

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 040**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2014 PCT/EP2014/052870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14125053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2014 E 14706516 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2956167**

54 Título: **Métodos para la liberación de partículas similares a virus**

30 Prioridad:

15.02.2013 EP 13155370

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

17.03.2017

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**FACHINGER, VICKY y
SNO, MELANIE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 606 040 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

Métodos para la liberación de partículas similares a virus

5 La presente invención se refiere a métodos para liberar partículas similares a virus (VLP, del inglés *Virus-like Particles*), expresadas en baculovirus, de virus sin envoltura de células de insecto.

10 Hoy en día, la ciencia médica depende en gran medida de vacunas cuando se trata de combatir enfermedades infecciosas. Dichas vacunas pueden ser vacunas vivas atenuadas o vacunas inactivadas, las dos con sus propias ventajas y desventajas. Las vacunas vivas atenuadas imitan fielmente la infección natural y, por consiguiente, estimulan una respuesta inmunitaria que es comparable a la respuesta inmunitaria estimulada por la forma virulenta de un virus o microorganismo. Sin embargo, pueden producir algunos efectos secundarios indeseados y el nivel de atenuación es bastante crítico. Las vacunas inactivadas, por otra parte, son seguras, pero en algunos casos no son eficaces como sus homólogos vivos.

15 En el caso de vacunas víricas, un tercer tipo de vacuna está atrayendo cada vez más interés: las denominadas vacunas de partículas similares a virus (VLP). Las partículas similares a virus son partículas que morfológicamente se asemejan fielmente al virus natural. Comprenden todos los componentes inmunogénicos que se encuentran en el virus natural, y comprenden estos componentes en su organización y conformación natural. Sin embargo, difieren del virus natural en que no son capaces de producir virus de progenie infecciosa, ya que carecen de genoma vírico.

Como consecuencia, son una alternativa atractiva a las vacunas de virus tanto vivas atenuadas como inactivadas.

25 Las VLP se producen predominantemente en sistemas de células *in vitro*. Y en muchos casos se producen en un sistema de expresión de baculovirus/células de insecto. Estos sistemas tienen la ventaja de ser capaces de producir cantidades relativamente grandes de VLP.

30 Las proteínas expresadas en el sistema del vector de expresión de baculovirus (BEVS) pueden ser proteínas tanto secretadas como no secretadas. Esto implica que las VLP no secretadas deben liberarse primero desde las células de insecto antes de que se puedan purificar adicionalmente. Los métodos normalizados para la liberación de las VLP comprenden la congelación-descongelación, ultrasonido, métodos mecánicos a alta cizalla, métodos con perlas, "bomba celular", choque osmótico utilizando un medio hipotónico, uso de detergentes y métodos enzimáticos.

35 Se divulgan ejemplos de dichos métodos de la técnica anterior, por ejemplo, en Smith et al. 2009, Mol. Therapy 17(11), 1888-1896; publicación de solicitud internacional WO 03/068993; Millan et al. 2010, Prot. Expr. Purif. 74(1), 1-8; Loudon et al. 1991, Virology 182(2), 793-801; o Schneeman et al. 1993, J. Virol. 67(5), 2756-2763.

40 Sin embargo, todos estos métodos también dan como resultado inevitablemente una ruptura o una lisis celular y la liberación de todo el contenido de la célula: el ARN, el ADN, las proteínas, orgánulos celulares, desechos celulares, y en el caso de los sistemas basados en baculovirus también los baculovirus vivos en el medio que los rodea. Resulta evidente que la mayoría si no todos estos componentes han de eliminarse antes de que las VLP estén listas para su uso en una vacuna. El nivel requerido de purificación implica un proceso multietapa complejo que incluye muchos controles de calidad. Por lo tanto, existe una necesidad evidente de métodos para liberar las VLP no secretadas en el fluido del cultivo celular que evite la liberación simultánea del contenido completo del ácido nucleico y proteína de la célula.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos para la liberación de VLP que reduzcan o incluso eviten los problemas anteriormente mencionados.

50 Los métodos proporcionados en la presente invención son específicamente adecuados para la liberación de las VLP no secretadas de virus sin envoltura expresados en sistemas de vectores de expresión de baculovirus utilizando células de insecto.

55 Se ha descubierto ahora de forma sorprendente que, una vez que las células de insecto que comprenden una VLP sin envoltura se mezclan con una sal, de tal manera que la sal en la solución acuosa resultante de la mezcla comprenda al menos 300 mOsmol/l de una sal cuyo catión se selecciona entre el grupo que consiste en metales alcalinos y metales alcalinotérreos, y cuyo anión se selecciona entre el grupo que consiste en Cl⁻, Br⁻ o I⁻, las células liberan las VLP sin liberar su contenido celular completo. El método es especialmente adecuado para células de insecto cuando crecen exentas de transportador en suspensión.

60 Esto es, de hecho, un fenómeno muy sorprendente: el método de acuerdo con la presente invención deja aparentemente la mayoría de células intactas, como se puede observar, por ejemplo, en la figura 4 El mecanismo tras esta liberación de VLP es poco claro.

65 De esta manera, una primera realización de la presente invención se refiere a métodos para la liberación de partículas similares a virus (VLP) expresadas en baculovirus de virus sin envoltura procedentes de células de

insecto, caracterizada por que el método no incluye etapas de lisis o ruptura celular, y comprende la etapa de mezclar las células de insecto con una sal, en la que la sal en solución acuosa resultante de la mezcla comprende al menos 300 mOsmol/l de una sal cuyo catión se selecciona entre el grupo que consiste en metales alcalinos y metales alcalinotérreos, y cuyo anión se selecciona el anión entre el grupo que consiste en Cl⁻, Br⁻ e I⁻.

5 Para el fin de este método, se entiende que mezclar las células de insecto con una sal de tal manera que la sal en la solución acuosa resultante de la mezcla comprenda al menos 300 mOsmol/l de una sal cuyo catión se selecciona entre el grupo que consiste en metales alcalinos y metales alcalinotérreos, y cuyo anión se selecciona entre el grupo que consiste en Cl⁻, Br⁻ e I⁻ comprende la siguiente etapa: el fluido de cultivo celular (las células de insecto en el fluido que las rodea) se mezcla con una sal cuyo catión se selecciona entre el grupo que consiste en metales alcalinos y cuyo anión se selecciona entre el grupo que consiste en Cl⁻, Br⁻ e I⁻ en la medida que la solución salina resultante tras la mezcla comprenda al menos 300 mOsmol/l de la sal.

