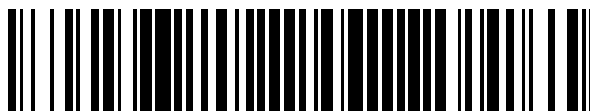


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 197**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2012 PCT/EP2012/063045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13010797**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2012 E 12734892 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2734619**

54 Título: **Procedimiento para producir antígeno ortomixoviral y vacunas**

30 Prioridad:

20.07.2011 EP 11174660
20.07.2011 US 201161509630 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2018

73 Titular/es:

BGP PRODUCTS B.V. (100.0%)
Wegalaan 9
2132 JD Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:

CUI, YI-QING;
WANG, YIDING;
THUS, JO;
VAN 'T HOF, RON;
SHAKER, SABAH y
VAN ROOIJ, GEERTJE JACOBA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 653 197 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir antígeno ortomixoviral y vacunas

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la industria farmacéutica y se refiere a un método para la producción de una composición farmacéutica que comprende un antígeno viral derivado de un virus con envoltura.

Descripción de antecedentes de la técnica

10 Actualmente, los virus que se utilizan para la producción de composiciones farmacéuticas tales como preparaciones de vacunas o productos intermedios de las mismas se propagan en sistemas de cultivo basados en huevos o basados en células. Independientemente del sistema respectivo utilizado, el procesamiento de antígenos virales de cada uno de los sistemas de cultivo es un paso muy importante y crítico en la producción de composiciones farmacéuticas tales como preparaciones de vacunas. En cuanto al sistema basado en huevos, el requisito principal del procesamiento es la separación suficiente de las proteínas del huevo embrionario tales como la ovoalbúmina, y en cuanto al sistema basado en células, el procesamiento debe cumplir requisitos tales como una reducción significativa del ADN de las células huésped y proteínas de las células huésped. Además, los virus que no son producto deben ser eliminados significativamente.

15 Con respecto a la purificación de proteínas virales, el documento EP 1 982 727 A1 describe un procedimiento de purificación de proteínas de la membrana viral, que comprende las etapas de separar células, microsoportes y aglomerados celulares del medio de cultivo por sedimentación, someter dicho sedimento a inactivación química y solubilización de dicho sedimento, agregar colato de sodio, centrifugar la mezcla, reducir la cantidad de detergente mediante tratamiento con Amberlite y llevar a cabo una cromatografía de afinidad, seguido de elución de la proteína diana.

20 El documento US 2011/0014230 A1 describe un procedimiento para preparar antígenos de vacuna, que comprende esencialmente la etapa de inactivar viriones purificados, seguido de la división de dichos viriones con detergentes.

25 El documento US 2009/0060950 A1 divulga un método para producir vacunas virales, que comprende las etapas de propagar un virus en una célula, recoger dicho virus en el sobrenadante celular, inactivar dicho virus, purificarlo mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad y tratarlo con un detergente.

El documento US 4.327.182 describe un método para preparar una vacuna de subunidad de gripe purificada utilizando técnicas de filtración de membrana.

30 Los documentos WO 2009/115917 y US 4.140.762 describen ambos un método de preparar antígenos de vacunas, en el que tienen lugar etapas adicionales entre una etapa de concentración y una etapa de solubilización.

El documento US 6.048.537 se refiere a un método para preparar antígenos de influenza purificados, que comprende las etapas de concentración, purificación y fragmentación.

35 Otros documentos que se refieren a métodos de purificación son los US2010/0119552 A1; US 2010/0158944 A1; Kalbfuss et al., 2007, Biotech & Bioeng. Vol. 96, N° 5, págs. 932-944; Onions et al., 2010, Biologicals, Vol. 38, págs. 544-551; US 2008/0118970; WO 03/097797; Goerke et al., 2005, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 91, N° 1, págs. 12-21; Krober et al., Chem. Eng. Technology 2010, Vol. 33, págs. 941-959; y WO 2010/052214 A2. "Ion exchange chromatography Screening and Optimization of the loading conditions on Capto S", 1 de enero de 2006, describe un medio que se puede utilizar en la cromatografía.

40 El documento WO 2011/051235 describe un procedimiento para producir una preparación del virus de la gripe dividida o subunidad, que comprende las etapas de proporcionar una preparación de virus entera, dividir dicha preparación de virus y filtrar dicha preparación.

