra se hace pasar a través de la cámara de capa delgada del aparato de una manera cíclica o en serie, repitiendo 2 a 10 veces, en el que la etapa (i) se realiza previamente a la etapa (ii) o viceversa y en el que el caudal de la muestra a través del aparato es de 50 litros por hora a 1.000 litros por hora.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que el virus es un virus con envoltura.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el virus con envoltura es un virus de ARN.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el virus está completamente inactivado.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la reducción del título de virus debido a la inactivación de los virus en la muestra es al menos  $1 \times 10^5$ , o al menos  $1 \times 10^7$ , o al menos  $1 \times 10^{10}$ , o al menos  $1 \times 10^{14}$ .
- 15 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de tratar la muestra con una concentración eficaz de formalina se lleva a cabo durante 12 a 96 horas.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la concentración eficaz de formalina es 0,01 a 0,1% (p/p).
- 20 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la luz UV es UVC con una longitud de onda de 100 a 280 nm.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la dosis de luz UV es 5 a 200 mJ/cm<sup>2</sup>.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV es 1 a 20 segundos.
- 25 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el flujo de la muestra a través de la cámara de capa fina no es estrictamente laminar.
12. El método según la reivindicación 10 u 11, en el que la capa delgada de la cámara de capa delgada tiene un espesor de aproximadamente 1 mm.
- 30 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en fluido biológico o disoluciones que proceden de un procedimiento de cultivo celular para preparar productos biológicos, médicos o farmacéuticos.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además la etapa de someter la muestra a una etapa de purificación para retirar la formalina residual en la muestra.
- 35 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además purificar el virus inactivado en la muestra para pureza farmacéutica y formular el virus inactivado purificado en una composición farmacéutica para uso como una vacuna.

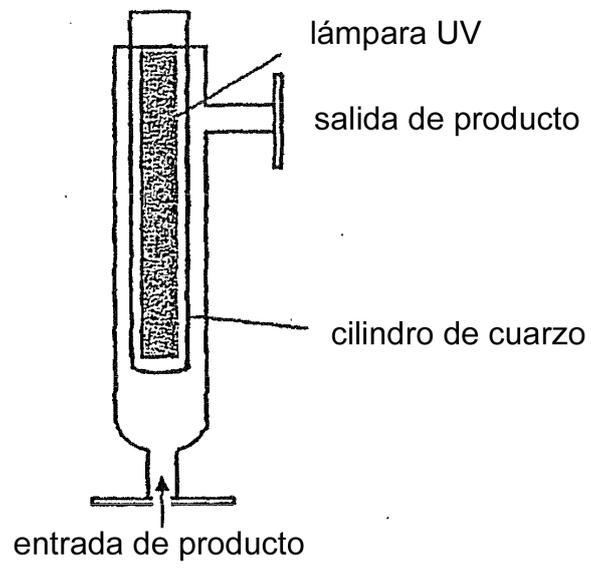


Figura 1

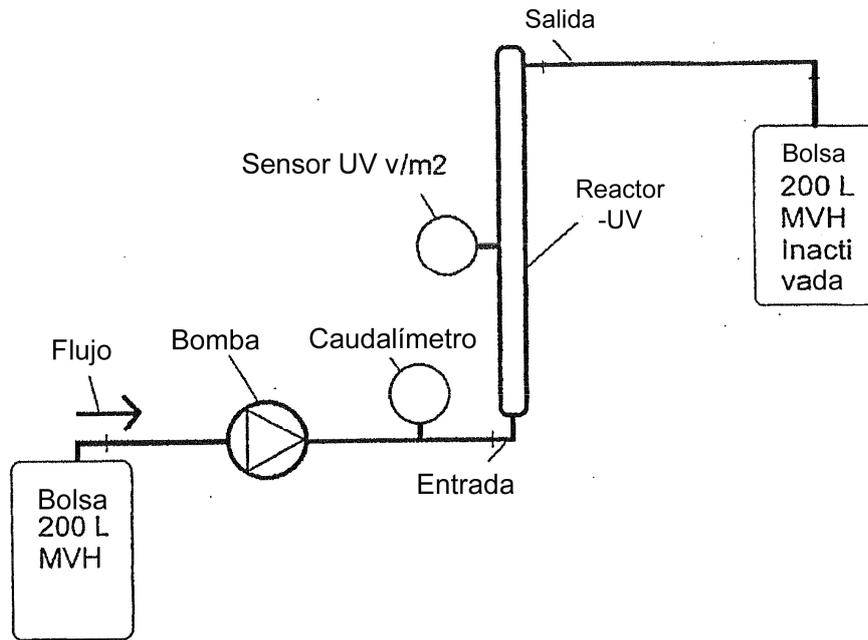


Figura 2

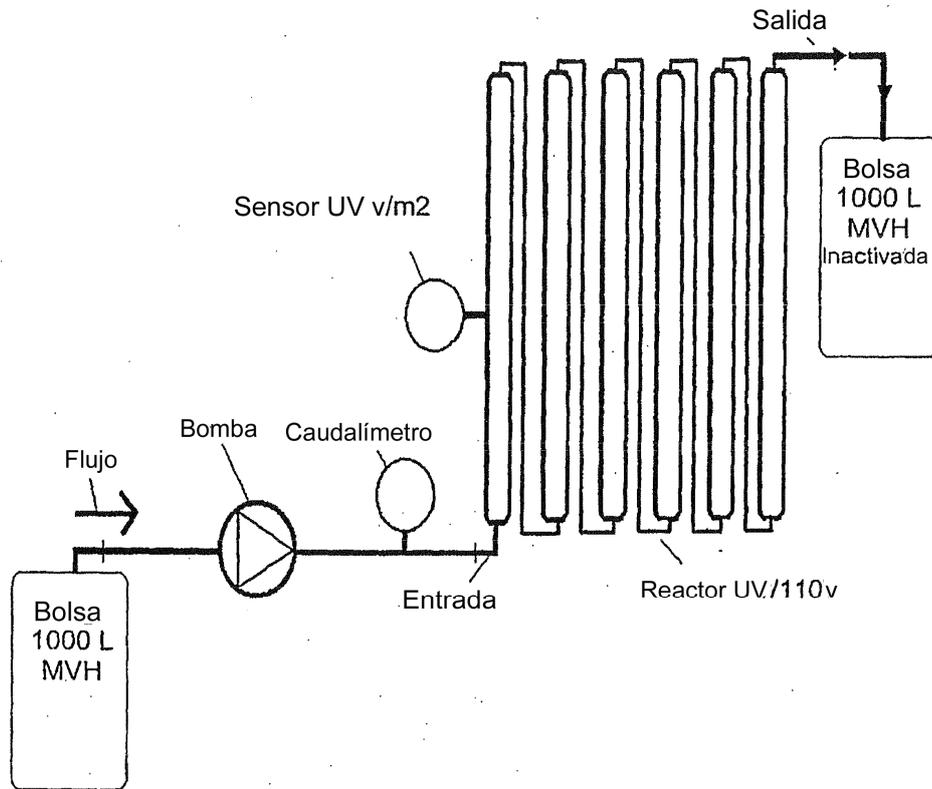


Figura 3