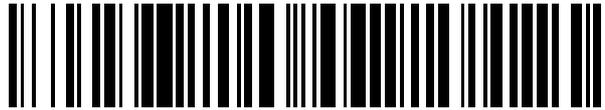


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 818**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/06** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011 E 11716419 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2566958**

54 Título: **Procedimiento de inactivación del virus de la gripe**

30 Prioridad:

**03.05.2010 US 330443 P**

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

**08.03.2016**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)  
Rue de l'Institut, 89  
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**ANDRE, BRUNO RENE y  
CHAMPLUVIER, BENOIT PAUL SUZANNE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 562 818 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 inactivación del virus de la gripe

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de inactivación de virus de la gripe y virus adventicios contaminantes producidos en cultivo celular. El procedimiento de la invención es simple y fácil de implementar. En particular, puede ser insertado adecuadamente en cualquier procedimiento de purificación de virus.

**Antecedentes técnicos**

10 Debido a la gran cantidad de enfermedades causadas por virus, la virología ha sido un campo estudiado intensamente. Siempre ha existido una demanda para producir virus de manera eficiente con el fin de aislar y purificar proteínas virales, para generar vacunas, para preparar herramientas de análisis o para proporcionar virus para estudios de laboratorio.

Recientemente, se han desarrollado tecnologías, basadas en cultivo celular como una alternativa a los sistemas de producción derivados del huevo, tradicionales.

15 Los sistemas de cultivo celular aparecen como un modo alternativo adecuado de preparación de vacunas, en particular, más simple, flexible, consistente, permitiendo mejorar las posibilidades de aumentar la escala de las capacidades de producción de vacunas y, de esta manera, abarcar grandes cantidades de virus, si es necesario, en particular, en el caso de una amenaza de pandemia o un ataque terrorista.

20 Independientemente del modo de producción, el virus, en particular, si está destinado a ser usado para la vacunación, debe ser seguro y por lo tanto es necesario reducir o eliminar la infectividad. Esto puede requerir que el virus sea atenuado. De manera alternativa esto puede requerir que el virus sea purificado e inactivado. Aunque es necesario reducir de manera irreversible, tanto como sea posible, la infectividad del virus, sin embargo debe preservarse su inmunogenicidad. También es esencial que las vacunas estén libres de agentes adventicios, ya que el anfitrión para la producción del virus, tal como huevos o cultivos de células, puede haber sido contaminado con los virus durante su cultivo. En la técnica se conocen diferentes agentes de inactivación, tales como detergentes, o agentes químicos, tales como formaldehído y beta-propiolactona (BPL). Sin embargo, puede haber problemas asociados con respecto al uso de dichos agentes: (i) muy frecuentemente, el uso de estos agentes no permite una inactivación completa de la suspensión de virus a tratar, ya que frecuentemente se ha informado acerca de una infectividad residual significativa; (ii) los detergentes deben ser usados con precaución ya que pueden tener un impacto perjudicial sobre la estructura de las proteínas virales, que puede ser esencial para la inmunogenicidad del virus, su desnaturalización inducida por detergente, lo que conduce, finalmente, a una eficacia deteriorada de la vacuna, debido a la pérdida de inmunogenicidad; (iii) los agentes químicos, tales como BPL y formaldehído, deben ser manipulados con cuidado y requieren equipos específicos para su manipulación, ya que frecuentemente son productos nocivos y presentan riesgos para la salud de las personas que los manipulan; (iv) el formaldehído, en particular, una manera estándar de inactivación de virus, generalmente requiere tiempos de incubación prolongados para la inactivación de un virus, de 1 a varios días, y se conoce que es responsable también de la agregación de proteínas, agregación que puede afectar negativamente a las etapas subsiguientes requeridas para la purificación de virus; (v) los detergentes y los agentes químicos deben ser eliminados de la suspensión de virus después de su uso, añadiendo de esta manera complejidad a los procedimientos de purificación de virus. La implementación de estas técnicas de inactivación de un ortomixovirus puede conducir además a que todavía haya presente una infectividad residual significativa.

40 La luz UV se conoce también en la técnica como un medio para la inactivación de virus infecciosos. Por ejemplo, el documento WO 2008/039494 divulga un dispositivo y procedimientos de inactivación de virus infecciosos, tales como virus de la gripe, y agentes de inactivación adventicios potenciales, tales como virus adventicios, con luz ultravioleta (UV). Sin embargo, el documento WO 2008/039494 enseña también que el tratamiento UV no proporcionó una inactivación significativa de los virus adventicios que ensayaron realmente.

45 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de proporcionar procedimientos alternativos de inactivación de virus de la gripe, que sean simples de implementar y que permitan conseguir una inactivación completa del virus, ya que la infectividad residual no es aceptable o seguridad de la vacuna, cuyo procedimiento debería ser útil también para inactivar posibles virus adventicios, que pueden contaminar el fluido que comprende el virus de interés.

**Sumario de la invención**

50 El procedimiento según la presente invención proporciona un procedimiento de inactivación de un virus de la gripe que supere los inconvenientes indicados anteriormente. En particular, el procedimiento de la invención permite conseguir un alto nivel de inactivación de virus, mientras se conserva la antigenicidad del virus.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de inactivación de un virus de la gripe propagado en cultivo celular y de inactivación de virus contaminantes adventicios que comprende al menos las siguientes etapas:

- (a) tratar un fluido que contiene virus de la gripe con beta-propiolactona, y
- 5 (b) irradiar el fluido que contiene virus de la gripe con la luz UV.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de una vacuna que comprende un virus de la gripe propagado en cultivo celular que comprende las siguientes etapas:

- (a) tratar un fluido que contiene virus de la gripe y virus contaminantes adventicios con beta-propiolactona,
- (b) irradiar el fluido que contiene virus de la gripe y virus contaminantes adventicios con luz UV, y
- 10 (c) formular el virus de la gripe tratado con beta-propiolactona e irradiado con UV en una vacuna.

La presente divulgación describe también un virus obtenible según el procedimiento de la invención.

La presente divulgación describe además una composición inmunogénica que comprende un virus obtenido según la presente invención mezclado con un vehículo farmacéutico adecuado.

15 La presente divulgación describe además una composición inmunogénica que comprende un virus obtenido según la presente invención para uso en medicina. En particular, se describe una composición inmunogénica para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones asociadas con ortomixovirus.

#### Descripción detallada

20 La presente divulgación se refiere a un procedimiento mejorado de inactivación de virus que puede ser aplicado a la producción de virus tanto a pequeña como a gran escala. El procedimiento descrito en la presente memoria es aplicable, en particular, a virus derivado de huevos y virus derivado de cultivo celular. El procedimiento implica la implementación de al menos una etapa de inactivación, con al menos dos agentes de inactivación distintos. Más específicamente, el procedimiento descrito en la presente memoria se basa en la combinación de un tratamiento físico, tal como irradiación UV, y un tratamiento químico, en particular un tratamiento que implica una etapa de alquilación, tal como con BPL, con el fin de inactivar los virus. Opcionalmente, dicho procedimiento comprende además una etapa de división basada en detergente.

25 Los presentes inventores encontraron que la combinación específica de medios de inactivación tal como se divulga en la presente memoria, combinando un tratamiento físico y un tratamiento químico, permitía conseguir una inactivación de virus más completa, es decir, la eliminación de la infectividad residual que puede estar asociada con los tratamientos de la técnica anterior. Los presentes inventores observaron sorprendentemente que esta combinación, además de proporcionar una inactivación completa del virus, no afecta a la integridad de las proteínas virales producidas, ni a su antigenicidad. El virus resultante, independientemente de si es purificado adicionalmente o no, es adecuado para su uso en una composición inmunogénica, tal como una composición de vacuna.

30 El procedimiento reivindicado tiene una o más de las siguientes ventajas: (i) optimiza la accesibilidad del virus para el tratamiento, independientemente de si el virus está agregado o no, si está atrapado o no dentro de los restos celulares, si la conformación o las condiciones ambientales son óptimas o no para una etapa de inactivación de virus; (ii) reduce el riesgo de que una fracción de virus pueda escapar de la inactivación cuando sólo se realiza una etapa de inactivación consiguiendo de esta manera una inactivación más completa del virus; (iii) reduce el riesgo de inactivación incompleta asociado con la resistencia que el virus pueda exhibir contra un tratamiento específico, independientemente de si esta resistencia está vinculada a la naturaleza del virus o las condiciones experimentales/ambientales del tratamiento. Este puede ser el caso cuando, por ejemplo, sólo una fracción de los virus dentro de una suspensión de virus puede ser inactivada por un agente químico a una concentración determinada pero, por razones de seguridad o por razones de inmunogenicidad, en particular, puede ser imposible aumentar adicionalmente la concentración del agente de inactivación. Una ventaja adicional del procedimiento reivindicado es que la implementación de la irradiación UV puede permitir disminuir la cantidad de agente químico que se usa, en comparación con la situación en la que la inactivación se realiza sólo usando el agente químico; (iv) reduce el tiempo requerido para inactivar el virus producido, en comparación con los tratamientos de la técnica anterior, en particular el tratamiento basado en formaldehído.

35 40 45 50 Cualquier agente químico conocido por tener un efecto inactivador de virus puede ser usado en el procedimiento descrito en la presente divulgación, tal como por ejemplo un agente de alquilación (por ejemplo, BPL). Se usa BPL en el procedimiento de la invención, ya que, además de su capacidad de inactivación, presenta la ventaja de degradar ácidos nucleicos, tales como ADN. Esta capacidad adicional es de particular importancia si el virus producido en cultivos de células tal como se describe en la presente memoria va a ser incluido en una vacuna. En efecto, por razones de

seguridad, el contenido de ADN residual, que se origina a partir de la célula huésped usada para propagar el virus, debe mantenerse lo más bajo posible y su tamaño, lo más pequeño posible. BPL es un agente de mono-alkilación que reacciona con diversas moléculas biológicas, en particular, modifica las bases nucleicas del genoma viral y bloquea su replicación. Puede ser inactivado rápidamente calentando a 37°C durante 2 horas ya que se hidroliza completamente a productos no tóxicos ácido beta-hidroxipropiónico y un isómero de lactato. El procedimiento de inactivación de un virus de la gripe de la presente invención comprende al menos una etapa de tratar un fluido que contiene el virus con BPL (tratamiento BPL) y una etapa de irradiar el fluido que contiene el virus con luz UV (irradiación UV). En una realización, el tratamiento BPL y la irradiación UV se realizan secuencialmente, en cualquier orden. Por ejemplo, el tratamiento BPL puede preceder a la irradiación UV, o puede seguirla. De manera alternativa, en el procedimiento descrito en la presente descripción, las etapas de tratamiento BPL y de irradiación UV pueden ser implementadas de manera simultánea. Esto presenta la ventaja adicional de simplificar y acortar el procedimiento gracias al ahorro de una etapa extra. Además, las etapas de tratamiento BPL y de irradiación UV pueden estar separadas por otras etapas de purificación, o pueden ser implementadas de una manera sucesiva, en el sentido de que el tratamiento BPL es seguido inmediatamente por el tratamiento UV o el tratamiento UV es seguido inmediatamente por el tratamiento BPL, sin ninguna etapa de purificación adicional entre los mismos.

Las expresiones "fluido que contiene el virus", tal como un fluido que contiene ortomixovirus, "fluido que comprende un virus" son sinónimas y deben entenderse como cualquier preparación líquida que comprende un virus, independientemente de su estado de purificación. El fluido puede no haber sido purificado en absoluto. Por ejemplo, el fluido puede ser el sobrenadante del cultivo celular recogido después de que las células se infectaron con un virus y el virus se replicó y se liberó en el medio. De manera alternativa, el fluido puede haber sido parcialmente purificado. Por ejemplo, el fluido que contiene el virus puede haber sido clarificado previamente, mediante filtración o mediante centrifugación, antes de ser sometido a inactivación mediante un tratamiento de BPL y una irradiación UV.