45 A pesar de los métodos arriba descritos, todavía hay una necesidad y, por lo tanto, un objeto para un método mejorado para la producción de un antígeno viral, especialmente una preparación de antígeno viral y, en particular, una composición farmacéutica tal como una vacuna. En particular, existe la necesidad de un método de producción que proporcione una alta recuperación del producto a un costo de producción relativamente bajo, que sea independiente de la tensión viral y que requiera un número mínimo de etapas solamente, cumpliendo al mismo tiempo los estrictos requisitos de bajos niveles de ADN de célula huésped y proteínas y agentes extraños.

Sumario de la invención

50 La presente invención proporciona los siguientes aspectos, materias objeto y formas de realización preferidas, que tomados respectivamente solos o en combinación, contribuyen a resolver el objeto de la presente invención:

(1) Un método para la producción de hemaglutinina y/o neuraminidasa derivada de ortomixovirus, que comprende las siguientes etapas, en el orden indicado:

- a) proporcionar un fluido derivado de un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en células o un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en huevos que comprende dicho virus,
- 5 b) clarificar el fluido que comprende ortomixovirus aplicando centrifugación, filtración de flujo tangencial o filtración profunda, lo que da como resultado una cosecha líquida que comprende dicho virus,
- c) reducir el volumen de la cosecha líquida obtenida después de la etapa b) en un factor de al menos 4 para obtener una cosecha líquida concentrada, en donde esta etapa reductora del volumen se lleva a cabo en un solo paso,
- 10 d) solubilizar el ortomixovirus que está presente en la cosecha líquida mediante la adición de un detergente o una mezcla de detergentes que comprende un detergente catiónico a la cosecha líquida concentrada obtenida en la etapa c), en donde la concentración final de dicho detergente catiónico es al menos de 2000 µg/ml,
- e) separar núcleos virales de la composición obtenida después de la etapa d),
- 15 f) separar opcionalmente el detergente catiónico de la composición obtenida después de la etapa e),
- g) purificar hemaglutinina y/o neuraminidasa aplicando cromatografía,

en donde la etapa c) es seguida directamente por la etapa d),

y en donde antes de la etapa d) no se lleva a cabo etapa de purificación alguna que esté dirigida a purificar específicamente ortomixovirus.

- 20 En una realización preferida, no se lleva a cabo etapa de purificación principal alguna, en particular etapa de purificación principal alguna que se dirija a la purificación del virus con envoltura, preferiblemente sin cromatografía, antes de la etapa e). Después de la etapa e), tiene lugar una etapa de purificación principal. Esta etapa de purificación principal, que tiene lugar después de la etapa e), está dirigida a la purificación del antígeno viral. No está dirigida a purificar virus enteros o viriones enteros, respectivamente. Con respecto a la definición de la expresión
- 25 "etapa de purificación principal" (o "método de purificación principal", respectivamente), se hace referencia a la definición en otro lugar de esta memoria.

En una realización preferida adicional, la única etapa de cromatografía que se lleva a cabo, se lleva a cabo en la etapa g).

- 30 En una realización preferida adicional, no se lleva a cabo una centrifugación en el gradiente de densidad (tal como una ultracentrifugación en gradiente de densidad, p. ej., una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa) antes de la etapa e).

- 35 En una realización adicional, se puede aplicar una etapa de inactivación viral adicional, tal como una etapa de inactivación química, y/o una etapa de aclaramiento viral adicional. Sin embargo, bien podría ser que aplicando la presente invención no fuese necesario el uso de esta etapa de inactivación viral adicional y/o etapa de aclaramiento viral adicional con el fin de llegar a una inactivación suficiente de cualquier patógeno y un aclaramiento suficiente, es decir, con el fin de llegar a una inactivación y aclaramiento que cumpla las regulaciones respectivas. Esto es una ventaja, ya que la omisión de una etapa de inactivación viral adicional y/o etapa de aclaramiento viral adicional contribuye, además, a un proceso mejorado, p. ej., con respecto a minimizar el estrés expuesto a antígenos virales
- 40 deseados, y/o a acortar el proceso. Sin embargo, si se lleva a cabo una etapa de inactivación viral adicional, tal como una inactivación química, y/o una etapa de aclaramiento viral adicional, esta o estas etapas no tienen lugar entre las etapas c) y d): como se describe en otra parte, el seguimiento directo de la etapa c) por la etapa d) contribuye, entre otros, a una recuperación potenciada del antígeno viral. En otro aspecto, dicha inactivación adicional y/o etapa de aclaramiento adicional no se lleva a cabo antes de la etapa e). En una realización adicional, dicha etapa de inactivación adicional y/o de aclaramiento adicional se lleva a cabo, por ejemplo, después de la etapa
- 45 g). Además, si se lleva a cabo una etapa de inactivación viral adicional y/o una etapa de aclaramiento viral adicional de este tipo, la concentración de productos químicos necesarios y utilizados con el fin de llegar a un producto final que cumpla con las regulaciones es menor en comparación con la concentración de productos químicos convencionalmente necesarios y utilizados con el fin de llegar a un producto final que cumpla con las regulaciones. Esto puede ser ventajoso, p. ej., con respecto a la reducción del estrés expuesto a y las modificaciones químicas
- 50 sobre los antígenos virales. Además, puede ser beneficioso para la eficacia del producto y, probablemente, la estabilidad.