10 No hay que decir que la mezcla se puede llevar a cabo de diversas maneras; añadiendo, por ejemplo, sal en forma sólida al fluido de cultivo celular o mezclando una sal en una solución acuosa con el fluido de cultivo celular.

15 La sal de la solución acuosa que es el resultado de la mezcla, como se describe en la presente invención, puede por ejemplo comprender al menos 150 mM NaCl/l (esto proporciona a la sal en la solución acuosa una osmolaridad de al menos 300 mOsmol of NaCl/l). Si la solución salina como se describe en la presente invención se prepara sobre la base de MgCl₂, la sal en la solución acuosa resultante de la mezcla podría comprender al menos 100 mM MgCl₂/l (esto proporciona a la sal en la solución acuosa una osmolaridad de al menos 300 mOsmol de MgCl₂/l).

20 Los siguientes ejemplos sirven como mera ilustración; si 100 ml de un cultivo de células de insecto y medio de cultivo se mezclan con 100 ml de una solución 300 mM de NaCl/l, los 200 ml de fluido finales que resultan de esta acción comprenden 150 mM de NaCl/l. El volumen final de la solución salina no tiene, por supuesto relevancia para los efectos ventajosos del método de acuerdo con la invención. Si 75 ml de un cultivo de células de insecto que comprende células de insecto y medio de cultivo se mezclan con 25 ml de una solución 1200 mM de NaCl/l, los 100 ml finales de fluido que resultan de esta acción comprenden 300 mM de NaCl/l.

25 En la figura 1 se proporciona una visualización en gel del fenómeno inesperado de la invención. Como se puede observar a partir de la figura 1, las bandas que muestran el sobrenadante de las células después del tratamiento con el método de acuerdo con la invención que comprende las VLP liberadas están notablemente limpias (véase la sección de los ejemplos para los detalles).

30 Aunque, como anteriormente, el volumen final de la solución salina no es relevante para el método como tal, en la práctica, es útil introducir una etapa de concentración antes de someter el fluido del cultivo celular a la etapa de mezcla de acuerdo con la invención. El principal motivo para la etapa de concentración es que la producción de VLP para fines comerciales requiere volúmenes de cultivo celular relativamente grandes. No es eficaz recoger VLP directamente de estos grandes volúmenes; recoger VLP de un pequeño volumen requiere mucha menos manipulación.

35 El nivel de concentración en esta etapa no es crítico. La concentración del fluido de cultivo celular en un volumen que sea la mitad de la cantidad del volumen original del fluido de cultivo celular (es decir, hasta el 50 % del volumen original) proporcionaría ya una ventaja significativa en la facilidad de la recogida. Se prefiere una concentración adicional del 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o incluso 5 % en este orden de preferencia.

40 La concentración puede llevarse a cabo de muchas maneras, todas conocidas en la materia. Un método frecuentemente usado es la ultrafiltración, por ejemplo, en la forma de diálisis con flujo tangencial.

45 Otro método frecuentemente utilizado es la centrifugación de baja velocidad. La centrifugación de baja velocidad seguida por la eliminación de todo o parte del fluido de cultivo celular lleva a la concentración y finalmente la aglomeración de las células, pero las células seguirían estando intactas y seguirían estando rodeadas por una pequeña cantidad de fluido de cultivo. Dichos aglomerados celulares se pueden mezclar fácilmente con una sal en solución acuosa para obtener una sal en solución acuosa como se describe en la invención.

50 Por motivos prácticos, un método muy adecuado es simplificar el almacenamiento del cultivo celular que comprende las células y dejar que la gravedad lleve a las células hasta el fondo de un recipiente. Después de aproximadamente 1-18 horas, dependiendo del volumen de la recogida y el tamaño del recipiente, la mayoría de las células estarán presentes en el fondo con un 10% del fluido de cultivo celular, de tal forma que se puede descartar el 90% superior del fluido de cultivo celular. Este método evita la tarea de centrifugar y/o ultracentrifugar grandes volúmenes de fluido de cultivo celular. Las células que contienen VLP del 10% inferior del fluido de cultivo celular así obtenidas se pueden utilizar inmediatamente en la etapa de mezclar las células de insecto con una sal como se describe en la invención.

55 Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a un método de acuerdo con la invención, caracterizada por que la etapa de mezclar las células de insecto con una sal va precedida por una etapa de concentración en la que se concentran las células de insecto.

60 En un principio, se pueden usar en el método de acuerdo con la invención los cationes seleccionados entre metales alcalinos y metales alcalinotérreos. Sin embargo, existe una preferencia por cationes seleccionados entre el grupo que consiste de Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ y K⁺, porque son al mismo tiempo baratos y aceptables para usos medicinales. Por

lo tanto, otra forma preferida de esta realización de la presente invención se refiere a un método de acuerdo con la invención, caracterizada por que el catión se selecciona entre el grupo que consiste de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ .

5 Un anión preferido es Cl^- , porque las sales que tienen un catión Cl^- son baratas y son muy aceptables para usos medicinales. Por tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a un método de acuerdo con la invención, caracterizado por que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl , KCl , CaCl_2 y MgCl_2 .

10 El fluido de cultivo celular que comprende las células de insecto que contiene las VLP, comprende adicionalmente muchos componentes que son necesarios para cultivar las células. También comprende productos de desecho de las células. Estos productos son productos secundarios no deseados que pueden ser perjudiciales para la vacuna final que comprende las VLP. Dichos componentes se separan por tanto preferentemente de las células de insecto que comprenden las VLP antes de aplicar el método de acuerdo con la invención a las células. Esto se puede realizar aglomerando las células, descartando el sobrenadante y volviendo a suspender las células en una solución salina como se describe en la invención. Si esto se realiza cuidadosamente, la mayoría del sobrenadante se puede eliminar. En este caso, la sal de la solución acuosa resultante de la mezcla de las células y la sal consiste esencialmente de una sal como se describe en la invención, y agua. Esencialmente significa en el presente documento que la sal de la solución acuosa resultante de la mezcla comprende menos de un 10 % de fluido de cultivo celular. Preferentemente, la solución acuosa resultante de la mezcla comprende menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 4 % o incluso menos del 2 % de fluido de cultivo celular. Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a métodos de acuerdo con la invención, caracterizados por que la sal de la solución acuosa resultante de la mezcla consiste esencialmente de una sal como se describe en la invención, y agua.

25 El método de acuerdo con la presente invención es adecuado para VLP no secretadas sin envoltura que se expresan de forma general en BEVS.

Es decir, el método es, por tanto, adecuado para VLP derivadas de BEVS de miembros de la familia Parvoviridae y Circoviridae; familias de virus que tienen varios miembros para los que se preparan actualmente VLP de forma comercial.