La inactivación del virus puede conseguirse con menos del 1% de BPL. En una realización de la invención, BPL se usa a una concentración que varía del 0,01% al 0,1%, o del 0,03% al 0,8%, o es del 0,05%. La BPL se añade apropiadamente a una solución tamponada y el pH de la solución se mantiene entre 6 y 10. Debido a que se conoce que la actividad de BPL es particularmente sensible al pH, el pH de la solución tampón se mantiene entre 6 y 9, adecuadamente entre 7 y 8, y más adecuadamente entre 7,4 y 8. En un aspecto de la divulgación, puede añadirse BPL a una solución tampón fosfato 66 mM - citrato 125 mM pH 7,4. La BPL es activa a una temperatura comprendida entre 4°C y la temperatura ambiente. En un aspecto de la divulgación, la temperatura de incubación de BPL puede ser de 4°C. En un aspecto distinto de la divulgación, la temperatura de incubación de BPL puede ser la temperatura ambiente. En el sentido de la presente divulgación, temperatura ambiente debe entenderse como una temperatura comprendida entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 24°C. El tiempo de incubación puede variar entre una hora y unos pocos días. En un aspecto de la divulgación, la BPL puede ser añadida durante la noche. En el sentido de la presente divulgación, una incubación durante la noche significa un tiempo de incubación de al menos 8 horas, posiblemente de 12-16 horas. En un aspecto de la divulgación, la BPL puede ser añadida a una concentración del 0,05% a 4°C durante la noche. En un aspecto distinto de la divulgación, la BPL puede ser añadida a una concentración del 0,05% a temperatura ambiente durante la noche. Después de añadir BPL y dejarla reposar durante el período de tiempo apropiado a temperatura ambiente, la suspensión de virus tratada con BPL puede ser almacenada a 4°C durante unos pocos días, tal como por ejemplo tres días, antes de una purificación adicional de la suspensión de virus, si es necesaria.

La irradiación UV adecuada se produce mediante una luz tipo C, es decir, luz con una longitud de onda de 100 a 280, adecuadamente de 200 y 270 nm, y más adecuadamente de 254 nm que es el área de absorción máxima por los ácidos nucleicos de los virus tratados. Durante la inactivación UV, la energía de excitación de la radiación de longitud de onda UV altera los enlaces covalentes de las bases purina y pirimidina, lo que resulta en daños al virus objetivo, así como agentes extraños y carga biológica bacteriana. La dosis o fluencia de UV puede variar, en particular, de 50 a 500 J/m<sup>2</sup>. La presente invención contempla cualquier dosis UV que conduce a la inactivación de virus. Según una realización del procedimiento de la presente invención, la fluencia UV oscila de 50 a 500 J/m<sup>2</sup>, de 100 a 400 J/m<sup>2</sup> o es de 200 julios/m<sup>2</sup> o es de 100 julios/m<sup>2</sup>. En un aspecto de la divulgación, la fluencia UV puede ser de 60 julios/m<sup>2</sup>. Los dispositivos comerciales disponibles para la irradiación UV permiten gestionar de volúmenes pequeños a volúmenes muy grandes de líquido. Solo como una ilustración, puede citarse el dispositivo siguiente: UVIVATEC™ (De Bayer).

Las condiciones BPL y las fluencias UV se determinarán con el fin de lograr las condiciones óptimas para la inactivación de virus, según la cantidad y el tipo de virus que debe ser inactivado. La persona con conocimientos en la materia puede usar cualquier ensayo conocido en la técnica para evaluar la inactivación viral, tal como midiendo la dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID<sub>50</sub>/ml), que representa la cantidad de un virus capaz de infectar el 50% de las células. En este ensayo, un cultivo de células se califica como infectado o no, permitiendo determinar una titulación del virus, como la medida de la infectividad del virus. Se realizan una serie de diluciones sucesivas de las muestras infecciosas a ensayar y parte de cada dilución se usa para inocular células infectables adecuadas. Después de incubar las células durante unos pocos días, de manera que el virus, si es infeccioso, pueda replicarse, la presencia del virus puede ser detectada mediante dos procedimientos de lectura conocidos por la persona con conocimientos en la materia, el análisis del efecto citopático

(CPE) en células y/o el ensayo de hemaglutinación con glóbulos rojos de pollo realizados sobre el sobrenadante del cultivo. A continuación, el título viral se calcula según el procedimiento de Reed y Muench (Reed, L. J. y Muench, H., 1938, The American Journal of Hygiene 27: 493-497). Si se desea conservar la antigenicidad y la inmunogenicidad, la persona con conocimientos en la materia adaptará las condiciones de inactivación del virus con el fin de no alterar la conformación o la estructura de las proteínas víricas. En paralelo con los ensayos de inactivación, controlará la integridad del virus, o de sus proteínas específicas, mediante cualquier técnica conocida en la materia. Las técnicas que pueden citarse como ejemplos ilustrativos son cualquier técnica de detección de proteínas, tal como análisis de transferencia Western con anticuerpos específicos o ensayos de umbral. En el caso particular del virus de la gripe, el contenido de la proteína HA, conocida como inmunogénica, puede ser supervisado específicamente mediante el ensayo SRD (ensayo de inmunodifusión radial simple), que es una técnica familiar para una persona con conocimientos en la materia (J. M. Wood et al.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood et al., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330)). Debido a que el ensayo SRD se basa en la formación de complejos anticuerpo/antígeno, dicho ensayo, cuando se evalúa el nivel de HA a partir de una suspensión de virus de la gripe, permite analizar si el tratamiento de inactivación de esa suspensión afecta negativamente a la antigenicidad del virus.

Además de inactivar el virus de la gripe, el procedimiento de inactivación de la presente invención permite también la inactivación de posibles virus adventicios que pueden contaminar el fluido que contiene virus de la gripe. En particular, estos virus pueden haber estado presentes en el huésped que produce el virus de la gripe, o pueden haber contaminado el fluido que contiene virus de la gripe durante su purificación, en cualquier etapa. Las autoridades reguladoras, por ejemplo en el campo de la vacunación, son cada vez más estrictas e imponen que las vacunas sean ensayadas contra numerosos virus potenciales contaminantes. A modo de ejemplos de dichos virus, pueden citarse PPV (parvovirus porcino), MuLV (virus de leucemia murina), PRV (virus de la pseudorrabia porcina) y HAV (virus de Hepatitis A). Los parvovirus son virus de ADN pequeños, sin envoltura, que infectan a una gran cantidad de especies animales. Son extremadamente resistentes, en particular, a tratamientos químicos. El procedimiento según la invención permite inactivar una amplia gama de virus adventicios, tales como, pero sin limitarse a, MuLV, PRV, HAV y PPV. En particular, el procedimiento de la presente invención se usa para inactivar al menos uno entre los MuLV, PRV, HAV y PPV contaminantes, o cualquier combinación de los mismos a partir de virus de la gripe producido en cultivo celular. En un aspecto de la divulgación, el procedimiento descrito en la presente memoria puede ser usado para inactivar todos ellos. La eliminación de virus adventicios, cuando está relacionado con virus contaminantes, se denomina frecuentemente eliminación vírica. Por consiguiente, en el sentido de la presente divulgación, "eliminación vírica" debe entenderse como la capacidad de eliminar virus adventicios que puedan contaminar la suspensión del virus de interés. La eliminación vírica puede ser supervisada y evaluada mediante cualquier procedimiento adecuado que permita detectar la presencia de un virus determinado. Por ejemplo, la evaluación puede ser directa, es decir, la presencia del virus endógeno, si está presente como un contaminante, puede ser detectada directamente a partir de la suspensión de virus a ser ensayada, mediante PCR, por ejemplo, usando cebadores específicos para el genoma del virus contaminante de interés. Sin embargo, por razones de sensibilidad, debido a se espera que los virus contaminantes estén presentes sólo a un nivel muy bajo, si existe, puede ser más adecuado el uso de una evaluación indirecta que depende, por ejemplo, de la adición de virus exógeno. En ese caso, la suspensión de virus a ser inactivada se enriquece con el virus adventicio de interés, es decir, con una cantidad conocida del virus adventicio para el cual debe determinarse la eliminación vírica. El enriquecimiento ocurre antes de la implementación de cualquier etapa de inactivación de virus, de manera que se tenga una cantidad suficiente de virus para servir de referencia antes de la inactivación y posiblemente purificación. A continuación, la etapa de inactivación de interés se lleva a cabo sobre la suspensión de virus enriquecida, por ejemplo, el procedimiento de inactivación descrito en la presente memoria. La titulación de virus se determina antes y después de la implementación del procedimiento de inactivación sobre la suspensión de virus enriquecida, de manera que la infectividad del virus adventicio usado para el enriquecimiento pueda ser evaluada y, de esta manera, la eficacia del procedimiento de inactivación pueda ser evaluada. Las etapas de purificación pueden estar asociadas con las etapas de inactivación y, de esta manera, la combinación de las mismas puede ser evaluada también sobre la infectividad de un virus adventicio de interés.

El virus obtenido usando el procedimiento de la presente invención puede ser usado para cualquier propósito; incluyendo, por ejemplo, la purificación de proteínas virales, ensayos de análisis, infección de células huésped, propósitos de diagnóstico o usos terapéuticos o profilácticos, tales como vacunación y administración clínica. En particular, el virus obtenido usando el procedimiento de la presente invención puede ser adecuado para su uso en una composición inmunogénica, tal como en una vacuna.

Según un aspecto de la divulgación, el procedimiento descrito en la presente memoria puede ser aplicado a otros virus, en particular, a cualquier virus que es capaz de infectar células y usarlas para su replicación, incluyendo, pero sin limitarse a, adenovirus, hepadnavirus, virus del herpes, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, picornavirus, poxvirus, reovirus y retrovirus. En particular, el procedimiento descrito en la presente memoria es adecuado para los virus con envoltura, tales como mixovirus.

5 Por consiguiente, los virus o antígenos virales pueden ser derivados de un ortomixovirus, tales como el virus de la gripe. Los antígenos de ortomixovirus pueden ser seleccionados entre una o más proteínas virales, incluyendo hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), una o más de la transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos particularmente adecuados incluyen HA y NA, las dos glicoproteínas de superficie que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de gripe.

El virus de la gripe se selecciona del grupo que consiste en virus de gripe humana, virus de gripe aviar, virus de gripe equina, virus de gripe porcina (por ejemplo, cerdos), virus de la gripe felina. El virus de la gripe se selecciona más particularmente entre las cepas A, B y C, preferiblemente entre las cepas A y B.

10 El virus de la gripe o sus antígenos pueden ser derivados de cepas de gripe interpandémicas (anuales o estacionales). De manera alternativa, el virus de la gripe o sus antígenos pueden ser derivados a partir de cepas con potencial para causar un brote pandémico (es decir, cepas de la gripe con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas que circulan actualmente, o cepas de la gripe que son patogénicas en sujetos aviares y que tienen el potencial de ser transmitidos horizontalmente en la población humana, o cepas de la gripe que son patogénicas para los seres humanos). Dependiendo de la estación particular y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, el virus de la gripe o sus antígenos pueden derivarse de uno o más de los siguientes subtipos de hemaglutinina: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Preferiblemente, el virus de la gripe o sus antígenos son de los subtipos H1, H2, H3, H5, H7 o H9.

20 Las células que pueden ser usadas en el procedimiento descrito en la presente memoria puede ser, en principio, cualquier tipo de célula deseado entre células que pueden ser cultivadas en cultivo celular y que pueden soportar la replicación del virus. Pueden ser tanto células de crecimiento adherente como células de crecimiento en suspensión. Pueden ser células primarias o líneas celulares continuas. Se prefieren las líneas celulares genéticamente estables.

Las células de mamífero son particularmente adecuadas, por ejemplo, células humanas, de hámster, de ganado vacuno, de mono o de perro.

25 Una serie de líneas celulares de mamífero son conocidas en la técnica e incluyen PER.C6, células HEK, células de riñón embrionario humano (células 293), células HeLa, células CHO, células Vero y células MDCK.

Las células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde africano, tales como células de riñón como en la línea celular Vero. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón como en la línea celular MDCK.