Dentro del significado de la presente invención, la expresión "antígeno viral purificador" designa métodos de purificación principales o etapas de purificación principales, tales como cromatografía, o métodos de purificación por ultracentrifugación en gradiente de densidad. En una realización, el método de purificación principal no comprende

filtración en membrana selectiva. La cromatografía utilizada puede ser cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en modo mixto, cromatografía de pseudo-afinidad, cromatografía de afinidad, cromatografía líquido-líquido, y similares. Dentro del significado de la presente invención, la expresión "método de purificación principal" o "etapa de purificación principal" se refiere a métodos que son los principales métodos de purificación que se utilizan para purificar el producto (finalmente) deseado. En otras palabras, los métodos/etapas de purificación principales están dirigidos a purificar específicamente el producto (finalmente) deseado. En la presente invención, por ejemplo, dicho producto (finalmente) deseado es el antígeno viral que ha de purificarse, pero no el virus con envoltura completo, antes de la solubilización. Otros métodos que no son el "método de purificación principal" pueden cumplir un propósito diferente tal como un propósito de clarificación, un propósito de concentración o un propósito de peletización, con el efecto a veces acompañante de purificar adicionalmente el producto (final) deseado. El resultado de un método de este tipo, que no es la "etapa de purificación principal" o el "método de purificación principal", es que el efecto de purificación del producto (final) deseado después de haber llevado a cabo tal método/etapa es menor en comparación con el efecto de purificación que se alcanza al llevar a cabo la "etapa/el método de purificación principal". Después de haber llevado a cabo la etapa de purificación principal, preferiblemente no se llevan a cabo etapas de purificación adicionales (por ejemplo, con el fin de cumplir con las regulaciones en cuanto a las impurezas que todavía están presentes en la composición). Las etapas de aclaramiento e inactivación, tal como las etapas de inactivación química, no se consideran como etapas de purificación principales con respecto a esto. De acuerdo con la presente invención, estas "etapas/métodos de purificación principales" no se llevan a cabo antes de la etapa e).

(2) El método de acuerdo con el punto (1), en el que después de la etapa d) y antes de la etapa g), se separa el detergente que se ha añadido en la etapa d).

En una realización, no se utiliza una etapa de cromatografía para separar el detergente.

(3) Método de acuerdo con el punto (1) o (2), en el que el volumen en la etapa c) se reduce en un factor de al menos 5.

En una realización preferida, el volumen se reduce en un factor de al menos 9, más preferiblemente al menos 12, incluso más preferiblemente al menos 13, o al menos 15, y lo más preferiblemente al menos 20, o al menos 25. Una reducción de volumen máxima típica es 30, 35, 40 o 45.

La reducción del volumen en la etapa c) se lleva a cabo en una sola etapa. Dentro del significado de la presente invención, la expresión "una sola etapa" designa que sólo hay una etapa de reducción de volumen que se llevó a cabo, y que esta única etapa de reducción de volumen no se repite.

(4) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (3), en el que la concentración final del detergente catiónico es de al menos aproximadamente 2500 µg/ml, también preferido de al menos aproximadamente 3000 µg/ml, también preferido de al menos aproximadamente 3500 µg/ml, también preferido de al menos aproximadamente 4000 µg/ml, también preferido de al menos aproximadamente 4500 µg/ml, también preferido de al menos aproximadamente 5000 µg/ml, también preferido de al menos aproximadamente 5500 µg/ml, y también preferido de al menos aproximadamente 6000 µg/ml.