30 Por lo tanto, otra forma preferida de esta realización de la presente invención se refiere a un método de acuerdo con la invención, caracterizado por que el virus sin envoltura es un miembro de la familia Parvoviridae o Circoviridae.

Los ejemplos de vacunas de Parvoviridae y Circoviridae importantes para su uso en medicina veterinaria sobre la base de virus no encapsulados que se pueden administrar satisfactoriamente en la forma de VPL fabricadas en sistemas de células de insecto basadas en baculovirus son el parvovirus porcino (PPV) y el circovirus porcino de tipo 2 (PCV2).

35 Por lo tanto, una forma más preferida de esta realización de la presente invención se refiere a un método de acuerdo con la invención, caracterizada por que el virus sin envoltura es un parvovirus porcino (PPV) o un circovirus porcino de tipo 2 (PCV2).

40 La producción de las VLP en BEVS en principio también conduce a la producción de baculovirus. Dichos baculovirus son productos secundarios indeseados de las VLP y, por tanto, deben eliminarse o, al menos, inactivarse. Se ha descubierto ahora de una forma incluso más sorprendente que si la sal de la solución acuosa se mantiene a una temperatura entre 30-55 °C, preferentemente entre 35-50 °C, más preferiblemente entre 40-45 °C, la cantidad de baculovirus vivos disminuye significativamente.

45 Por encima de todo, la cantidad de antígeno liberado también aumenta significativamente cuando la temperatura aumenta.

Esta disminución es muy ventajosa, porque la cantidad de virus a inactivar después de aplicar el método de acuerdo con la invención es relativamente bajo, y por tanto se deben utilizar cantidades menores de reactivos químicos inactivantes.

50 Simplemente como ejemplo; cuando la sal de la solución acuosa se mantiene a una temperatura entre 30-40 °C, se puede obtener una disminución en el título de virus entre 1000 y 10,000 veces.

El tiempo durante el cual debe aplicarse una determinada temperatura depende de la temperatura seleccionada: a una temperatura de aproximadamente 40 °C, se obtiene después de 1 hora una disminución de 10 veces en el título de virus mientras que, a una temperatura de aproximadamente 35 °C, dicha disminución se obtiene al cabo de 5-6 horas. En general, mantener la sal en la solución acuosa resultado de la mezcla a una determinada temperatura de 18-24 horas es adecuado de cualquier forma.

60 Dos especímenes de células de insecto que se usan con mucha frecuencia para la expresión de VLP son las células SF9 o SF21. El método descrito en la presente invención puede aplicarse muy satisfactoriamente a ambas células de ese tipo. Por tanto, otra forma preferida de esta realización de la presente invención se refiere a un método de acuerdo con la invención en el que las células de insecto son células SF9 o SF21.

65 El método descrito normalmente forma parte de los métodos generalmente aplicados para la purificación de partículas similares a virus (VLP) expresadas en baculovirus de virus sin envoltura, que comprende un número de etapas entre las que se encuentran las etapas de a) infectar células de insecto con un baculovirus recombinante que codifica las VLP-proteínas, b) cultivar las células de insecto, c) liberar las VLP de las células de insecto y d) aislar las

VLP. Es la etapa c), la etapa de liberar las VLP, que se beneficiaría en gran medida del método de acuerdo con la invención.

5 Por tanto, de nuevo, otra realización de la presente invención se refiere a métodos para purificar partículas similares a virus (VLP), expresadas en baculovirus, de virus sin envoltura, en el que el método comprende las etapas de

- 10 a) infectar células de insecto con un baculovirus recombinante que codifica las VLP-proteínas
- b) cultivar las células de insecto
- c) liberar las VLP de las células de insecto
- d) aislar las VLP

caracterizado por que el método no incluye etapas de lisis o ruptura celular, y la etapa c comprende el método de acuerdo con la presente invención para liberar las VLP.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: producción de las VLP de PCV2.

20 En este ejemplo, se usaron VLP de PCV2 derivadas de BEVS. La construcción de este baculovirus recombinante se ha descrito anteriormente con detalle en la patente de Estados Unidos US 2001/0064765. El virus también se cita como virus BacPCV-2-ORF-2. Para obtener las cantidades máximas del producto de expresión, se llevaron a cabo experimentos piloto para optimizar las condiciones para obtener las VLP de PCV-2 ORF-2 recombinante. Todos los experimentos se realizaron usando células de *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) en cultivo en suspensión a 28 °C. Se usaron para la infección virus BacPCV-2-ORF-2 en el 4º nivel de paso desde la siembra maestra. Para una producción optimizada, la densidad celular en el momento de la infección fue de $1,4 \times 10^6$ células/ml, la multiplicidad de infección (MOI) fue de 0,01 y el cultivo durante 6 días después de la infección. La mezcla resultante se denominó cosecha del producto de expresión.

30 Las muestras de fluido de cultivo celular antes y después de la centrifugación a baja velocidad se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, U. K. (1970). Nature 227:680-685.). Los geles en gradiente 4-12 % usados se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. Todos los geles de los ejemplos son también geles de poliacrilamida-SDS desnaturalizantes de acuerdo con Laemmli.

Ejemplo 2: liberación de las VLP desde células de insecto.

35 Las células se recogieron de acuerdo con el Ejemplo 1. En la Figura 1, la banda con el encabezado "cosecha" muestra el contenido de proteína de la cosecha del cultivo celular. La banda muestra todas las proteínas presentes en el fluido de cultivo y las células, incluidas las proteínas celulares, proteínas de baculovirus y proteínas relacionadas con VLP.

40 Tras la centrifugación de la cosecha a 200 g, el 90 % del sobrenadante exento de células se intercambió por un volumen igual de sal en solución acuosa, de tal forma que la concentración final después de la mezcla fue de 0,15, 0,20, 0,25 y 0,30 NaCl mM. Estas mezclas se mantuvieron durante 18 horas a 40 °C y las células remanentes se aglomeraron posteriormente mediante centrifugación a 3000 g. Los sobrenadantes se sometieron a electroforesis en gel.

45 Como puede observarse en la Figura 1, en las bandas bajo el encabezado "sobrenadante", el sobrenadante comprende la proteína VLP de PCV2 prácticamente pura (y cantidades traza de proteínas no VLP).

Ejemplo 3: comparación de las sales alcalinas y tampones fosfato.