30 Las líneas celulares de mamífero adecuadas para el cultivo de virus de la gripe incluyen células MDCK, células Vero o células PER.C6. Todas estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, de la colección American Type Cell Culture (ATCC).

En un aspecto de la divulgación, el procedimiento descrito en la presente memoria puede usar células MDCK. La línea celular MDCK original está disponible en la ATCC como CCL-34, pero pueden usarse también derivados de esta línea celular, tales como las células MDCK adaptadas al crecimiento en suspensión (WO 1997/37000).

35 De manera alternativa, las líneas celulares para su uso en la invención pueden ser derivadas a partir de fuentes aviares, tales como pollo, pato, ganso, codorniz o faisán. Las líneas celulares aviares pueden ser derivadas a partir de una diversidad de etapas de desarrollo incluyendo las de embrión, polluelo y adulto. En particular, las líneas celulares pueden ser derivadas a partir de las células embrionarias, tales como fibroblastos de embriones, células germinales u órganos individuales, incluyendo tejidos neuronal, cerebral, de retina, renal, hepático, cardíaco, muscular o extraembrionarios y membranas que protegen el embrión. Pueden usarse fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Los ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células madre embrionarias aviares (WO01/85938) y células de retina de pato (WO05/042728). En particular, la línea celular EB66<sup>®</sup> derivada de células madre embrionarias de pato se contempla en la presente invención (WO 2008/129058). Otras células madre embrionarias aviares adecuadas incluyen la línea celular EBx derivada a partir de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 (WO2006/108846). Esta línea celular EBx presenta la ventaja de ser una línea celular genéticamente estable cuya creación se ha producido de manera natural y no requiere ninguna modificación genética, química o viral. Estas células aviares son particularmente adecuadas para el cultivo de virus de la gripe.

Según una realización particular, el procedimiento de la invención usa células EB66<sup>®</sup>.

50 Las condiciones de cultivo celular (temperatura, densidad celular, valor del pH, etc.) son variables en un amplio rango debido a la idoneidad de las células empleadas y pueden adaptarse a los requisitos de condiciones de crecimiento de virus particulares. La determinación de las condiciones de cultivo apropiadas está dentro de las capacidades de la persona con conocimientos en la materia, ya que el cultivo de células está ampliamente documentado en la técnica (véase, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973), y R. I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, 4<sup>a</sup> edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

En un aspecto de la divulgación, las células huésped usadas en el procedimiento descrito en la presente divulgación pueden ser cultivadas en medios libres de suero y/o libres de proteínas. Un "medio libre de suero" (SFM) significa un medio de cultivo celular preparado para ser usado que no requiere la adición de suero, que permite la supervivencia celular y el crecimiento celular. No es necesario que este medio esté químicamente definido y puede contener hidrolizados de diverso orígenes, de plantas, por ejemplo. Dicho medio libre de suero presentan la ventaja de que puede descartarse la contaminación con virus, micoplasmas o agentes infecciosos desconocidos. Se entiende que "libre de proteínas" significa cultivos en los que la multiplicación celular se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero puede incluir opcionalmente proteínas tales como tripsina u otras proteasas que puedan ser necesarias para el crecimiento viral. Las células que crecen en dichos cultivos contienen de manera natural proteínas ellas mismas.

Los medios libres de suero están disponibles comercialmente en numerosas fuentes, por ejemplo, VP SFM (Invitrogen Ref 11681-020), Opti-Pro (Invitrogen, Ref 12309-019) o EX-CELL (JHR Bioscience).

Las células pueden ser cultivadas de diversas maneras, por ejemplo, en suspensión, o adhiriéndose a superficies, incluyendo crecimiento sobre microportadores, o sus combinaciones. El cultivo puede ser realizado en platos, matraces, botellas de cultivo rotatorias o en biorreactores, usando sistemas por lotes, de flujo discontinuo, semi-continuo o continuo, tales como sistemas de perfusión. Típicamente, las células se aumentan a partir de un vial de banco de células principal o de trabajo pasando por diversos tamaños de matraces o botellas de cultivo rotatorias y finalmente a los biorreactores. En un aspecto de la divulgación, las células empleadas en el procedimiento descrito en la presente memoria pueden ser cultivadas sobre perlas microportadoras en un medio libre de suero en un biorreactor agitado y el medio de cultivo es proporcionado mediante perfusión.

En un aspecto distinto de la divulgación, las células pueden ser cultivadas en suspensión en un modo por lotes, en particular, Células EB66<sup>®</sup>.

Antes de la infección con el virus, las células pueden ser cultivadas a aproximadamente 37°C, más adecuadamente a 36,5°C, a un pH que oscila desde 6,7 hasta 7,8, adecuadamente de aproximadamente 6,8 a 7,5, y más adecuadamente de aproximadamente 7,2.

Según la presente divulgación, la producción de virus basada en el cultivo de células incluye generalmente las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa viral a ser producida y cultivar las células infectadas durante un período de tiempo deseado para permitir la replicación del virus.

Con el fin de producir grandes cantidades de virus producido con células, es preferible inocular las células con la cepa de virus deseada una vez que las células han alcanzado una densidad elevada. Normalmente, la inoculación se realiza cuando la densidad celular es al menos de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml, de manera adecuada, aproximadamente de  $3 \times 10^8$  células/ml, más adecuadamente, de aproximadamente  $5 \times 10^8$  células/ml, incluso más adecuadamente  $7 \times 10^8$  células/ml, o incluso más alta. La densidad celular óptima para obtener la producción de virus más alta puede variar según el tipo de célula usada para la propagación de virus.

La inoculación puede ser llevada a cabo a una MOI (multiplicidad de infección) de aproximadamente  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , de manera adecuada de aproximadamente  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , y de manera más adecuada, de aproximadamente  $10^{-5}$ .

Las condiciones de temperatura y pH para la infección por virus pueden variar. La temperatura puede variar de 32°C a 39°C dependiendo del tipo de virus. Para la producción de virus de la gripe, la infección del cultivo celular puede variar dependiendo de la cepa que se produce. La infección por el virus de la gripe puede ser realizada de manera adecuada a una temperatura que varía de 32°C a 35°C, de manera adecuada a 33°C. En un aspecto de la divulgación, la infección por el virus puede ocurrir a 33°C. En un aspecto distinto de la divulgación, la infección por el virus puede tener lugar a 35°C. Las proteasas, típicamente tripsina, pueden ser añadidas al cultivo celular dependiendo de la cepa del virus, para permitir la replicación viral. La proteasa puede ser añadida en cualquier etapa adecuada durante el cultivo. La tripsina es preferiblemente de origen no animal, es decir, la proteasa no es purificada a partir de una fuente animal. Es produce adecuadamente de manera recombinante en un microorganismo, tal como bacteria, levadura o planta. Los ejemplos adecuados de tripsina recombinante son Trypzean, una tripsina recombinante producida en maíz (Prodigen, 101 Gateway Blvd, Suite 100 College Station, Texas 77845. Código del fabricante: TRY), o TrpLE (Invitrogen), que es una enzima similar a tripsina expresada en hongos (WO2004/020612).

Una vez infectadas, las células pueden liberar al medio de cultivo partículas de virus recién formadas, debido a una lisis espontánea de las células huésped, denominada también lisis pasiva. Por lo tanto, en un aspecto de la divulgación, puede proporcionarse una cosecha de virus basado en células en cualquier momento después de la inoculación del virus mediante la recogida de medio de cultivo celular o sobrenadante. En un aspecto de la divulgación, el medio de cultivo celular puede ser recogido mediante perfusión. Este modo de cosecha es especialmente adecuado cuando se desea recolectar virus derivado de células en diferentes puntos temporales después de la inoculación del virus, y combinar

diferentes cosechas, si es necesario.

De manera alternativa, después de la infección por virus, el virus basado en células puede ser cosechado empleando un factor externo para lisar las células huésped, denominado también lisis activa. Sin embargo, contrariamente al procedimiento anterior, dicho un modo de cosecha requiere que la cosecha viral basada en células sea recogida en un solo punto temporal, ya que una lisis activa de las células terminará inmediatamente el cultivo celular.

Se conocen procedimientos que pueden ser usados para la lisis celular activa. Los procedimientos útiles en este sentido son, por ejemplo, congelación-descongelación, cizalladura sólida, lisis hipertónica y/o hipotónica, cizalladura líquida, extrusión a alta presión, lisis con detergente o cualquier combinación de los mismos.

En un aspecto de la divulgación, puede proporcionarse una cosecha viral basada en células en cualquier momento después de la inoculación del virus recogiendo el medio de cultivo celular o sobrenadante, lisando las células inoculadas o ambos.

Antes de la cosecha, la infección de células puede durar de 2 a 10 días. En un aspecto de la divulgación, los sobrenadantes de cultivo de los días 3, 4 y 5 después de la inoculación pueden ser cosechados y agrupados para su procesamiento posterior adicional (aislamiento del virus). En un aspecto distinto de la divulgación, el sobrenadante del cultivo celular puede ser recogido de día 5 después de la inoculación. El momento óptimo para cosechar el virus producido por células se basa normalmente en la determinación del pico de la infección. Por ejemplo, el CPE (efecto citopático) se mide supervisando los cambios morfológicos que ocurren en las células huésped después de la inoculación del virus, incluyendo redondeo, desorientación, hinchazón o contracción, muerte, desprendimiento celular de la superficie. La detección de un antígeno viral específico puede ser supervisada también mediante técnicas estándar de detección de proteínas, tales como un análisis Western-blot. A continuación, la cosecha puede ser recogida cuando se consigue el nivel de detección deseado. En el caso particular de virus de la gripe, el contenido de HA puede ser supervisado cualquier momento después de la inoculación de las células con el virus, mediante el ensayo de SRD (Wood, JM, et al. (1977). J. Biol. Estándar. 5, 237-247), que es una técnica familiar para una persona con conocimientos en la materia. Además, el ensayo SRD puede ser usado también para determinar el intervalo de densidad celular óptimo requerido para obtener un rendimiento vírico optimizado.

En el contexto de la presente divulgación, debe entenderse que la fase de cultivo celular abarca cualquier etapa que precede a la etapa de cosecha de virus, mientras que debe entenderse que la fase de purificación de virus abarca cualquier etapa después de dicha etapa de cosecha. Por ejemplo, la fase de purificación de virus de los virus basados en cultivo de células puede incluir una serie de diferentes etapas de filtración, concentración y/u otras etapas de separación tales como ultrafiltración, ultracentrifugación (incluyendo ultracentrifugación en gradiente), cromatografía (tal como cromatografía de intercambio iónico) y etapas de adsorción en una diversidad de combinaciones. El procedimiento de inactivación de virus de la presente invención puede estar asociado convenientemente con cualquier procedimiento de purificación de virus mediante la implementación de la inactivación química y la etapa de irradiación UV en cualquier etapa adecuada.

En una realización, el procedimiento de inactivación de la invención comprende al menos una etapa adicional seleccionada del grupo de: clarificación, mediante centrifugación o filtración, ultrafiltración/diafiltración, degradación ácidos nucleicos, ultracentrifugación, en particular, ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y cromatografía, o cualquier combinación de los mismos.

De manera adecuada, puede implementarse una combinación de tratamiento BPL e irradiación UV, en cualquier orden, después de cualquiera de las etapas anteriores. A modo de ejemplo, puede implementarse un tratamiento BPL al principio de un procedimiento de purificación de virus, en particular, después de la clarificación de la cosecha viral obtenida recogiendo el medio de cultivo celular que contiene el virus. Este tratamiento puede ser seguido inmediatamente por irradiación UV. De manera alternativa, el tratamiento BPL y la irradiación UV pueden estar separados por otras etapas de purificación. La implementación de una primera etapa de inactivación de virus tan temprana en el procedimiento, es decir, en la cosecha clarificada, proporciona, en particular, una ventaja de seguridad en lo que se refiere a los trabajadores. De hecho, debido a que el virus del fluido que tiene que ser purificado es inactivo y de esta manera, no es infeccioso, al principio del procedimiento, los trabajadores están protegidos de una posible infección por el virus. Sin embargo, una etapa tan temprana para la inactivación proporciona también el inconveniente de tener que lidiar con grandes volúmenes. Por lo tanto, el coste asociado con la etapa de inactivación, en particular, la etapa BPL, podría ser bastante significativo, debido al gran volumen de la suspensión de virus a ser inactivada. Por consiguiente, los presentes inventores ensayaron también si una inactivación más tardía del virus en el procedimiento de purificación, tal como, por ejemplo, después de ultrafiltración y la concentración de la cosecha clarificada y/o después de una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa todavía proporcionaría buenos resultados de inactivación. Observaron que la implementación de las etapas de inactivación BPL y UV sobre una suspensión de virus purificado proporcionó resultados de inactivación, al menos tan buenos como cuando la inactivación es implementada antes de purificar el virus y, posiblemente, mejores.