(5) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que el detergente catiónico se basa en cationes de amonio cuaternario tal como bromuro de cetiltrimetilamonio u otras sales de alquiltrimetilamonio, sales de alquilamina tales como acetato de estearilamina o acetato de alquilamina de coco, cloruros y bromuros de benzalconio, por ejemplo, cloruro de bencetonio o cloruro de metilbencetonio, estearilaminapoliglicoléter u oleilaminapoliglicoléter, preferiblemente el detergente catiónico es bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

En una realización adicional, el detergente es una mezcla de detergentes, en donde dicha mezcla comprende, como detergentes, un detergente catiónico tal como se describe en esta memoria, preferiblemente CTAB, y un detergente no iónico tal como se describe en esta memoria, preferiblemente un miembro de la familia Tween, preferiblemente Tween-80.

(6) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que la etapa b) es directamente seguida por la etapa c), que es directamente seguida por la etapa d).

En una realización adicional, la etapa d) es directamente seguida de la etapa e).

(7) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que no tiene lugar intercambio de detergente alguno.

(8) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que no se añade nucleasa u otra enzima de digestión de ADN, preferiblemente nada de Benzonase®, antes de la etapa d), preferiblemente no se añade nucleasa en ninguna fase del proceso.

(9) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que el ortomixovirus es un virus de la gripe tal como el virus de la gripe A, B o C.

- (10) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que el cultivo de propagación de ortomixovirus basado en células comprende células de una línea celular de mamífero, preferiblemente de una línea celular de un animal.
- 5 (11) Método de acuerdo con el punto (10), en el que las células de la línea celular de mamífero se seleccionan del grupo que consiste en Vero, PerC6, BHK, 293, COS, PCK, MRC-5, MDCK, MDBK y WI-38, preferiblemente las células son células MDCK.
- (12) Método de acuerdo con el punto (10) u (11), en el que las células se cultivan como células adherentes.
- (13) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que el cultivo de propagación de ortomixovirus basado en huevos comprende huevos de gallina.
- 10 (14) El método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que el fluido en la etapa a) se produce utilizando un biorreactor desechable.
- El uso de un biorreactor desechable puede contribuir adicionalmente a la mejora del método de acuerdo con la presente invención en comparación con métodos convencionales, por ejemplo con respecto al propio producto obtenido, p. ej., en términos de calidad y/o pureza. Esto es especialmente beneficioso si el método se lleva a cabo a gran escala, p. ej., a escala industrial.
- 15 (15) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que en una realización, las condiciones de la centrifugación de la etapa b) son, p. ej., iguales a o menores que 10000 g de RCF (siglas inglesas de fuerza centrífuga relativa) durante menos de 2 min, preferiblemente igual a o menor que 3000 g de RCF durante igual a o menor que 2 min, más preferiblemente igual a o menor que 500 g de RCF durante igual a o menor que 2 min, incluso más preferiblemente igual a o menor que 300 g de RCF durante igual a o menor que 2 min. Dentro del significado de la presente invención, "g" se refiere a la aceleración estándar debida a la gravedad en la superficie de la tierra.
- 20 En una realización, para la filtración de flujo tangencial de la etapa b), el tamaño de poros de las membranas de microfiltración es, p. ej., al menos 0,2 μm , preferiblemente al menos 0,45 μm , e incluso más preferiblemente al menos 0,65 μm .
- 25 En una realización, para la filtración en profundidad de la etapa b), p. ej., se utilizan los filtros de 0,2 μm -7 μm . Adicionalmente, con el fin de mejorar aún más la recuperación del producto y/o evitar la obstrucción del filtro, se puede utilizar un pre-filtro.
- 30 (16) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que la etapa de concentración c) se lleva a cabo aplicando un método seleccionado del grupo que consiste en filtración de flujo tangencial (TFF), ultracentrifugación y precipitación. La TFF es ultrafiltración TFF o ultrafiltración TFF y diafiltración en un solo paso (ultrafiltración/diafiltración TFF).
- En una realización, cuando se utiliza la filtración de flujo tangencial para la etapa c), el corte de peso molecular de las membranas de ultrafiltración puede ser, por ejemplo, igual a o menor que 1000 kDa, preferiblemente igual a o menor que 750 kDa, más preferiblemente igual a o menor que 500 kDa, incluso más preferiblemente igual a o menor que 300 kDa, y lo más preferiblemente de 100-300 kDa. En una realización preferida, el corte de peso molecular de las membranas de ultrafiltración no es menor que 50 kDa.
- 35 Cuando se aplica la filtración de flujo tangencial en la etapa c), en una realización preferida, la reducción de volumen está en el intervalo de 5-40 veces, preferiblemente la reducción de volumen es más de 10 veces, más preferiblemente la reducción de volumen es más de 15 veces. Se prefiere que la reducción de volumen no sea más de 30 veces. Esto puede conducir a resultados mejorados de las siguientes etapas de tratamiento.
- 40 En una realización, cuando se utiliza la ultracentrifugación para la etapa c), las condiciones de la ultracentrifugación pueden ser, por ejemplo, de 30.000 g-200.000 g durante más de 10 min. Cuando se aplica la ultracentrifugación en la etapa c), en una realización preferida, la reducción de volumen de la ultracentrifugación es más de 10 veces, preferiblemente más de 20 veces, más preferiblemente más de 30 veces, incluso más preferiblemente más de 40 veces.
- 45 En una realización, si la concentración se lleva a cabo aplicando la precipitación, una persona experta en la técnica conoce productos químicos adecuados y éstos pueden ser, por ejemplo, sal, alcohol metílico y etílico y polietilenglicol, en una concentración respectivamente apropiada. Los productos químicos adecuados a una concentración apropiada precipitan el producto, p. ej., las partículas que contienen antígeno viral, pero tienen un efecto negativo nulo o mínimo sobre dichos antígenos virales. Los productos químicos se eligen de modo que no reaccionen con el producto (finalmente) deseado, p. ej., los antígenos virales. Cuando se aplica precipitación en la etapa c), en una realización preferida, la reducción de volumen es de más de 10 veces, preferiblemente de más de 20 veces, más preferiblemente de más de 30 veces, incluso más preferiblemente de más de 40 veces.
- 50