50 En este experimento, se recogió el fluido del cultivo celular, las células se aglomeraron a 200 g, se eliminó el 90 % del sobrenadante, y las células se resuspendieron en un volumen igual de uno cualquiera de PB (tampón fosfato 250 mM, pH 7,4, PB + NaCl 0,5 M, H₂O (= WFI = agua para inyección) o bien NaCl 0,5 M en solución acuosa como se describe en la invención.

55 La incubación se realizó a 40 °C, durante la noche. A continuación, las células se eliminaron mediante centrifugación a 3000 g. Se puede observar de la figura 2 que WFI en solitario no libera las VLP, mientras que PB+NaCl, NaCl en solución acuosa y PB liberan las VLP. Como se indica en la banda WFI + NaCl (= agua para inyección + NaCl, = NaCl en solución acuosa), esto proporciona la mayor cantidad de VLP puras, y el menor fondo de proteínas no relacionadas con VLP.

60 La masa antigénica (expresada en unidades antigénicas por ml - UA/ml) de todas las muestras se determinó por ELISA con respecto a un patrón de referencia de masa antigénica conocida. Posteriormente, las tasas de recuperación (en %) de todas las muestras sometidas a ensayo se calcularon con respecto al de la muestra recogida. Como método alternativo, la intensidad de las bandas de proteína específicas de PCV2 en el gel se calculó con respecto a la intensidad de la banda de proteína específica de PCV2 de la muestra recogida.

65

Ejemplo 4: comparación de las sales alcalinas y tampones fosfato a temperaturas elevadas.

En este ejemplo, se recogió el fluido del cultivo celular, las células se aglomeraron a 200 g, se eliminó el 90 % del sobrenadante, y las células se resuspendieron en un volumen igual de uno cualquiera de PB (tampón fosfato 250 mM, pH 7,4, PB + NaCl 0,5 M, PBS 0,01 M (8 g NaCl/l, 0,2 g KCl/l, 1,44 g Na₂HPO₄/l, 0,2 g KH₂PO₄/l, pH 7,1) o bien NaCl 0,5 M en solución acuosa como se describe en la invención.

Se realizaron varias diluciones, para comparar el efecto del nivel de dilución del fluido de cultivo celular. En un experimento, las células en 30 ml del fluido de cultivo celular recogido se concentraron 10 veces, y a continuación se mezclaron con sal en solución acuosa hasta un volumen final de 50 ml. En un segundo experimento, las células en 30 ml del fluido de cultivo celular recogido se concentraron 10 veces, y a continuación se mezclaron con sal en solución acuosa hasta un volumen final de 25 ml. En un tercer experimento, las células en 30 ml del fluido de cultivo celular recogido se concentraron 10 veces, y a continuación se mezclaron con sal en solución acuosa hasta un volumen final de 10 ml.

La incubación se realizó a 40 °C, durante la noche. A continuación, las células se eliminaron mediante centrifugación a 3000 g. Puede observarse en el gel de la figura 3, que PB, PB+NaCl, PBS y NaCl en solución acuosa (WFI + NaCl) liberan VLP, todas ellas. Como se indica en la banda WFI + NaCl (= agua para inyección + NaCl, = NaCl en solución acuosa), esto proporciona la mayor cantidad de VLP puras, y el menor fondo de proteínas no relacionadas con VLP. Se observa el mismo efecto para las tres concentraciones.

Además, el experimento con WFI + NaCl también se realizó a 45 °C. Como se puede observar en la banda "WFI + NaCl, 45 °C", la incubación a esta temperatura proporciona una imagen comparable a la del tratamiento con WFI + NaCl a 40 °C: VLP-proteína con una cantidad comparablemente baja de impurezas de proteínas.

Ejemplo 5: comportamiento de las células en la sal en ambiente acuoso.

En este experimento, se obtuvieron fotografías microscópicas de células de insecto en un fluido de cultivo celular y las células se trataron según un método de acuerdo con la invención. Las células bien se mantuvieron en el fluido de cultivo celular sin tratar o se sometieron a un método de acuerdo con la invención, en este caso, la mezcla con una sal en solución acuosa de tal forma que la sal en la solución acuosa resultante de la mezcla comprende 0,3 M NaCl/l.

La Figura 4 muestra los resultados: la fotografía izquierda muestra las células de insecto sin tratamiento, mientras que la fotografía de la derecha muestra las células de insecto en solución acuosa que comprende 0.3 M NaCl/l tras la mezcla. Como se puede observar inmediatamente, las células de la fotografía derecha siguen, sin embargo, intactas, e incluso tienen un tamaño algo menor comparadas con las células de la fotografía izquierda, debido a su presencia en el entorno hiperosmótico de la sal en solución acuosa que comprende 0,3 mM NaCl/l.

Ejemplo 6: influencia de la temperatura de incubación sobre el título de baculovirus.

En este ejemplo, 30 ml de células se recogieron mediante centrifugación de baja velocidad, se eliminó el 90 % del fluido de cultivo exento de células, y el resto del aglomerado celular se resuspendió a continuación en 25 ml de sal en solución acuosa hasta una concentración de 0,5 M NaCl/l.

La suspensión así obtenida se sometió durante 1, 2, 4, 6 o 18 horas (durante la noche) a temperaturas de 35 °C, 37 °C, y 40 °C. A continuación, las células se eliminaron mediante centrifugación a 3000 g. Como puede observarse en la Figura 5, se puede obtener una disminución en el título de baculovirus de aproximadamente 100 veces durante la noche a 35 °C. A 40 °C, una disminución de 100 veces ya se obtiene después de 1-2 horas, mientras que se obtiene una disminución de 1000 veces después de 6-18 horas.

Ejemplo 7: comparación de diferentes concentraciones de varios metales alcalinos.

Este experimento compara la liberación de VLP por diferentes sales. Las células se recogieron como se ha descrito anteriormente, se eliminó el 90 % de volumen de fluido de cultivo celular exento de células. A continuación, se añadieron varias sales en soluciones acuosas, de forma que el volumen de la sal en las soluciones acuosas fue igual al del volumen recogido concentrado para conseguir una concentración final de las células de 5 veces. El ensayo se realizó con diferentes concentraciones de NaCl, KCl, MgCl₂ y CaCl₂. A continuación, las células se eliminaron mediante centrifugación a 3000 g. La concentración tras la mezcla se presenta en la tabla 1 siguiente.