En un aspecto de la divulgación, el medio de cultivo celular que contiene virus de la gripe producido en células MDCK de mamíferos o células EB66<sup>®</sup> aviares, puede ser sucesivamente, clarificado mediante filtración o mediante centrifugación, inactivado mediante un tratamiento de BPL, concentrado se ultrafiltración y sometido a irradiación UV.

5 De manera alternativa, el tratamiento BPL puede ser implementado después de que la cosecha de virus clarificada ha sido concentrada, por ejemplo mediante ultrafiltración. La concentración de la cosecha de virus primero permite usar menos cantidad de BPL, lo cual no sólo representa una ventaja de costes, tal como se ha indicado anteriormente, sino que permite también que los manipuladores manipulen menores cantidades de BPL. La irradiación UV puede ocurrir inmediatamente después del tratamiento BPL, o más tarde, después de etapas de purificación adicionales implementadas después de dicho tratamiento BPL.

10 Después de la inactivación, el virus obtenido puede ser purificado adicionalmente. Por consiguiente, el medio de cultivo celular que contiene virus de la gripe, que ha sido sometido, sucesivamente, a clarificación mediante centrifugación y/o filtración, inactivación mediante un tratamiento de BPL, concentración mediante ultrafiltración y a irradiación UV puede ser sometido además a una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

15 De manera alternativa, las etapas de inactivación según la presente invención pueden ocurrir más tarde en el procedimiento de purificación. Por ejemplo, la cosecha de virus puede ser pre-clarificada mediante centrifugación, clarificada mediante microfiltración, sometida a ultrafiltración y a concentración, y sometida a una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. A continuación, las fracciones que contienen el virus completo recogidas de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa son sometidas a inactivación. En un aspecto de la divulgación, primero puede realizarse una irradiación UV en un intervalo de 50 a 200 J/m<sup>2</sup> sobre las fracciones y, a continuación, puede añadirse BPL, en particular, BPL al 0,05%, a las fracciones de virus recogidas irradiadas. La BPL puede dejarse reposar durante la noche, en particular entre 12 a 16 horas a temperatura ambiente. En un aspecto distinto de la divulgación, primero puede añadirse BPL directamente a las fracciones de virus recogidas, en particular, BPL al 0,05%, y puede dejarse reposar al menos durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la suspensión de virus tratada con BPL puede ser sometida a irradiación UV, tal como por ejemplo UV 100 J/m<sup>2</sup>. Aunque la sacarosa residual presente dentro de las fracciones de virus recogidas podría tener un impacto sobre la eficacia de BPL en la inactivación del virus, debido a su efecto estabilizador conocido en los virus, los presentes inventores observaron sorprendentemente que la sacarosa residual, si la hay, dentro de un fluido que contiene un virus a ser inactivado no afectó el efecto de inactivación producido por BPL. Por lo tanto, el procedimiento de inactivación de la presente invención basado en la combinación de tratamiento BPL e irradiación UV, tiene una amplia aplicación en las etapas de inactivación que pueden ser implementadas en diferentes etapas de la producción y la purificación de virus de la gripe, incluyendo inmediatamente después de una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

35 El procedimiento de inactivación del virus según se describe en la presente memoria, puede estar asociado también con una etapa adicional para degradar el ADN contaminante residual desde el huésped que produjo el virus. Por ejemplo, una etapa de degradación de ADN con una nucleasa, tal como, pero sin limitarse a, Benzonase<sup>™</sup>, puede ser implementada, además de la combinación de una inactivación química e irradiación UV.

40 El procedimiento según la presente invención contempla además una posible etapa de división. Por ejemplo, puede ser posible combinar una etapa de purificación, tal como ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, con una etapa de división de virus. En particular, puede añadirse un agente de escisión al gradiente de sacarosa. Esto es particularmente adecuado, cuando se desea minimizar el número total de etapas del procedimiento de la invención, ya que permite, dentro de una única operación, purificar y dividir el virus. Por lo tanto, en un aspecto de la divulgación, cuando se implementa al menos una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, el gradiente de sacarosa puede comprender además un agente de división.

De manera alternativa, la etapa de división de virus del procedimiento de la presente invención puede ser realizada por lotes.

45 Los procedimientos de división de virus, tal como el virus de la gripe, son bien conocidos en la técnica (documento WO02/28422). La división del virus puede realizarse alterando o fragmentando el virus completo tanto si es infeccioso (de tipo salvaje o atenuado) como si no es infeccioso (inactivado) con una concentración de alteración de un agente separador. Los agentes de división incluyen generalmente agentes capaces de romper y disolver las membranas lipídicas. Tradicionalmente, la división del virus de la gripe se ha producido usando un tratamiento con disolvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butilo o dietiléter en combinación con Tween<sup>™</sup> (conocido como división "Tween-éter") y este procedimiento se usa todavía en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de división empleados en la actualidad incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo, desoxicolato sódico. Los detergentes que pueden usarse como agentes de división incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, lauril sulfato de sodio (SLS), taurodesoxicolato o detergentes no iónicos tales como Tween<sup>™</sup> o Triton X-100 o combinaciones de dos o más detergentes cualquiera.

En un aspecto de la divulgación, el agente de división puede ser desoxicolato. En otro aspecto de la divulgación, el agente de división puede ser Triton X-100. Triton X-100 puede ser usado adecuadamente a una concentración que varía del 0,5% al 3%, en particular, del 1% al 2%. En un aspecto adicional de la divulgación, el procedimiento descrito en la presente memoria puede usar una combinación de Triton X-100 y lauril sulfato de sodio como agentes de división. En un aspecto de la divulgación, después de un tratamiento BPL y una irradiación UV, en cualquier orden, el fluido que contiene el virus, tal como un fluido que contienen virus de la gripe, puede ser dividido en lotes con Triton X-100, en particular Triton X-100 al 2%.

El procedimiento de separación puede llevarse a cabo como un procedimiento por lotes, continuo o semi-continuo. Cuando se implementa por lotes, el virus dividido puede requerir una etapa adicional de purificación para eliminar el detergente, tal como una etapa de cromatografía.

En un aspecto de la divulgación, la cosecha vírica puede ser clarificada, mediante centrifugación y/o filtración, opcionalmente concentrada mediante ultrafiltración, purificada mediante una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, inactivada mediante un tratamiento de BPL y una etapa de irradiación UV, secuencialmente, en cualquier orden, y el fluido de virus inactivado puede ser dividido en lotes mediante la adición de un detergente, adecuadamente Triton X-100.

Las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación, incluyendo las vacunas, pueden contener opcionalmente los aditivos habituales para las vacunas, en particular, sustancias que aumentan la respuesta inmune provocada en un paciente que recibe la composición, es decir, los denominados adyuvantes.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones inmunogénicas pueden comprender un virus o un antígeno viral del mismo obtenibles según la presente invención mezclados con un vehículo farmacéutico adecuado. En un aspecto de la divulgación, pueden comprender además un adyuvante.

Las composiciones adyuvantes pueden comprender una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable y un agente emulsionante. Con el propósito de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para la administración humana, la fase oleosa del sistema de emulsión debe comprender un aceite metabolizable. El significado de la expresión aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable puede definirse como "que es capaz de ser transformado por el metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no es tóxico para el receptor y es capaz de ser transformado por el metabolismo. Los frutos secos, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos son también parte de la presente divulgación y pueden incluir aceites disponibles comercialmente, tales como NEOBEE® y otros.

Un aceite metabolizable particularmente adecuado es el escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en cantidades más bajas en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura, y es un aceite particularmente preferido. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis de colesterol (Índice Merck, 10ª Edición, no. Entrada 8619). En un aspecto adicional de la divulgación, el aceite metabolizable puede estar presente en la composición inmunogénica en una cantidad del 0,5% al 10% (v/v) del volumen total de la composición.

La emulsión de aceite en agua puede comprender además un agente emulsionante. El agente emulsionante puede ser adecuadamente monooleato de polioxietileno sorbitán. Además, dicho agente emulsionante puede estar presente adecuadamente en la vacuna o composición inmunogénica del 0,125 al 4% (v/v) del volumen total de la composición.

La emulsión de aceite en agua de la presente divulgación puede comprender opcionalmente un tocol. Los tocoles son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento EP0382271. De manera adecuada, es posible que un tocol sea alfa-tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol (conocido también como succinato de vitamina E). De manera adecuada, dicho tocol puede estar presente en la composición adyuvante en una cantidad del 0,25% al 10% (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica.

El procedimiento de producción de emulsiones de aceite en agua es bien conocido por la persona con conocimientos en la materia. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa (que comprende opcionalmente un tocol) con un tensioactivo tal como una solución de PBS/Tween80™, seguido de homogeneización usando un homogeneizador, es evidente para una persona con conocimientos en la materia que un procedimiento que comprende hacer pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsificación en microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo 50 pases, durante un período de 2 minutos a la presión de entrada máxima de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar)) podría ser adaptado por la persona con conocimientos en la materia para producir volúmenes de emulsión más pequeños o más grandes. La adaptación podría conseguirse mediante experimentación rutinaria que comprende la

medición de la emulsión resultante hasta que se consigue una preparación con gotitas de aceite del diámetro requerido.

En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante están en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

5 En particular, los sistemas de emulsión de aceite en agua de la presente divulgación pueden tener un tamaño de gotitas de aceite pequeño en el rango sub-micrométrico. De manera adecuada, los tamaños de gota pueden estar comprendidos en el rango de 120 a 750 nm, más particularmente tamaños de 120 a 600 nm de diámetro. Todavía más particularmente, la emulsión de aceite en agua puede contener gotitas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad tienen menos de 500 nm de diámetro, más particularmente al menos el 80% en intensidad son de menos de 300 nm de diámetro, más especialmente al menos el 90% en intensidad está comprendido en el intervalo de 120 a 200 nm de diámetro.

10 El tamaño de las gotitas de aceite, es decir, el diámetro, según la presente divulgación se proporciona por medio de la intensidad. Hay diversas maneras de determinar el diámetro del tamaño de la gotita de aceite por la intensidad. La intensidad se mide usando un instrumento calibrador, de manera adecuada mediante dispersión de luz dinámica tal como el dispositivo Malvern Zetasizer 4000 o de manera adecuada el dispositivo Malvern Zetasizer 3000HS. Un procedimiento detallado se proporciona en el Ejemplo II. 2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro medio  $\bar{z}$  ZAD mediante dispersión de luz dinámica (espectroscopia de correlación de fotones, PCS); este procedimiento, proporciona además dar el índice de polidispersidad (PDI), y tanto el ZAD como el PDI se calculan con el algoritmo de cumulantes. Estos valores no requieren el conocimiento del índice de refracción de las partículas. Un segundo medio consiste en calcular el diámetro de la gotita de aceite mediante la determinación de toda la distribución de tamaños de partícula mediante otro algoritmo, el Contin o NNLS o el algoritmo "Malvern" automático (el algoritmo por defecto proporciona por el instrumento calibrador).  
15 La mayor parte del tiempo, debido a que el índice de refracción de las partículas de una composición compleja es desconocido, solamente solo se tiene en cuenta la distribución de intensidad y, si es necesario, la intensidad media originada a partir de esta distribución.