(17) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que en la etapa d) la solubilización se lleva a cabo durante un período de tiempo y a una temperatura suficiente para solubilizar esencialmente todos los virus con envoltura que están presentes en la cosecha líquida.

5 En general, una persona experta en la técnica puede determinar un período de tiempo y una temperatura suficientes para solubilizar esencialmente la totalidad del virus con envoltura. En una realización, el período de tiempo está entre 0,2 h y 20 h a una temperatura superior a 0°C, preferiblemente a una temperatura de 2°C a 30°C, preferiblemente el período de tiempo oscila entre 0,5 h y 6,0 h a una temperatura de 2-25°C, y más preferiblemente a una temperatura de 2-8°C.

10 (18) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que, si se lleva a cabo, la etapa e) se lleva a cabo aplicando un método seleccionado del grupo que consiste en ultracentrifugación y filtración de flujo tangencial.

15 En una realización, cuando se utiliza la ultracentrifugación en la etapa e), las condiciones de la ultracentrifugación para la granulación son preferiblemente 30,000 g -200,000 g durante más de 10 min, preferiblemente más de 60,000 g durante más de 30 min, más preferiblemente más de 90,000 g durante más de 30 min., Incluso más preferiblemente más de 120,000 g durante más de 30min.

En una realización, cuando se utiliza la filtración de flujo tangencial en la etapa e), el corte de peso molecular de las membranas de ultrafiltración es preferiblemente mayor que 100 kDa y más preferiblemente mayor que 300 kDa. Además, el corte de peso molecular de las membranas preferiblemente no es mayor que 500 kD.

20 (19) Método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que la etapa f) se lleva a cabo aplicando cromatografía, preferiblemente la cromatografía se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía en modo mixto, cromatografía de pseudo-afinidad, cromatografía líquido-líquido y cromatografía de exclusión por tamaño, más preferiblemente la cromatografía se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de pseudo-afinidad, cromatografía de afinidad y
25 cromatografía de exclusión por tamaño.

(20) El método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, que comprende una etapa adicional de formular el antígeno viral obtenido hemaglutinina y/o neuraminidasa en una composición farmacéutica.

30 (21) El método de acuerdo con el punto (20), en el que la composición farmacéutica es una preparación de vacuna o un compuesto intermedio de la misma, preferiblemente la composición farmacéutica es una vacuna de virus con envoltura, más preferiblemente la composición farmacéutica es una vacuna de virus de la gripe.

(22) El método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que la etapa g) comprende el uso de una composición que tiene una conductividad en el intervalo de entre igual a o mayor que 3,0 a menor que 5,0 mS/cm, preferiblemente entre igual a o mayor que 3,5 a igual a o menor que 4,7 mS/cm, incluso más preferiblemente en un intervalo de entre igual a o mayor que 3,6 e igual o menor que 4,65 mS/cm, cuando se hace referencia a 25°C.