		Tasa de recuperación	AM (UA/ml)
		gel	
2	A074, recogida día 7	100	25183
3	NaCl 0,3 M (5x conc.)*	204	111364
4	NaCl 150 mM	182	76266
5	NaCl 300 mM	191	80806
6	MgCl ₂ 100 mM	198	83782

7	MgCl ₂ 200 mM	191	59528
8	CaCl ₂ 100 mM	157	60327
9	CaCl ₂ 200 mM	75	60659
10	KCl 150 mM	162	61900
11	KCl 300 mM	179	86528

* esta muestra procede de la misma recogida, pero se trató con NaCl 0,3 M un día diferente al resto de las muestras

Tabla 1

Los resultados se presentan en la figura 6. La banda 2 muestra las proteínas presentes en la cosecha (después de una dilución de cinco veces de las muestras (excepción: banda 12: muestra de cosecha sin diluir). La tasa de recuperación de la muestra cosechada en gel (tabla 1) se indica en la tabla como 100, la recuperación relativa como se determina sobre gel se presenta en la segunda columna de la derecha de la tabla 1. La recuperación de masa antigénica se presenta en la columna de la derecha de la tabla 1. Resulta de ambos geles de la figura 6 y la tabla que todos los tratamientos tienen una tasa de recuperación más alta que la preparación de la banda 2 (cosecha), y todas las preparaciones proporcionan preparaciones VLP limpias. (El valor relativamente bajo de la tasa de recuperación en la banda 9 se considera un artefacto, ya que la determinación de la masa antigénica de la preparación ensayada en la banda 9 muestra una tasa elevada de recuperación, como se esperaba). La Figura 7 muestra que hay una buena correlación entre la tasa de recuperación de las VLP como se determina sobre el gel y la tasa de recuperación de las VLP como se determina mediante la determinación de la masa antigénica sobre la base de un ensayo ELISA convencional.

15 **Ejemplo 8: aplicación del método a células SF9 y SF21 productoras de parvovirus porcino.**

Este experimento está destinado a mostrar que el método es igualmente adecuado para otras VLP no secretadas sin envoltura. En este experimento, se seleccionó una VLP de los Parvoviridae derivada de BEVS: parvovirus porcino (PPV). Asimismo, en este experimento, se usaron dos especies diferentes de células de insecto habitualmente utilizadas: células SF9 y células SF21.

Las células SF9 y SF21 se infectaron con un baculovirus recombinante que expresaba VLP de parvovirus porcino. ("cosecha", figura 8, bandas 2 y 7). A continuación, las células se aglomeraron a 200 g, se eliminó el 90 % del sobrenadante, (Figura 8, bandas 4 y 9) y las células se resuspendieron en uno cualquiera de un volumen igual de PBS (figura 8, bandas 3 y 8) o 0.3 M NaCl en solución acuosa. Tras la incubación de las muestras tratadas con NaCl durante la noche a 40 °C, las muestras se centrifugaron a 3000 g, el sobrenadante se recogió (Figura 8, bandas 6 y 11) y el aglomerado se resuspendieron en uno cualquiera de un volumen igual de PBS (Figura 8, bandas 5 y 10).

La Figura 8 muestra los resultados del método, cuando se aplica a las VLP de PPV producidas en células SF9 y SF21. banda 2: cosecha; banda 3: cosecha, aglomerado resuspendido en PBS, banda 4: sobrenadante recogido; banda 5: cosecha, 0.3 M NaCl durante la noche a 40 °C, aglomerado; banda 6: cosecha, 0.3 M NaCl durante la noche a 40 °C, sobrenadante; banda 7: cosecha; banda 8: cosecha, aglomerado resuspendido en PBS, banda 9: sobrenadante recogido; banda 10: cosecha, 0.3 M NaCl durante la noche a 40 °C, aglomerado; banda 11: cosecha, 0.3 M NaCl durante la noche a 40 °C, sobrenadante.

Como resulta de la banda 5 cuando se compara con la banda 3, el tratamiento de acuerdo con el método de la presente invención libera prácticamente todas las VLP de las células de insecto; las células aglomeradas después del tratamiento, como se muestra en la banda 5, comprenden muy pocas, o ninguna, VLP. De la banda 4, cuando se compara con la banda 3, puede observarse que, al contrario de lo que se observa con las VLP de PCV2, las células de insecto que producen las VLP de CPV ya liberan una parte de las VLP en el sobrenadante. El motivo de esto es desconocido. Sin embargo, el método de acuerdo con la invención también se puede aplicar de forma muy adecuada a estas VLP de CPV, ya que, sin aplicar el método de la presente invención, una cantidad muy considerable de las VLP de CPV quedan atrapadas en las células después de la cosecha.

45 **Leyenda de las figuras:**

Figura 1: Esta figura muestra el efecto de aplicar el método de acuerdo con la invención usando varias concentraciones de NaCl en solución acuosa, a 40 °C a células de insecto que comprenden las VLP.

Figura 2: Esta figura muestra el efecto de aplicar el método de acuerdo con la invención usando varias sales en una solución de sal en agua, a células de insecto que comprenden las VLP.

Figura 3: Esta figura muestra el efecto de aplicar el método de acuerdo con la invención usando varias sales en una solución de sal en agua a elevada temperatura, a células de insecto que comprenden las VLP.

Figura 4: Esta fotografía muestra una comparación entre células de insecto en su medio de cultivo (fotografía izquierda) y células de insecto después del tratamiento con el método de acuerdo con la invención (fotografía derecha).

Figura 5: Esta fotografía muestra la influencia de una incubación prolongada a temperatura elevada sobre el título de baculovirus.

Figura 6: Esta figura muestra el efecto de aplicar el método de acuerdo con la invención usando NaCl, MgCl₂,

CaCl₂ y KCl como la sal alcalina en una sal en solución acuosa, a células de insecto que comprenden las VLP.

Figura 7: Esta figura muestra la relación entre la cantidad de VLP obtenidas usando el método de acuerdo con la invención como se determina sobre el gel y la determinada según la masa antigénica por ELISA.