20 Las composiciones adyuvantes pueden comprender además un agonista receptor de tipo Toll 4 (TLR). "Agonista TLR4" hace referencia a un componente que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de una vía de señalización TLR4, bien como un ligando directo o bien indirectamente a través de la generación de un ligando endógeno o exógeno (Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). El TLR 4 puede ser un derivado de lípido A, particularmente monofosforil lípidos A o más particularmente monofosforil lípido A 3 desacilado (3 D - MPL).

30 3D-MPL está disponible bajo la marca comercial MPL<sup>®</sup> en GlaxoSmithKline Biologicals América del Norte y promueve principalmente respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Puede ser producido según los procedimientos divulgados en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente, es una mezcla de monofosforil lípido A 3 desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En particular, en las composiciones adyuvantes de la presente divulgación se usa la pequeña partícula 3 D- MPL. La pequeña partícula 3 D -MPL tiene un tamaño de partícula tal que puede ser esterilizada mediante filtración a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m. Dichas preparaciones se describen en la solicitud de patente internacional No. WO 94/21292. Los derivados sintéticos de lípido A son conocidos y se cree que son agonistas de TLR 4 incluyendo, pero sin limitarse a:

**OM174** (2-deoxi-6-o-[2-deoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono- $\beta$ -D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- $\alpha$ -D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (WO 95/14026)

**OM 294** DP (3S, 9 R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoil amino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (WO99/64301 y WO 00/0462)

40 **OM 197** MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoil amino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (WO 01/46127)

45 Otros ligandos de TLR4 que pueden usarse son fosfatos de alquil glucosaminida (AGPs), tales como los descritos en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se divulgan procedimientos de preparación de AGPs), o sales farmacéuticamente aceptables de AGPs, tal como se divulga en el documento US6764840. Algunos AGPs son agonistas de TLR4 y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes. Además, en los documentos US2003/0153532 y US2205/0164988 se divulgan agonistas de TLR-4 adicionales.

50 La invención es particularmente adecuada para preparar composiciones inmunogénicas de virus de la gripe, incluyendo vacunas. Actualmente, hay disponibles diversas formas de virus de la gripe. Generalmente, se basan en virus vivo o virus inactivado. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones divididos o antígenos de superficie purificados (incluyendo HA). Los antígenos de la gripe pueden presentarse también en forma de virosomas (partícula liposomal similar a virus sin ácido nucleico).

Las cepas de virus de la gripe para uso en vacunas cambian de estación a estación. En el período interpandémico actual, típicamente las vacunas incluyen dos cepas de la gripe A y una cepa de la gripe B. Las vacunas trivalentes son típicas,

5 pero en la presente divulgación se describen también valencias superiores, tales como una vacuna tetravalente. La presente divulgación puede usar también HA de cepas pandémicas (es decir, cepas a las que el receptor de la vacuna y la población humana en general son inmunológicamente desprotegidos), y las vacunas contra la gripe para cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal, complementada por una cepa pandémica.

Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir antígeno o antígenos de una o más cepas de virus de la gripe, incluyendo virus de la gripe A y/o virus de la gripe B. En particular, en la presente divulgación, se describe una vacuna trivalente que incluye antígenos de dos cepas de virus de la gripe A y una cepa de virus de la gripe B.

10 Las composiciones de la divulgación no se limitan a composiciones monovalentes, es decir, que incluyen solo un tipo de cepa, es decir, sólo las cepas estacionales o sólo cepas pandémicas. La divulgación se refiere también a composiciones multivalentes que comprenden una combinación de cepas estacionales y/o cepas pandémicas. En particular, en la presente divulgación se describe también una composición tetravalente, que puede ser adyuvada, que comprende tres cepas estacionales y una cepa pandémica. Otras composiciones descritas en la presente divulgación son una composición trivalente que comprende dos cepas A y una cepa B, tales como las cepas H1N1, H3N2 y B, y una composición tetravalente que comprende dos cepas A y dos B cepas de un linaje diferente, tales como H1N1, H3N2, B/Victoria y B/Yamagata.

20 HA es el inmunógeno principal en las vacunas antigripales inactivadas actuales, y las dosis de vacuna están estandarizadas en función de los niveles de HA, típicamente medidos mediante SRD. Típicamente, las vacunas existentes contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque pueden usarse dosis más bajas, por ejemplo, para los niños, o en situaciones de pandemia, o cuando se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionadas, tales como un medio (es decir, 7,5 g de HA por cepa) o un cuarto, así como dosis más altas, en particular, dosis 3x o 9x. De esta manera, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, particularmente, entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Las dosis particulares incluyen aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5 y aproximadamente 5 µg por cepa.

Una vez purificado un virus de la gripe para una cepa particular, puede ser combinado con virus de otras cepas para preparar una vacuna trivalente, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente. Es más adecuado tratar cada cepa por separado y mezclar graneles monovalentes para dar una mezcla multivalente final, en lugar de mezclar los virus y degradar el ADN y purificarlo a partir de una mezcla multivalente.

30 La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

**Ejemplo 1: Inactivación inducida por BPL del virus de la gripe producido en células MDCK (NCP124 - Cepa A Nueva Caledonia, NCP127 – Cepa A Nueva Caledonia, JP125 - Cepa B Jiangsu, JP128 - Cepa B Jiangsu, NCP134 – Cepa A Nueva Caledonia y JP129 - Cepa B Jiangsu)**

35 Las células adherentes MDCK se cultivaron sobre microportadores en un modo de cultivo de perfusión a 36,5°C. Después de la fase de crecimiento, una vez alcanzada la densidad celular apropiada (en el intervalo de  $4,5 \times 10^6$  células/ml a  $7,5 \times 10^6$  células/ml), las células se inocularon con cepas diferentes de virus de la gripe (multiplicidad de infección de  $1 \times 10^{-5}$ ) en un modo de perfusión y la temperatura se cambió a 33°C. El virus fue cosechado mediante perfusión unos pocos días más tarde. Las cosechas mediante perfusión se agruparon y la cosecha de virus completo fue:

40 a) clarificada en un tren de filtración compuesto por tres filtros de profundidad diferentes con las siguientes porosidades nominales: 5 µm - 0,5 µm - 0,2 µm. En el experimento NCP127, se añadió Tween 80 a la cosecha viral a una concentración final del 0,02% antes de la clarificación.

45 b) a continuación, las cosechas clarificadas se concentraron 10 veces (NCP124), 20 veces (JP128) o 30 veces (NCP127, JP125, NCP134 y JP129) mediante ultrafiltración con una membrana de fibra hueca de 750 kD, para obtener un volumen final de aproximadamente 2 litros, diafiltrado contra 5 volúmenes de PBS que contenían citrato 125 mM y 0,01% de Triton X-100 y contra 4 volúmenes de Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 µM, 0,01% de Triton X-100,

50 c) las fracciones retenidas se retiraron del sistema de ultrafiltración y se calentaron hasta 37°C en un baño de agua. La degradación del ADN se realizó mediante la adición de Benzonase™ (Merck) a las fracciones retenidas a una concentración final de 100 unidades/ml (NCP124), 200 unidades/ml (JP125, NCP134 y JP129) o 135 unidades/ml (NCP127 y JP128) y la mezcla se incubó 1 hora a 37°C.

d) en los experimentos JP128 y JP129 solo, las fracciones retenidas tratadas con Benzonase™ se homogeneizaron mediante homogeneización a alta presión a 1.000 bares.

e) a continuación, las fracciones retenidas de la ultrafiltración (homogeneizadas o no) se sometieron a una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (0-55%), en la que virus y los contaminantes migran en el gradiente hasta que llegan a su densidad respectiva. Una vez cargadas todas las fracciones retenidas en el gradiente, un tiempo de formación de bandas de 60 minutos permitió que la mayor parte del virus llegara a su densidad en el gradiente. Las partículas virales se concentraron dentro de unas pocas fracciones. Las fracciones del producto están en PBS pH 7,4 que contiene citrato y sacarosa 125 mM. El virión entero purificado se agrupó a partir del porcentaje de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 26 al 51%. Este rango se ha determinado en base a los perfiles de SDS-PAGE y de análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-HA y anti-MDCK. Las fracciones agrupadas de virión entero se almacenaron a una temperatura comprendida entre 4°C a 8°C.

f) se realizó una segunda ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5-55%) para purificar adicionalmente el virus, al mismo tiempo que se dividía. Se añadió 2% de Triton X-100 - 0,5 mM de hidrógeno succinato de alfa-tocoferilo (NCP127, JP125, JP128, NCP134 y JP129) o 1,5% de Triton X-100 - 1% de lauril sarcosinato de sodio - 0,5 mM de hidrógeno succinato de alfa-tocoferilo (NCP124) a las capas de sacarosa para conseguir una barrera de micelas de detergente. El virus entero que entró en esta barrera de detergente fue dividido. Los fragmentos de virus que contenían las proteínas de membrana viral hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) migraron a la densidad de las micelas. Los viriones restantes, algunos de los contaminantes de proteínas de la célula huésped y el ADN migran a las fracciones de concentración de sacarosa superiores que no se agruparon con las proteínas virales. Se agruparon las proteínas virales presentes en las fracciones que van desde aproximadamente el 13 al 55% de sacarosa. Esta gama se ha determinado en base a perfiles de SDS-PAGE y de análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-HA y anti-MDCK. La colección de fracciones que contenían las proteínas virales estaba en PBS pH 7,4. A continuación, esta colección se ensayó para determinar el contenido total de proteínas y se diluyó a 250 µg de proteína/ml con PBS que contenía 0,01% de Tween 80 - 0,3% de Triton X-100 - hidrógeno succinato de alfa-tocoferilo 0,1 mM pH 7,4.

Se implementó al menos una etapa de inactivación de virus con BPL durante el procedimiento descrito anteriormente, tal como se indica a continuación:

- En el experimento NCP124, se añadió BPL después de la clarificación de la etapa a) a concentraciones variables: 0,02, 0,04, 0,05, 0,06 y 0,1% y se incubó durante la noche a 4°C.
- En el experimento JP125, se añadió BPL después de la primera ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la etapa d) a las fracciones que contienen viriones enteros recogidos y agrupados a una concentración del 0,1% y se incubó durante la noche a 4°C.
- En el experimento NCP127, se añadió BPL después de que las fracciones retenidas obtenidas en la etapa b) se incubaron con Benzonase™ en la etapa c) a concentraciones variables: 0,02, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08 y 0,1% y se incubaron durante la noche a 4°C.
- En el experimento JP128, se añadió BPL en las mismas condiciones que JP125, excepto que se usaron concentraciones variables: 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 y 0,1%.
- En el experimento JP129, BPL se añadió BPL en las mismas condiciones que NCP127, excepto que las concentraciones usadas fueron: 0,03, 0,04 y 0,05%
- En el experimento NCP134, se añadió BPL en las mismas condiciones que NCP127, excepto que las concentraciones usadas fueron 0,05% y 0,1% y la incubación fue durante la noche a temperatura ambiente (RT).

La inactivación del virus se evaluó mediante la medición de la titulación viral mediante el ensayo TCID<sub>50</sub> (Tissue-Culture-Infectious-Dose). Al final de la incubación durante la noche, se recogió una muestra de cada condición BPL dentro de cada experimento para ensayar su capacidad de infección con el fin de evaluar la eficacia de la inactivación BPL. Se realizan una serie de diluciones sucesivas de las muestras a ensayar. Se inoculan 50 µl de cada dilución en 10 réplicas en una microplaca de 96 pocillos que contiene células MDCK, inoculándose 8 diluciones para cada muestra a ensayar. A continuación, las placas se incuban durante 5-7 días a 35°C, de manera que el virus, si es infeccioso, pueda replicarse en las células. La presencia de virus infecciosos en las células se detecta mediante supervisando el efecto citopático (CPE) en las células mediante microscopía. Se usa una suspensión de virus infeccioso como control positivo para demostrar la susceptibilidad celular y se usan cultivos no inoculados como control negativo. El número de pozos en los que se detecta CPE se anota para cada dilución como células infectadas y el título viral se calcula según el procedimiento de Reed y Muench (Reed, L. J. y Muench, H., 1938, The American Journal of Hygiene 27: 493-497). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1 y se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml. Los controles en los que no se añadió BPL (0) corresponden al valor de titulación evaluado en una muestra recogida de la cosecha del virus indicado antes de ser sometida a ninguna etapa de purificación.