35 En una realización preferida, la etapa g) comprende una etapa de cromatografía tal como cromatografía de intercambio iónico, y la composición que tiene la conductividad arriba definida es un tampón, por ejemplo, un tampón de carga y/o un tampón de equilibrado que comprende sal, adecuado para uso en combinación con el respectivo método cromatográfico utilizado.

40 La conductividad de la composición puede medirse de acuerdo con cualquier método adecuado que sea conocido por una persona experta en la técnica, por ejemplo, utilizando medios electrónicos tales como un medidor de conductividad.

45 (23) El método de acuerdo con cualquiera de los puntos precedentes, en el que la etapa g) comprende el uso de una composición que tiene una concentración molar en el intervalo de entre igual a o mayor que 1,0 M a igual a o menor que 3,5 M, preferiblemente en el intervalo de entre igual a o mayor que 1,0 M a igual a o menor que 3,0 M, más preferiblemente en un intervalo de entre igual a o mayor que 1,5 M a igual a o menor que 3,0 M, e incluso más preferiblemente en un intervalo de entre igual a o mayor que 1,5 M a igual o menor que 2,6 M, cuando se hace referencia a 25°C. En una realización preferida, la etapa g) comprende una etapa de cromatografía, tal como cromatografía de interacción hidrofóbica, y la composición que tiene la concentración molar arriba definida es un tampón, por ejemplo, un tampón de carga y/o un tampón de equilibrado que comprende sal, adecuado para uso en
50 combinación con el método cromatográfico respectivo. La concentración molar se puede medir por cualquier método adecuado que sea conocido por una persona experta en la técnica.

Utilizando la composición tal como se define en los puntos (22) y/o (23) puede contribuir aún más a un método mejorado para la producción de un antígeno viral, en particular con respecto a la recuperación del antígeno viral.

(24) Uso de un método para la fabricación de una preparación de vacuna que contiene hemaglutinina y/o neuraminidasa derivada de un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en células, que comprende las siguientes etapas, en el orden indicado:

5 i) reducir el volumen de una cosecha líquida que contiene virus con envoltura obtenido a partir de un cultivo de propagación de virus con envoltura basado en células, obteniendo con ello una cosecha líquida concentrada, y

ii) solubilizar el ortomixovirus que está presente en la cosecha líquida mediante la adición de un detergente o una mezcla de detergentes que comprende un detergente catiónico a la cosecha líquida concentrada obtenida en la etapa i),

en el que la etapa i) es seguida directamente por la etapa ii), y

10 en que la reducción del ADN de la célula huésped que está presente en la preparación de la vacuna es al menos 2,5 log, preferiblemente al menos 3,0 log, más preferiblemente al menos 3,5 log, incluso más preferiblemente al menos 4,0 log.

15 La reducción de al menos 2,5 log del ADN de la célula huésped en la preparación de la vacuna se consigue mediante una combinación de las etapas i) y ii) solas, en el mejor de los casos adicionalmente las etapas b), e), f) y/o g) del punto (1). En cualquier caso, etapas adicionales específicas para el ADN, en particular etapas de tratamiento con enzimas digestivas de ADN y cromatografía de separación de ADN (cromatografía de afinidad, cromatografía en gel y similares), y/o etapas de inactivación, no necesariamente o incluso no tienen en absoluto que llevarse a cabo con el fin de lograr la reducción arriba definida del ADN de la célula huésped. Si se llevan a cabo etapas específicas para ADN y/o etapas de inactivación, estas etapas (y por lo tanto todo el método) se pueden
20 llevar a cabo de una manera acusadamente mejorada, p. ej., en términos de economía de proceso tal como, p. ej., es necesaria una cantidad significativamente menor de enzima de digestión de ADN o composición de inactivación con el fin de lograr la reducción de células huésped anterior.

Con respecto a las expresiones "preparación de vacuna", "antígeno viral", "basado en células", "cosecha líquida", "virus envuelto" y el término "detergente" se hace referencia a la memoria descriptiva.

25 En una realización preferida, antes de la etapa i), los desechos celulares y/o microsoportes se separan de la cosecha líquida que contiene el virus envuelto.

(25) Uso de acuerdo con el punto (26), en donde las etapas i) e ii) corresponden a las etapas c) y d) tal como se define en los puntos anteriores.