5 Figura 8: Esta figura muestra el efecto de aplicar el método de acuerdo con la invención a dos líneas de células de insecto diferentes que expresan VLP de parvovirus porcino derivadas de baculovirus. Banda 2, 7: cosecha. Banda 3, 8: cosecha, aglomerado resuspendido en PBS. Banda 4, 9: sobrenadante recogido. Banda 5, 10: cosecha, 0,3 M NaCl O/N 40 °C, aglomerado. Banda 6, 11: cosecha, 0,3 M NaCl O/N 40 °C, sobrenadante.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para liberar partículas similares a virus (VLP), expresadas en baculovirus, de virus sin envoltura procedentes de células de insecto, **caracterizado por que** el método no incluye etapas de lisis o de ruptura celular, y comprende la etapa de mezclar las células de insecto con una sal, en donde la sal en solución acuosa resultante de la mezcla comprende al menos 300 mOsmol/l de una sal cuyo catión se selecciona entre el grupo que consiste en metales alcalinos y metales alcalinotérreos, y cuyo anión se selecciona del grupo que consiste en Cl⁻, Br⁻ y I⁻.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa de mezclar las células de insecto con una sal va precedida por una etapa de concentración durante la cual se concentran las células de insecto.
3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el catión se selecciona entre el grupo que consiste en Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ y K⁺.
- 15 4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂.
- 20 5. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la sal en la solución acuosa resultante de la mezcla consiste en una sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y agua.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por que** el virus sin envoltura es un miembro de la familia Parvoviridae o Circoviridae.
- 25 7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado por que** la sal en la solución acuosa se mantiene a una temperatura de entre 35-50 °C.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** la sal en la solución acuosa se mantiene a una temperatura de entre 40-45 °C.
- 30 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado por que** las células de insecto son células SF9 o SF21.
- 35 10. Método para purificar partículas similares a virus (VLP), expresadas en baculovirus, de virus sin envoltura, comprendiendo el método las etapas de
- 40 a) infectar células de insecto con un baculovirus recombinante que codifica proteínas de VLP;
 b) cultivar las células de insecto
 c) liberar las VLP de las células de insecto
 d) aislar las VLP
- caracterizado por que** el método no incluye etapas de lisis o de ruptura celular, y la etapa c comprende el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la liberación de las VLP.