Tabla 1 - Efecto de BPL sobre la titulación del virus de la gripe

	% BPL	Titulación log TCID <sub>50</sub> /ml
NCP124 (4°C)	0	8,93
	0,02	4,47
	0,04	≤ 1,8
	0,05	≤ 1,8
	0,06	≤ 1,8
	0,1	≤ 1,8
JP125	0	11,3
(4°C)	0,1	≤ 1,8
NCP127 (4°C)	0	8,87
	0,05	≤ 1,8
	0,02	3,75
	0,04	≤ 1,6
	0,06	≤ 1,8
	0,08	≤ 1,8
	0,1	≤ 1,8
JP128 (4°C)	0	10,13
	0,05	4,8
	0,04	4,8
	0,03	6,93
	0,02	7,93
	0,01	8,13
JP129 (4°C)	0	9,98
	0,03	3,86
	0,04	5,8
	0,05	4,8
NCP134 (RT)	0	9,02
	0,05	≤ 1,8
	0,1	≤ 1,8
RT: Temperatura ambiente		
1,8 es el límite de cuantificación del ensayo		

- Resultados-Conclusiones

La Tabla 1 indica que BPL, cuando se añade a un fluido de virus, es eficaz en la inactivación de virus, en comparación con los controles en los que no se añadió BPL. La mayoría de las concentraciones de BPL usadas resultó en un título viral igual o menor del límite de cuantificación del ensayo y permiten conseguir una reducción de titulación viral de aproximadamente 8 logs, en comparación con los controles en los que no se añadió BPL. El efecto inactivador de BPL se observa independientemente de la temperatura de incubación (4°C o RT). Se observó una infectividad residual en ciertos experimentos, ya que algunos títulos virales varían de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, y la reducción de título de virus varía entre 2 y 6 logs.

**Ejemplo 2: Inactivación inducida por UV del virus de la gripe producido en células MDCK (JP128 - Cepa B Jiangu)**

Las condiciones experimentales de cultivo de células de JP128 eran tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. La cosecha viral se clarificó, tal como se describe en la etapa a) del Ejemplo 1. Después de la clarificación, la cosecha viral clarificada es sometida a diferentes dosis de UV: 200, 300 y 400. La irradiación UV se llevó a cabo con un dispositivo de laboratorio UVivatec™ de Bayer Technical Services que comprende una lámpara UV-C de mercurio de baja presión de 254 nm y según las recomendaciones del fabricante. La dosis o fluencia UV es una función de la intensidad de la lámpara y de la densidad óptica (OD) de la muestra a irradiar medida a 254 nm. El valor de OD a 254 nm, así como el valor de la fluencia deseada, se introduce en una hoja de cálculo Master Calculation proporcionada por Bayer con el fin de calcular el caudal necesario para conseguir dicha fluencia. La Tabla 2 indica los parámetros usados para la irradiación UV con el dispositivo de laboratorio UVivatec™ en el experimento JP128.

**Tabla 2 – Parámetros**

	JP128		
UV 254 nm (OD)	2,58		
Fluencia (J/m <sup>2</sup> )	200	300	400
Caudal (l/h)	16,3	10,9	8,2

Después de someter las muestras a las diferentes dosis de irradiación UV, la inactivación de virus se evaluó midiendo la titulación viral mediante el ensayo TCID<sub>50</sub> tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se midió en la cosecha clarificada, es decir, antes de la irradiación (Fluencia 0), para obtener el título inicial del fluido de virus y después de la irradiación UV, para obtener el título residual del fluido de virus después de la irradiación. El efecto de inactivación UV se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral Log) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 3. Para evaluar si un tratamiento UV tiene un impacto sobre la antigenicidad del virus, la concentración de HA se determinó también después de cada tratamiento UV mediante SRD.

**Tabla 3 - Efecto de UV sobre la titulación del virus y el contenido de HA**

	JP128			
Fluencia (J/m <sup>2</sup> )	0	200	300	400
Log TCID <sub>50</sub> /ml	8,0	2,6	2,8	2,8
LVR	-	5,4	5,2	5,2
SRD (µg HA/ml)	11,3	11,2	8,7	11,7

- Resultados-Conclusiones

La Tabla 3 indica que la HA medida mediante SRD no se vio afectada por ninguna de las dosis de UV ensayadas. Se observó una disminución en el título de virus de 5,4 log para una fluencia tan baja como 200 J/m<sup>2</sup>. Ninguna de las dosis UV ensayadas proporcionó un título de virus igual o menor que la cuantificación del ensayo, lo que sugiere que la infectividad residual persistió después de la irradiación UV.

- Procedimiento SRD usado para medir el contenido de HA

Las placas de vidrio (12,4 a 10 cm) se revistieron con un gel de agarosa que contenía una concentración de suero HA antigripal recomendada por NIBSC. Una vez endurecido el gel, se introdujeron 72 pocillos de muestra (diámetro 3 mm) en la agarosa. Se cargaron 10 µl de diluciones apropiadas de la referencia y la muestra en los pocillos. Las placas se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25°C) en una cámara húmeda. A continuación, las placas se empaparon durante la noche con solución de NaCl y se lavaron brevemente en agua destilada. A continuación, el gel se prensó y se secó. Cuando estaban completamente secas, las placas se tiñeron en solución de Coomassie Brilliant Blue durante 10 minutos y se destiñeron dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que las zonas teñidas definidas claramente se hacen visibles. Después de secar las placas, se midió el diámetro de las zonas teñidas que rodean los pocillos de antígeno en dos direcciones en ángulos rectos. De manera alternativa, puede usarse equipo para medir la superficie. Se construyeron curvas de dosis-respuesta de diluciones de antígeno contra la superficie y se calcularon los resultados según los procedimientos de ensayo de relación de pendiente estándar (Finney, D. J. (1952). Statistical Methods in Biological Assay. London: Griffin, Quoted in: Wood, JM, et al (1977). J. Biol. Standard. 5, 237-247).

**Ejemplo 3: Inactivación del virus de la gripe producido en células MDCK inducida por una combinación de BPL y UV (MAP140 - Cepa B Malasia, WiP144 - Cepa A Wisconsin y SOP138 – Cepa A Solomon)**

Las células MDCK adherentes se cultivaron sobre microportadores en modo de cultivo de perfusión a 36,5°C. Después de la fase de crecimiento, una vez que se alcanzó la densidad celular apropiada (por encima de  $6 \times 10^8$  células/ml), las células se inocularon con virus de la gripe (multiplicidad de infección de  $1 \times 10^{-5}$ ) en el modo de perfusión y la temperatura se cambió a 33°C. El virus se cosechó mediante perfusión en el día 5 después de la inoculación. Las cosechas de perfusión se clarificaron tal como se ha descrito en la etapa a) del Ejemplo 1. Después de la clarificación, las cosechas de virus se sometieron a los siguientes tratamientos de inactivación que combinan rayos UV y BPL: se ensayaron dos dosis diferentes de UV (200 y 500 J/m<sup>2</sup>) y se combinaron con dos concentraciones BPL (0,05% y 0,1%) en cualquier combinación.

La irradiación UV se realizó tal como se ha descrito en el Ejemplo 2 con el mismo dispositivo de laboratorio UViviatec™ y siguiendo las recomendaciones del fabricante del mismo. Se añadió BPL durante la noche a 4°C. Los tratamientos UV y BPL eran secuenciales, realizándose la irradiación UV antes que la incubación con BPL.

Después de cada tratamiento de inactivación, tal como se indica en las tablas siguientes, se determinó la titulación del virus según el ensayo TCID<sub>50</sub>, como se ha descrito en el Ejemplo 1. La antigenicidad de HA se supervisó midiendo su contenido después de las etapas indicadas mediante el ensayo SRD, tal como se ha descrito en Ejemplo 2. Los resultados se presentan en la Tabla 4 (SOP138), la Tabla 5 (MAP140) y la Tabla 6 (WiP144). Los resultados de HA se presentan en forma de porcentajes a ser comparados con el valor de control 100% que representa la cantidad de HA total presente en el material de partida, es decir presente en la cosecha de virus antes de la clarificación (columnas HA), o bien con la cantidad de HA total presente antes de realizar la etapa indicada (columnas de la etapa de recuperación de HA).

**Tabla 4 - Efecto de UV/BPL sobre la titulación del virus y el contenido de HA**

<b>Cepa A Solomon - SOP1138</b>	<b>HA (%)</b>	<b>Log TCID50/ml</b>	<b>Etapas de recuperación de HA (%)</b>
<i>Cosecha clarificada</i>	93	10,02	93
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup></i>	80	≤ 0,8	86
<i>UV 500 J/m<sup>2</sup></i>	84	7,8	90
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,05%</i>	96	≤ 0,8	120
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,1%</i>	78	≤ 1,8	97
<i>UV 500 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,05%</i>	74	≤ 0,8	88
<i>UV 500 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,1%</i>	68	≤ 1,8	82
1,8 y 0,8 son los límites de cuantificación del ensayo			

**Tabla 5 - efecto de UV/BPL sobre la titulación del virus y el contenido de HA**

<b>Cepa B Malasia - MAP140</b>	<i>HA (%)</i>	<i>Log TCID50/ml</i>	<i>Etapas de recuperación de HA (%)</i>
<i>Cosecha clarificada</i>	102	9,02	102
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup></i>	76	8,12	75
<i>UV 500 J/m<sup>2</sup></i>	79	5,22	78
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,05%</i>	74	≤ 1,8	97
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,1%</i>	91	≤ 1,8	119
<i>UV 500 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,05%</i>	71	≤ 1,8	90
<i>UV 500 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,1%</i>	75	≤ 1,8	95
1,8 es el límite de cuantificación del ensayo			

**Tabla 6 – Efecto de UV/BPL sobre la titulación del virus y el contenido de HA**

<b>Cepa A Wisconsin - WiP144</b>	<i>HA (%)</i>	<i>Log TCID50/ml</i>	<i>Etapas de recuperación de HA (%)</i>
<i>Cosecha clarificada</i>	70	8,87	70
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup></i>	81	≤ 1,8	116
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup> – BPL 0,05%</i>	74	≤ 0,8	92
1,8 y 0,8 son los límites de cuantificación del ensayo			

## 5 - Resultados-Conclusiones

Se ha observado una reducción del título viral después del tratamiento UV para las 3 cepas de la gripe ensayadas. Esta reducción viral se ha completado mediante la acción BPL para conseguir un título de virus que es igual o menor que el límite de cuantificación. No se ha observado ningún impacto importante sobre la actividad antigénica de HA después de un tratamiento combinado de UV y BPL. Por lo tanto, la combinación de un tratamiento físico, tal como irradiación UV, y un tratamiento químico asegura la inactivación del virus de la gripe a lo largo del procedimiento de purificación y permite conseguir una inactivación de virus más completa, en comparación con la ejecución de cada etapa de manera individual.

**Ejemplo 4: Inactivación inducida por BPL del virus de la gripe producido en células EB66<sup>®</sup>**

Se cultivaron células 4.1 EB66<sup>®</sup> en suspensión en un modo por lotes. Se inocularon con H5N1 y el virus se cosechó recogiendo el medio de cultivo celular unos pocos días más tarde. La cosecha viral se clarificó usando un tren de filtración compuesto de tres filtros de profundidad diferentes con las siguientes porosidades nominales: 5 µm - 0,5 µm - 0,2 µm (EB66\_26, EB66\_28, EB66\_33 y EB66\_42) o mediante la combinación sucesiva de centrifugación a 4.500 g y de una filtración 0,2 µm (EB66\_29 y EB66\_30). Después de la clarificación, la cosecha viral clarificada se concentró 10 veces mediante ultrafiltración con un filtro de fibra hueca 750 kD y se diafiltró con una solución de PBS que contenía citrato 125 mM.