30 (26) Uso de acuerdo con el punto (24) o (25), en donde antes de la etapa i) se llevan a cabo las etapas a) y b) tal como se define en los puntos anteriores y después de la etapa ii) se llevan a cabo las etapas e), f) y/o g) tal como define en los puntos anteriores.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se describe ahora con más detalle mediante realizaciones y ejemplos preferidos que, sin embargo, se presentan sólo con fines ilustrativos y no se debe entender que limitan el alcance de la presente invención de modo alguno.

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

40 Los virus que se utilizan para la producción de composiciones farmacéuticas tales como preparaciones de vacunas o productos intermedios de las mismas pueden o bien propagarse en sistemas basados en células o basados en huevos. Dependiendo del sistema utilizado respectivamente, dichas composiciones farmacéuticas se clasifican comúnmente como composiciones basadas en huevos o basadas en células. Para preparaciones de vacunas o vacunas, el requisito principal del procesamiento es la separación suficiente de impurezas tales como, en el caso de los sistemas de propagación de virus basados en huevos, las proteínas de huevos embrionarios tales como la ovoalbúmina, así como la separación de virus no producto, y en el caso de sistemas de propagación de virus basados en células, durante el procesamiento se deben cumplir requisitos adicionales tales como una reducción
45 significativa del ADN de la célula huésped y de las proteínas de la célula huésped.

50 En el contexto de la presente invención, se ha encontrado inesperadamente que la combinación de etapas de proceso específicas, llevadas a cabo en un orden definido, proporciona un método mejorado en comparación con los métodos convencionales, por ejemplo con respecto al proceso en sí, p. ej., en términos de simplificación del proceso global, y/o con respecto a los productos obtenidos, p. ej., en términos de calidad, rendimiento y/o pureza. Al llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención, se pueden obtener dichos efectos beneficiosos y sorprendentes, con la condición de que el proceso comprenda una etapa de reducción de volumen de una cosecha líquida que contenga los virus propagados, dando como resultado la concentración del virus (al que también se alude como partículas de virus) y otros constituyentes en dicha cosecha líquida, y una etapa de solubilización que solubiliza el virus que está presente en el volumen reducido de la cosecha líquida. En particular, y distinto de los

procesos de la técnica anterior, una etapa de purificación, presente en el método de acuerdo con la presente invención, tiene lugar sólo después de que se haya completado la etapa de solubilización y, además, se dirige al antígeno viral en lugar de dirigirse a partículas de virus completas. Por lo tanto, aplicando el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se pueden omitir etapa(s) de alta pérdida de producto, laboriosas, largas y costosas de purificación destinadas a la purificación de partículas de virus enteros antes de la solubilización, obteniéndose composiciones con una pureza y un rendimiento satisfactorios. Además, la etapa de solubilización está directamente precedida por la etapa de reducción de volumen. Sin desear estar ligados por teoría alguna, se asume que estas etapas, es decir, la etapa de solubilización que sigue directamente a la etapa de reducción de volumen, pueden contribuir en los efectos beneficiosos, dado que la etapa de concentración c) puede aumentar la concentración del ADN de la célula huésped, lo cual, a su vez, puede ser beneficioso con respecto a la eficacia de precipitación.

Sorprendentemente, y distinto de los métodos convencionales para la producción de composiciones farmacéuticas tales como vacunas que comprenden antígeno viral, el procedimiento de acuerdo con la presente invención representa un procedimiento mejorado y robusto que permite obtener una recuperación mejorada del producto, mientras que al mismo tiempo sólo requiere un número reducido de etapas de procedimiento en comparación con los procedimientos convencionales. Este número reducido de etapas de procedimiento requeridas contribuye adicionalmente a una mayor robustez del procedimiento, así como a una reducción de los costes de producción y el tiempo convencionalmente necesarios para producir composiciones de vacuna. Esto es particularmente útil en caso de un brote pandémico o estacional de una infección por un ortomixovirus tal como la gripe, ya que es necesaria una producción y liberación rápidas de vacunas pandémicas o estacionales en el mercado, y es sumamente útil cuando se producen vacunas utilizando sistemas de cultivo basados en huevos para la propagación de ortomixovirus, que se sabe consume mucho tiempo.

Además, con un número decreciente de etapas de procedimiento aplicadas a la composición farmacéutica, se reduce el estrés impuesto al ortomixovirus y antígenos virales hemaglutinina y/o neuraminidasa que están presentes, lo que puede conducir a una mejora en la eficacia y estabilidad del producto final (p. ej., la vacuna) y productos intermedios del mismo.