Influencia de la concentración de NaCl sobre la liberación de VLP

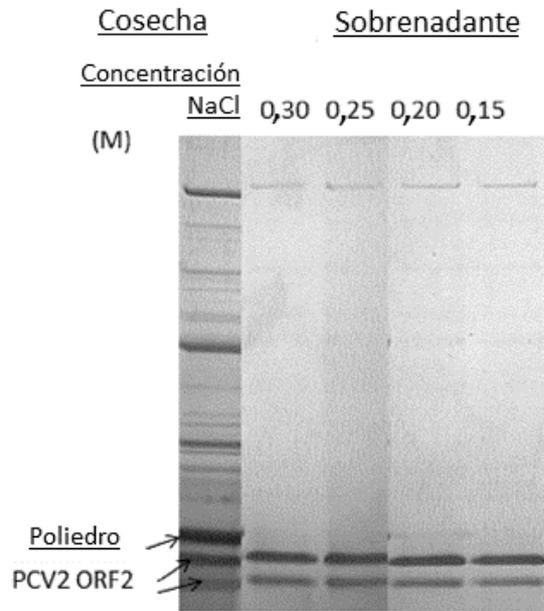


Figura 1

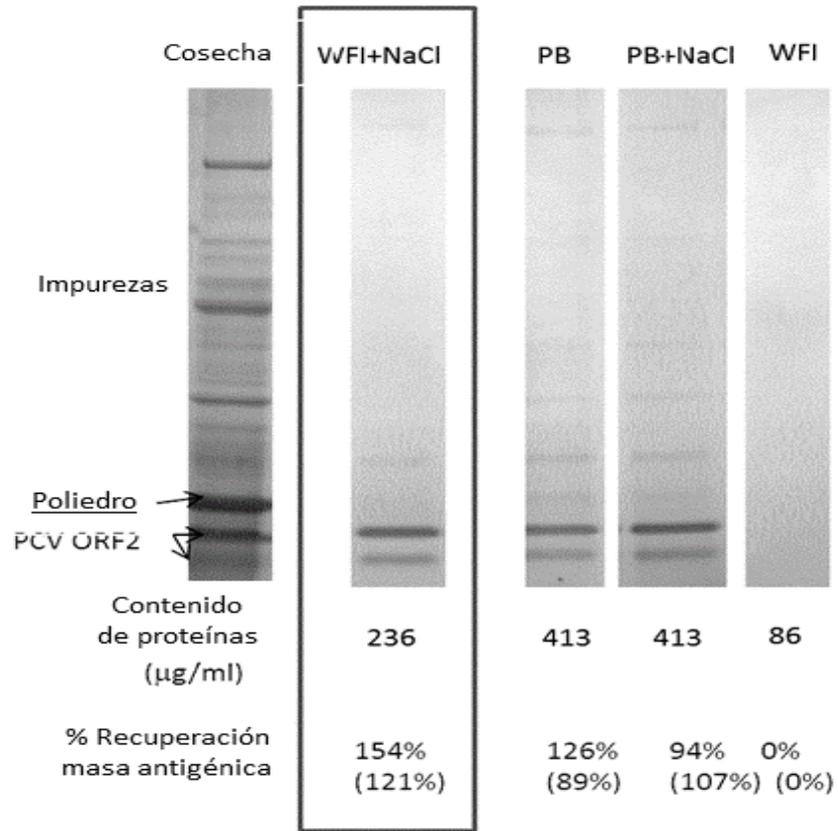


Figura 2

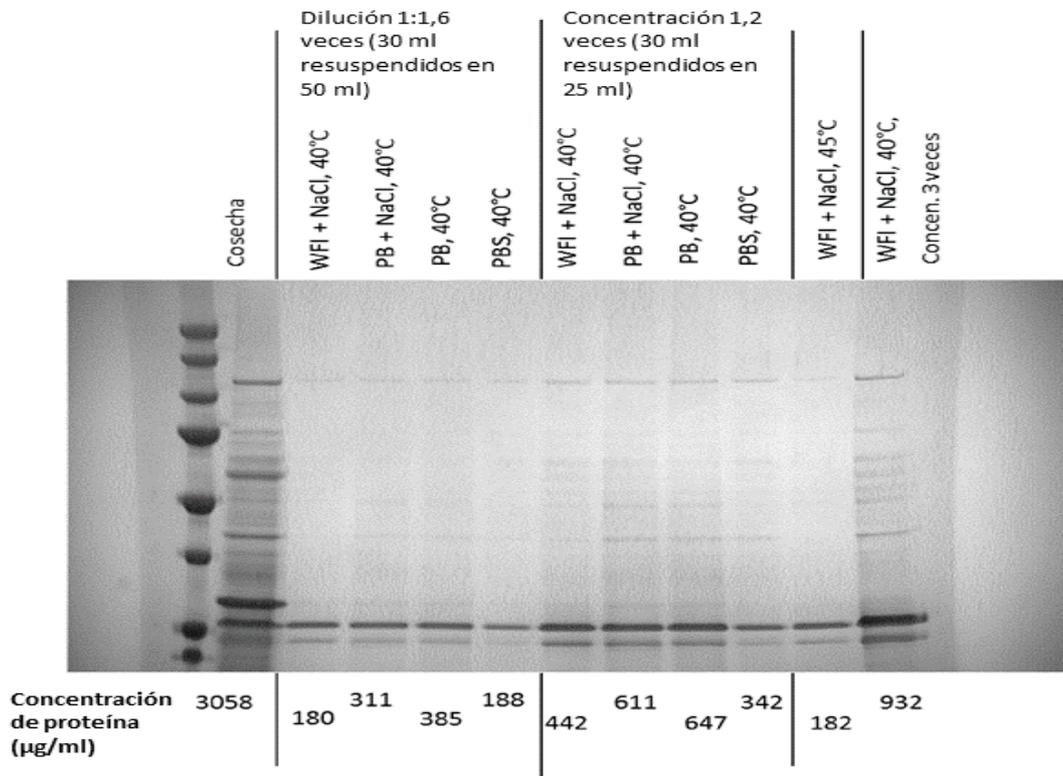
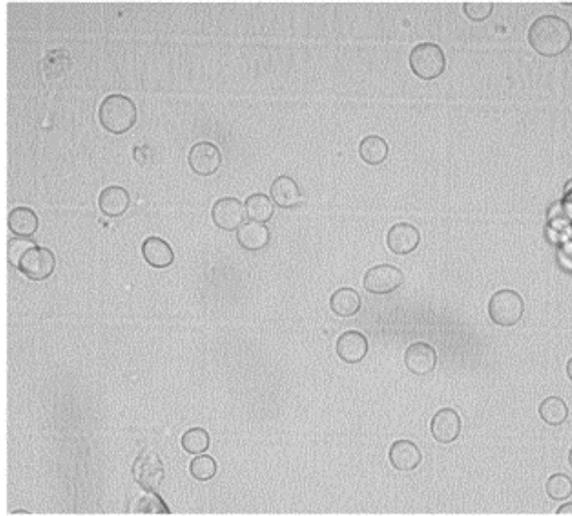