Se añadió BPL al 0,05% durante la noche a temperatura ambiente, antes de la etapa de ultrafiltración (EB66\_26, EB66\_28, EB66\_29, EB66\_30 y EB66\_31) o después de la ultrafiltración, es decir, BPL se añadió a los materiales retenidos obtenidos después de la ultrafiltración (EB66\_42 y EB66\_33). La titulación se midió según el ensayo TCID<sub>50</sub>, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se midió en la cosecha clarificada (Tabla 7) o en las fracciones retenidas después de la ultrafiltración (Tabla 8), para obtener el título inicial de la preparación de virus antes de que fuera inactivada, y después del tratamiento BPL, para obtener el título residual del fluido virus después de la inactivación. El efecto inactivador de BPL se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 7 y la Tabla 8 que muestran el efecto inactivador de BPL cuando se implementa antes de la etapa de ultrafiltración o después de la etapa de ultrafiltración,

respectivamente. Los títulos de virus se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml. La última columna representa la LVR media basada en 5 experimentos diferentes. Además, el contenido de HA se midió mediante SRD tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los resultados de HA se presentan en forma de porcentajes a ser comparados con el valor de control 100% que representa la cantidad total de HA presente antes de añadir BPL, es decir, presente en la cosecha clarificada.

5 **Tabla 7 - Efecto de BPL sobre la titulación del virus, cuando se añade BPL a la cosecha viral clarificada**

	EB66_26	EB66_28	EB66_29	EB66_30	EB66_31	LVR media
Cosecha clarificada (log TCID <sub>50</sub> /ml)	7,3	7,2	7,9	7,8	7,5	
BPL 0,05% (log TCID <sub>50</sub> /ml)	≤ 2,2	< 1,6	≤ 1,6	≤ 1,6	≤ 1,6	
LVR	≥ 5,1	≥ 5,6	≥ 6,3	≥ 6,2	≥ 5,9	≥ 5,8
Etapa de recuperación de HA (%)	118	100	97	130	106	
2,2 y 1,6 son los límites de cuantificación del ensayo						

**Tabla 8 - Efecto de BPL sobre la titulación del virus cuando se añade BPL a la cosecha viral clarificada concentrada**

	EB66_42	EB66_33
Fraciones retenidas UF (log TCID <sub>50</sub> /ml)	8,1	8,0
EPL 0,05% (log TCID <sub>50</sub> /ml)	≤ 2,2	3,4
LVR	≥ 5,9	4,6
* UF es para ultrafiltración		
2,2 es el límite de cuantificación del ensayo		

10 - Resultados-Conclusiones

La Tabla 7 indica que el tratamiento de la cosecha viral clarificada con BPL fue eficaz en la inactivación de los virus, en comparación con los controles en los que no se añadió BPL. BPL al 0,05% resultó en un título viral que es igual o menor que el límite de cuantificación del ensayo y permitió conseguir una LVR de aproximadamente 5,8 logs, en comparación con los controles en los que no se añadió BPL. La Tabla 8 muestra que el tratamiento de la cosecha viral clarificada después de ser concentrada mediante ultrafiltración con BPL al 0,05% proporciona un título, por una parte, igual o menor que el límite de cuantificación del ensayo (véase EB66\_42) y, por otra parte, mayor que el límite de cuantificación (véase EB66\_33 que muestra un nivel residual de virus infeccioso, ya que el título obtenido es superior al límite de cuantificación), que presenta una LVR ≥ 5,9 y de 4,6, respectivamente.

4.2 En un experimento separado, células EB66<sup>®</sup> se inocularon con H5N1 y el virus se cosechó unos pocos días más tarde recogiendo el medio de cultivo celular. La cosecha viral se clarificó mediante la combinación sucesiva de una centrifugación a 8. 500 rpm y una filtración 0,45 μm (EB66\_65 y 69). A continuación, la cosecha viral clarificada se concentró aproximadamente 10 veces mediante ultrafiltración y se diafiltró con una solución de PBS (EB66\_69) o una solución de PBS que contenía citrato 125 mM, pH 7,4. A continuación, las fracciones retenidas de la ultrafiltración se sometieron a una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (0-55%) tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. A continuación, las fracciones de virión reunidas se añadieron directamente con BPL al 0,05%. La titulación se midió según el ensayo TCID<sub>50</sub>, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se midió antes de añadir BPL, para obtener el título inicial del fluido con virus antes de ser inactivo, y después del tratamiento BPL, para obtener el título residual de la preparación de virus después de la inactivación. El efecto inactivador de BPL se ilustra mediante el cálculo de la LVR. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

30

**Tabla 9 - efecto BPL en la titulación del virus, cuando se añade a las fracciones BPL conjunto de viriones purificadas en gradiente de sacarosa.**

	EB66_65	EB66_69
Antes de adición de BPL al 0,05% (log TCID <sub>50</sub> /ml)	9,0	8,8
Después de adición de BPL al 0,05% (log TCID <sub>50</sub> /ml)	≤ 2,8	≤ 1,6
LVR	≥ 6,2	≥ 7,2
2,2 es el límite de cuantificación del ensayo		

- Resultados-Conclusiones

5 La Tabla 9 indica que BPL al 0,05% fue eficaz en la inactivación de los virus, permitiendo conseguir una LVR de más de 6 logs. Estos resultados indican que la implementación de un tratamiento de BPL inmediatamente después de una etapa de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa proporciona buenos resultados de inactivación, lo que sugiere que la sacarosa residual no afecta negativamente el efecto inactivador de BPL. La LVR conseguida en esas condiciones BPL es ligeramente superior a las obtenidas en las Tablas 7 y 8.

10 **Ejemplo 5: Inactivación inducida por UV de virus de la gripe producido en células EB66®**

Las células EB66® se cultivaron e infectaron con H5N1 tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. La cosecha viral se clarificó mediante una centrifugación a 4.500 g y una filtración en un filtro de 0,2 µm, sucesivamente. A continuación, la cosecha viral clarificada se concentró mediante ultrafiltración tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. No se añadió BPL en esos experimentos.

15 Después de la ultrafiltración, las fracciones retenidas se sometieron a un gama de irradiaciones UV (100 J/m<sup>2</sup>, 150 J/m<sup>2</sup> y 200 J/m<sup>2</sup>), tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, con el mismo dispositivo UVivotec™ Lab y siguiendo las mismas recomendaciones del fabricante. Después de la irradiación, la titulación del virus se determinó según el ensayo TCID<sub>50</sub>, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se midió antes de la irradiación UV en una muestra recogida de las fracciones retenidas de la ultrafiltración, para obtener el título inicial del fluido con virus, y después de la irradiación UV, para obtener el título residual del fluido con virus después de la inactivación. El efecto inactivador de UV se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 10. Los títulos de virus se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml.

**Tabla 10 - Efecto de UV sobre la titulación del virus, cuando la irradiación UV es implementado en la cosecha clarificada concentrada**

EB66_25	Log TCID <sub>50</sub> /ml	LVR
Fracciones retenidas UF*	7,8	
UV 100 J/m <sup>2</sup>	≤ 2,2	≥ 5,6
UV 150 J/m <sup>2</sup>	≤ 2,2	≥ 5,6
UV 200 J/m <sup>2</sup>	≤ 2,2	≥ 5,6
* UF es para ultracentrifugación, 2,2 es el límite de la cuantificación del ensayo		

25

- Resultados-Conclusiones

La Tabla 10 indica que una dosis UV de 100 a 200 J/m<sup>2</sup> era eficaz en la inactivación de virus de la gripe producido en células EB66®, ya que el título de virus era igual o menor del límite de cuantificación del ensayo.

**Ejemplo 6: Inactivación inducida por BPL y UV del virus de la gripe producido en células EB66®**

30 6.1 Las células EB66® se cultivaron e infectaron con H5N1 tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. La cosecha viral se clarificó mediante centrifugación a 10.500 rpm y microfiltración en un filtro de 0,45 µm, sucesivamente.

La cosecha clarificada se sometió de (i) un tratamiento con BPL al 0,01%, (ii) una irradiación UV 20 J/m<sup>2</sup>, o (iii) un tratamiento con BPL al 0,01% y una irradiación UV 60 J/m<sup>2</sup>. La BPL al 0,01% se dejó durante la noche a temperatura ambiente. La irradiación UV fue tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, usando el mismo dispositivo UVivatec™Lab y siguiendo las mismas recomendaciones del fabricante. En la condición (iii), la cosecha clarificada se trató primero con BPL al 0,01% durante la noche a temperatura ambiente y, a continuación, al día siguiente, se irradió con una dosis UV de 60 J/m<sup>2</sup>. La titulación del virus se determinó según el ensayo TCID<sub>50</sub>, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, antes de añadir la BPL o irradiar con UV, para obtener el título inicial del fluido con virus y después del tratamiento BPL y/o irradiación UV, para obtener el título residual del fluido con virus después de la inactivación. El efecto inactivador de BPL y/o UV se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 11. Los títulos de virus se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml.

**Tabla 11 - Efecto de BPL/UV sobre la titulación del virus, cuando se implementa sobre la cosecha clarificada**

	<i>Log TCID<sub>50</sub>/ml</i>	<i>LVR</i>
<i>Cosecha clarificada</i>	7,9	-
<i>BPL al 0,01%</i>	5,8	2,1
<i>UV 20 J/m<sup>2</sup></i>	5,4	2,5
<i>BPL al 0,01% UV 60 J/m<sup>2</sup></i>	≤ 2,2	≥ 5,7
<i>2,2 es el límite de la cuantificación del ensayo</i>		

- Resultados-Conclusiones

La Tabla 11 indica que BPL a una concentración del 0,01% inactiva parcialmente la cosecha clarificada que contiene gripe, ya que se midió una infectividad residual (LVR es de 2,1 log), mientras que la Tabla 9 proporcionó resultados en los que BPL al 0,05% permitió conseguir una inactivación de virus más completa, ya que el título obtenido era igual o menor que el límite de cuantificación del ensayo. Sin embargo, cuando se combinó la concentración subóptima de BPL al 0,01% con un etapa de irradiación UV 60 J/m<sup>2</sup>, entonces el título obtenido era igual o menor que el límite de cuantificación del ensayo, lo que sugiere que la combinación de un tratamiento físico, tal como UV, y un tratamiento químico, tal como BPL, asegura la inactivación del virus de la gripe a lo largo del procedimiento de purificación, permitiendo conseguir una inactivación más completa de los virus, limitando al mismo tiempo la cantidad de BPL que debe usarse para ese efecto.

6. 2 En un experimento separado, las células EB66<sup>®</sup> se cultivaron e infectaron con H5N1, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se recogió la cosecha viral y clarificó tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se añadió BPL al 0,05% durante la noche a temperatura ambiente a la cosecha viral clarificada. A continuación, la cosecha viral tratada con BPL se concentró 10 veces mediante ultrafiltración con un filtro de fibra hueca 750 kD y se diafiltró con una solución de PBS que contenía citrato 125 mM. Después de la concentración, la cosecha viral tratada con BPL se irradió con una dosis UV 200 J/m<sup>2</sup>. La titulación del virus se midió antes de añadir BPL en una muestra recogida de la cosecha clarificada indicada, para obtener el título inicial del fluido con virus, después de la adición de BPL, y después de la irradiación UV, para obtener el título residual de la preparación de virus después de la inactivación. El efecto inactivador de BPL y BPL/UV se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 13. Los títulos de virus se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml.

**Tabla 12 - Efecto de BPL/UV sobre la titulación del virus**

	<i>EB66_30</i>		<i>EB66_31</i>	
	<i>log TCID<sub>50</sub>/ml</i>	<i>LVR</i>	<i>log TCID<sub>50</sub>/ml</i>	<i>LVR</i>
<i>Cosecha clarificada</i>	7,8	-	7,5	-
<i>BPL al 0,05%</i>	≤ 1,6	≥ 6,2	≤ 1,6	≥ 5,9
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup></i>	≤ 1,6	≥ 6,2	≤ 1,6	≥ 5,9
<i>1,6 es el límite de la cuantificación del ensayo</i>				

- Resultados-Conclusiones

La adición de BPL a la cosecha de virus clarificada y la subsiguiente irradiación UV son eficaces en la inactivación de virus de la gripe, ya que dicha una combinación de tratamientos resulta en un título de virus que es igual o menor que el límite de cuantificación del ensayo.