Figura 3

Células de insecto sin tratamiento



Células de insecto con NaCl 0,3 M en WFI

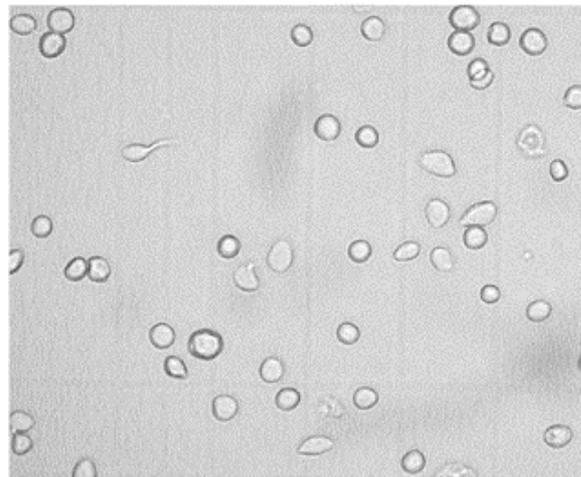


Figura 4

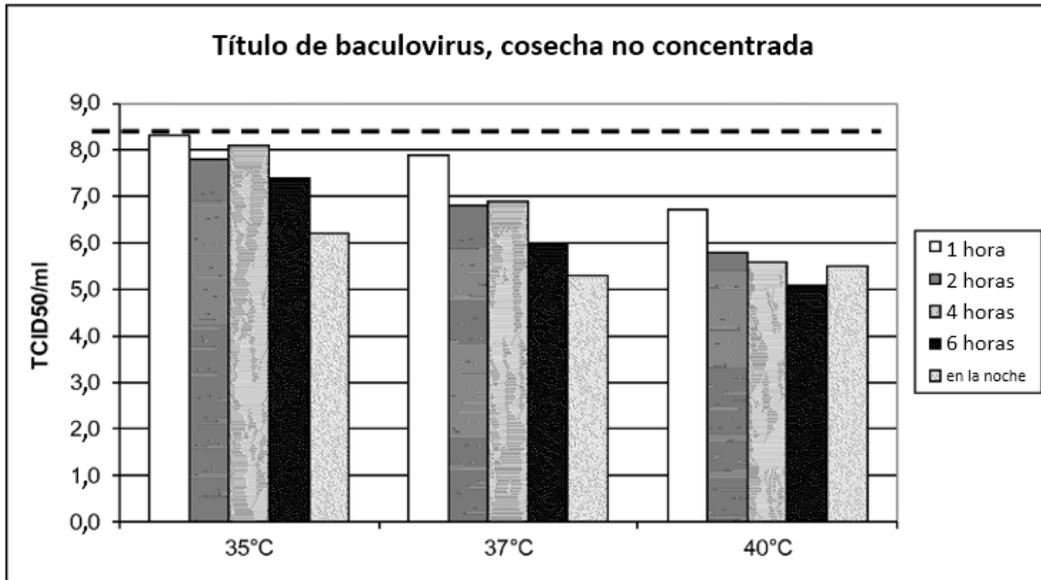


Figura 5

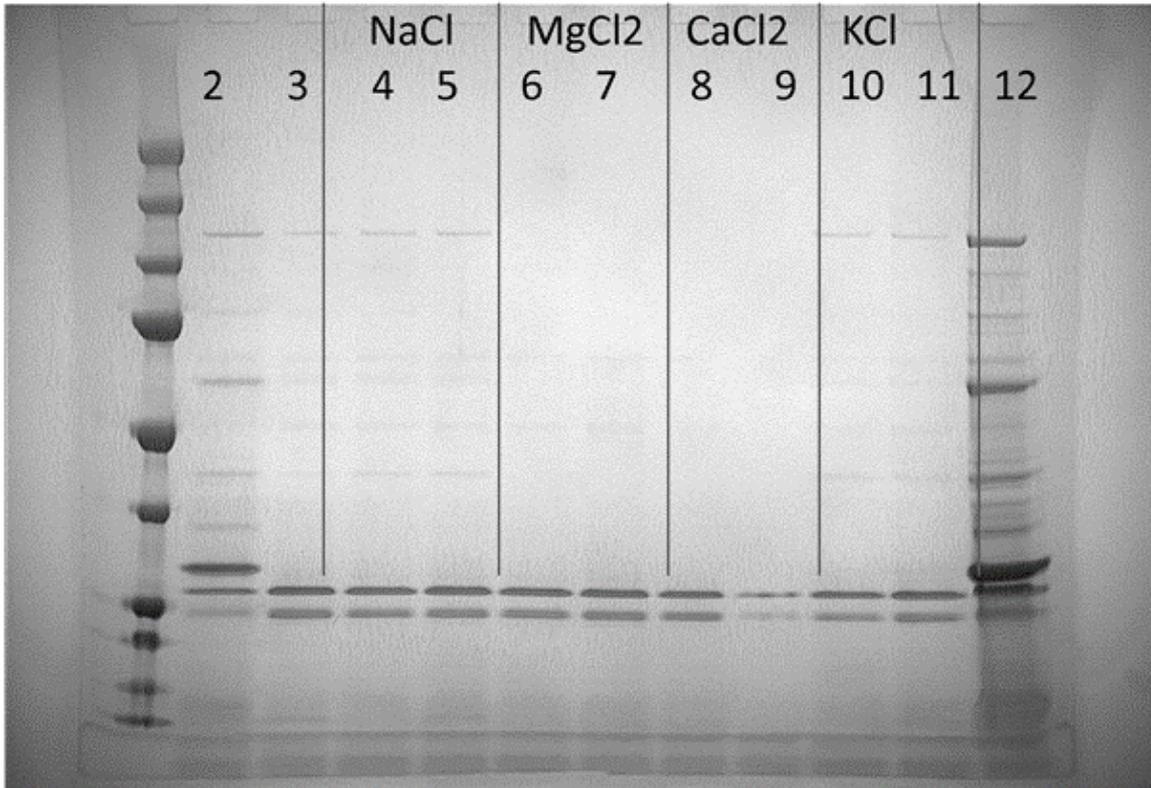


Figura 6

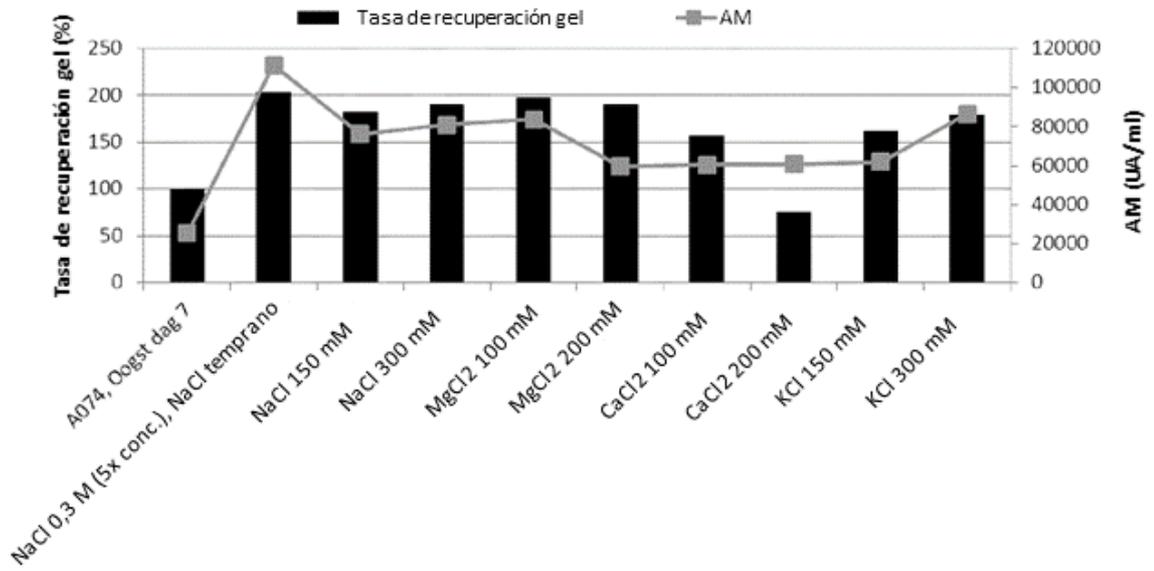


Figura 7

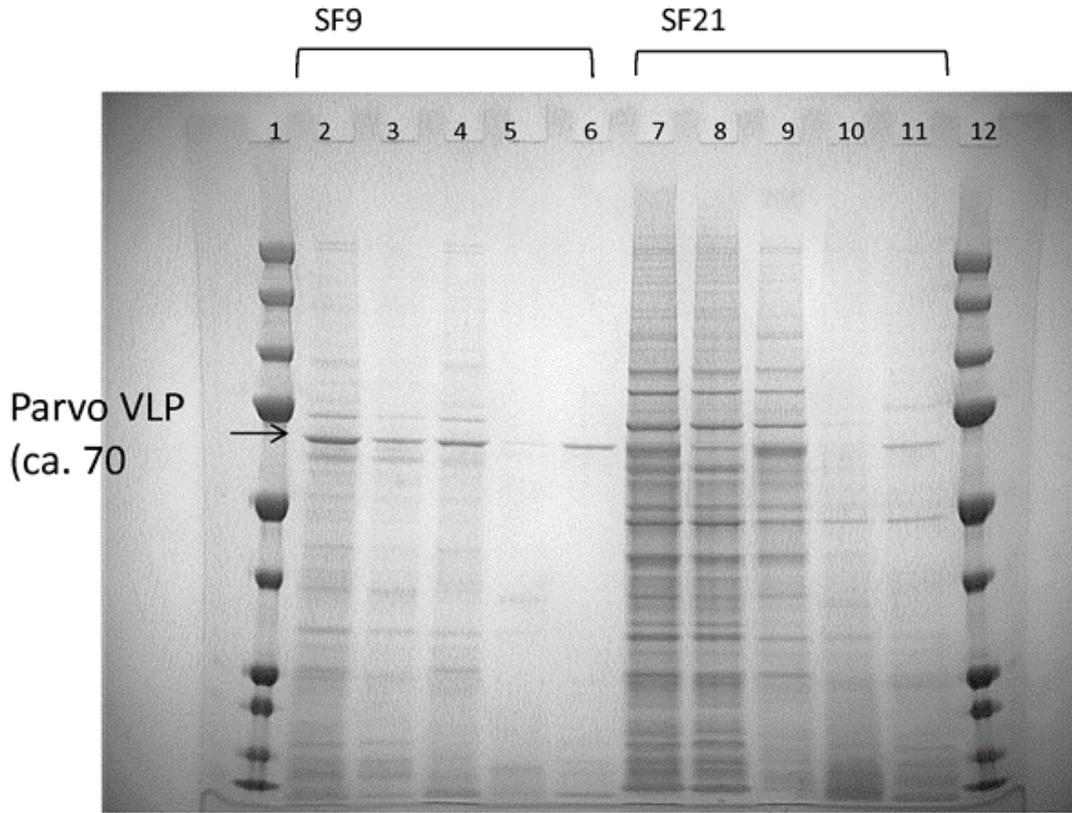


Figura 8