5 **Ejemplo 7: Inactivación inducida por Triton X-100 del virus de la gripe producido en células EB66®**

10 Las células EB66® se cultivaron e infectaron con H5N1 tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. La cosecha viral se recogió, se clarificó y se concentró mediante ultrafiltración tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. No se añadió BPL, ni se implementó irradiación UV durante el procedimiento. A continuación, la cosecha viral concentrada se sometió a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (0-55%), en la que los virus y los contaminantes migraron al interior del gradiente hasta que llegaron a su densidad respectiva. Una vez cargadas todas las fracciones retenidas en el gradiente, un tiempo de formación de bandas de 60 minutos permitió que la mayor parte del virus llegara a su densidad dentro del gradiente. Las partículas virales se concentraron dentro de unas pocas fracciones. Las fracciones de producto estaban en PBS pH 7,4 que contenía citrato y sacarosa 125 mM. El virión entero purificado se agrupó a partir del porcentaje de sacarosa de aproximadamente el 30 al 48%. Este intervalo se ha determinado en base a los perfiles de SDS-PAGE y de un análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-HA y anti-MDCK. A continuación, las fracciones de virus entero agrupadas se concentraron mediante ultrafiltración con un filtro de fibra hueca 750 kD y se diafiltraron con una solución de PBS.

20 Se añadió Triton-X 100 al 2% a temperatura ambiente a las fracciones que contenían virus enteros recogidas y agrupadas después de la centrifugación en gradiente de sacarosa con el fin de dividir el virus. La titulación del virus se midió antes de la adición de Triton X-100, para obtener el título inicial del fluido con virus y en diferentes puntos de tiempo (tal como se indica en la Tabla 12) después de la adición de Triton X-100, para obtener el título residual de la preparación de virus después de la división. El efecto inactivador de Triton X-100 se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 13. Los títulos de virus se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml.

25 **Tabla 13 - Efecto de Triton X-100 sobre la titulación del virus**

	EB66_33		EB66_39	
<i>Triton X-100 al 2%</i>	<i>log TCID<sub>50</sub>/ml</i>	<i>LVR</i>	<i>log TCID<sub>50</sub>/ml</i>	<i>LVR</i>
<i>Fracciones retenidas UF</i>	8,4		8,8	
<i>t = 30 min</i>	5,2	3,2		
<i>t = 2 h</i>			5,0	3,8
* UF es para ultrafiltración				

- Resultados-Conclusiones

Triton X-100 al 2% es eficaz en la inactivación del virus de la gripe después de un tiempo de tratamiento tan corto como 30 minutos. Se observó una LVR de 3,2 logs y 3,8 logs después de 30 minutos y 2 horas de tratamiento, respectivamente.

30 **Ejemplo 8: Efecto acumulativo de inactivación inducida por BPL, UV y Triton X-100 del virus de la gripe producido en células EB66**

Con el fin de evaluar el efecto acumulativo de la implementación de las etapas BPL, UV y Triton X-100 dentro del mismo procedimiento, se sumaron las LVRs obtenidas en los Ejemplos 4, 5 y 7 para las etapas BPL, UV y Triton, individuales respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 14.

35 **Tabla 14 - Efecto acumulativo de BPL, UV y Triton X-100 sobre la titulación del virus**

	<i>LVR</i>
<i>BPL al 0,05%</i>	≥ 5,8*
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup></i>	≥ 5,6**

(Cont.)

<i>Triton X-100 al 2%</i>	3,8***
<i>LVR acumulativo</i>	≥ 15,2
* Este valor corresponde a la LVR media presentada en la Tabla 7, donde la BPL al 0,05% se añadió después de la clarificación	
** Este valor corresponde al valor presentado en la Tabla 10, donde UV se implementó sobre las fracciones retenidas de la UF	
*** Este valor corresponde al valor presentado en la Tabla 13, donde Triton-X100 se añadió durante 2 horas	

- Resultados-Conclusiones

5 La combinación de 3 etapas de inactivación individuales dentro del mismo procedimiento (BPL; UV y Triton X-100) resulta en una LVR superior a 15,2

**Ejemplo 9: Efecto acumulativo de la inactivación inducida por UV y BPL de virus adventicios**

10 El uso de células animales para la producción de gripe, en particular, para su inclusión en una vacuna, implica el cultivo de células en condiciones que son adecuadas para el crecimiento y la replicación viral. Por lo tanto, estas condiciones incrementan el riesgo de que otros patógenos distintos del virus de la gripe crezcan en el cultivo celular, conduciendo de esta manera a una contaminación potencial del producto final de la vacuna con virus adventicios. La preparación de virus obtenida según el procedimiento de la invención se ensayó contra 4 virus adventicios modelo: virus de la pseudorrabia porcina (PRV), el virus de la leucemia murina (MuLV), parvovirus porcino (PPV) y virus de la hepatitis A (HAV). Antes de proceder a la etapa de inactivación indicada (UV o BPL), los fluidos con virus de la gripe se enriquecieron con el virus adventicio indicado.

15 9.1 El virus de la gripe se produjo en células MDCK tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. El fluido con virus, se enriqueció por separado con MuLV y PPV. Se añadieron BPL al 0,05% y BPL al 0,1% durante la noche a temperatura ambiente a cada preparación de virus de la gripe enriquecida. La titulación se midió según el ensayo TCID<sub>50</sub>, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se midió antes de la adición de BPL, para obtener el título inicial del fluido con virus antes de que fuera inactivado, y después del tratamiento BPL, para obtener el título residual del fluido de virus después de la inactivación. El efecto inactivador de BPL se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Independientemente, la preparación de virus de la gripe enriquecida por separado con MuLV y PPV se irradió también con una dosis UV de 200 J/m<sup>2</sup>. La titulación se midió antes de la irradiación con UV, para obtener el título inicial de la preparación de virus antes de que fuera inactivada y después de la irradiación UV, para obtener el título residual de la preparación de virus después de la inactivación. El efecto inactivador de BPL y UV se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 15. Los títulos de virus se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml.

**Tabla 15 - Efecto de BPL y UV sobre la titulación del virus MuLV y PPV**

	<i>MuLV</i>		<i>PPV</i>	
	<i>log TCID<sub>50</sub>/ml</i>	<i>LVR</i>	<i>log TCID<sub>50</sub>/ml</i>	<i>LVR</i>
<i>Sin BPL</i>	6,0		8,1	
<i>BPL al 0,05%</i>	3,3	2,7	3,9	4,2
<i>Sin BPL</i>	6,5		8,1	
<i>BPL al 0,01%</i>	3,7	2,8	2,4	5,7
<i>Sin UV</i>	6,1		8,3	
<i>UV 200 J/m<sup>2</sup></i>	3,5	2,6	0,1	8,2

30 - Resultados-Conclusiones

El tratamiento BPL resultó en una reducción en el título de virus con respecto tanto a MuLV como a PPV a las dos concentraciones ensayadas. El tratamiento UV resultó también en una reducción en el título de virus tanto de MuLV como de PPV, con un efecto particularmente fuerte sobre PPV, ya que la LVR observada fue de 8,2 logs. El tratamiento de combinación de BPL y UV asegura el procedimiento de purificación de virus de la gripe producido en cultivo celular contra la contaminación con virus adventicios, en su caso, mediante la inactivación de dichos virus.

9.2 El virus de la gripe producido en células EB66<sup>®</sup> tal como se ha descrito en el Ejemplo 4 se enriqueció por separado con PPV, PRV, HAV y MuLV. Después del enriquecimiento, cada fluido con virus de la gripe se inactivó con BPL al 0,05% añadido durante la noche a temperatura ambiente o mediante irradiación UV con una dosis de 200 J/m<sup>2</sup>, tal como se indica en la Tabla 16. La titulación del virus se midió según el ensayo TCID<sub>50</sub>, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se midió antes de la adición de BPL o la irradiación con UV, para obtener el título inicial del fluido con virus antes de ser inactivado, y después del tratamiento BPL o después de la irradiación UV, para obtener el título residual del fluido de virus después de la inactivación. El efecto inactivador de BPL y UV se ilustra mediante el cálculo de la LVR (reducción viral logarítmica) que consiste en restar el título residual anterior del título inicial anterior. Los resultados se presentan en las Tablas 16 y 17. Los títulos de virus se expresan como log TCID<sub>50</sub>/ml.

**Tabla 16 - Efecto de BPL y UV sobre la titulación de virus MuLV y PPV**

	MuLV		PPV	
	log TCID <sub>50</sub> /ml	LVR	log TCID <sub>50</sub> /ml	LVR
Sin BPL	5,8		8,1	
BPL 0,05	4,2	1,6	6,0	2,1
Sin UV			8,2	
UV 200 J/m <sup>2</sup>		≤ 1	1,4	6,8

**Tabla 17 - Efecto de BPL y UV sobre la titulación de virus HAV y PRV**

	HAV		PRV	
	log TCID <sub>50</sub> /ml	LVR	log TCID <sub>50</sub> /ml	LVR
Sin BPL	5,3		6,0	
BPL al 0,05%	1,5	3,8	2,6	3,4
Sin UV	5,4			
UV 200 J/m <sup>2</sup>	≤ 1,4	≥ 4		3,67

- Resultados-Conclusiones

El tratamiento BPL resultó en una reducción del título de virus con respecto a todos los virus ensayados, MuLV, PPV, HAV y PRV. El tratamiento UV resultó en una reducción en el título de virus de PRV, VPP y HAV con un efecto particularmente fuerte sobre PPV, ya que la LVR observada fue de 6,8 logs. Por lo tanto, el tratamiento de combinación de BPL y UV asegura el procedimiento de purificación de virus de la gripe producido en cultivo celular contra la contaminación con virus adventicios, en su caso, mediante la inactivación de dichos virus.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de inactivación de un virus de la gripe propagado en cultivo celular y de inactivación de virus adventicios contaminantes, que comprende al menos las etapas siguientes:
  - (a) tratar un fluido que contiene virus de la gripe con beta-propiolactona, y
  - (b) irradiar el fluido que contiene virus de la gripe con luz UV.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) y (b) se realizan secuencialmente, en cualquier orden.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la beta-propiolactona se usa a una concentración que varía del 0,01% al 0,1%, o del 0,03% al 0,8%, o a una concentración del 0,05%.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosis de UV varía de 50 a 500 J/m<sup>2</sup>, de 100 a 400 J/m<sup>2</sup> o es de 200 J/m<sup>2</sup>, o es 100 J/m<sup>2</sup>.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además al menos una etapa de purificación de virus seleccionada del grupo que consiste en: clarificación, ultrafiltración, degradación de ácidos nucleicos, ultracentrifugación y cromatografía.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el virus se purifica mediante clarificación.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que las etapas (a) y (b) se implementan después de la clarificación.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 5 y 6, en el que el virus se purifica mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que las etapas (a) y (b) se implementan después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la etapa (a) se implementa antes de la etapa (b).
11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además una etapa de división.
12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11, en el que el virus de la gripe se propaga en células EB66<sup>®</sup>.
13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 12, en el que los virus adventicios se seleccionan entre: virus de la leucemia murina, virus de hepatitis A, parvovirus porcino, virus de la pseudorrabia porcina, o cualquier combinación de los mismos.
14. Un procedimiento de preparación de una vacuna que comprende un virus de la gripe propagado en cultivo celular que comprende las siguientes etapas:
  - (a) tratar un fluido que contiene virus de la gripe y virus adventicios contaminantes con beta-propiolactona,
  - (b) irradiar el fluido que contiene virus de la gripe y virus adventicios contaminantes con luz UV, y
  - (c) formular el virus de la gripe tratado con beta-propiolactona e irradiado con UV en una vacuna.