Además, aplicando el método de acuerdo con la presente invención, a pesar del número reducido de etapas de procedimiento en comparación con los procedimientos convencionales, se pueden fabricar preparaciones de vacuna que cumplan los requisitos administrativos específicos en cuanto a la cantidad máxima tolerada de contaminaciones de proteínas y ADN. Por ejemplo, para las preparaciones de vacunas contra la gripe, la cantidad máxima de contaminaciones toleradas actualmente (2011) es 120 µg de proteína no hemaglutinina (HA)/dosis y 10 ng de ADN/dosis (en dicha referencia, 1 dosis corresponde a 500 µl de preparación de vacuna). Una ventaja adicional del procedimiento de acuerdo con la presente invención es que puede aplicarse independientemente del virus que se propague en un sistema basado en células o en un sistema basado en huevos. Por lo tanto, por ejemplo, si se utiliza un sistema basado en células para la propagación de ortomixovirus, el método de acuerdo con la presente invención proporciona una reducción significativa de contaminaciones de ADN de la célula huésped, y si se utiliza un sistema basado en huevos para la propagación del virus, el método proporciona una reducción de contaminaciones que resultan del cultivo de los huevos.

Debido a la recuperación potenciada del antígeno viral hemaglutinina y/o neuraminidasa producido, se puede preparar un número incrementado de dosis de vacuna por lote de producción. Esto puede ser, por ejemplo, particularmente beneficioso en caso de altas exigencias en preparaciones de vacunas, como es el caso, p. ej., en el caso de brotes de gripe estacional.

Como una vacuna típica y beneficiosa, la vacuna es una vacuna de subunidades contra la gripe.

Además, el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede hacer frente a variaciones de cepas de virus, lo que significa que el procedimiento depende menos de la cepa. Esto es particularmente útil cuando se utilizan virus que exhiben una deriva constante y un desplazamiento del genoma, tal como los virus de la gripe.

En conjunto, el método de acuerdo con la presente invención puede proporcionar un método notablemente mejorado, p. ej., con respecto a la robustez, recuperación del producto, tiempo y costes de producción, y contaminaciones que están presentes en el producto final o productos intermedios del mismo.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de hemaglutinina y/o neuraminidasa derivada de ortomixovirus, que comprende las siguientes etapas en el orden indicado:

- a) proporcionar un fluido derivado de un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en células o un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en huevos que comprende dicho virus,
- b) clarificar el fluido que comprende ortomixovirus aplicando centrifugación, filtración de flujo tangencial o filtración profunda, dando como resultado una cosecha líquida que comprende dicho virus,

- c) reducir el volumen de la cosecha líquida obtenida después de la etapa b) en un factor de al menos 4 para obtener una cosecha líquida concentrada, en donde esta etapa reductora del volumen se lleva a cabo en un solo paso,
 - 5 d) solubilizar el ortomixovirus que está presente en la cosecha líquida mediante la adición de un detergente o una mezcla de detergentes que comprende un detergente catiónico a la cosecha líquida concentrada obtenida en la etapa c), en donde la concentración final de dicho detergente catiónico es al menos de 2000 µg/ml,
 - e) separar núcleos virales de la composición obtenida después de la etapa d),
 - f) separar opcionalmente el detergente catiónico de la composición obtenida después de la etapa e),
 - 10 g) purificar hemaglutinina y/o neuraminidasa aplicando cromatografía,
- en donde la etapa c) es seguida directamente por la etapa d),
y en donde antes de la etapa d) no se lleva a cabo etapa de purificación alguna que esté dirigida a purificar específicamente ortomixovirus.

El antígeno viral es un ortomixovirus, tal como de la gripe A, gripe B o gripe C.

- 15 En la etapa a) del método de acuerdo con la presente invención, se proporciona un fluido que comprende el ortomixovirus arriba descrito. Este fluido se deriva de un cultivo de propagación de un ortomixovirus basado en células o de un cultivo de propagación de un ortomixovirus basado en huevos. Como es sabido por una persona experta en la técnica, los virus, tales como los virus con envoltura arriba definidos, se pueden propagar en sistemas de cultivo basados en células o en sistemas de cultivo basados en huevos. Líneas celulares adecuadas utilizadas para cultivar virus tales como los virus de la gripe son típicamente de origen mamífero y, por lo tanto, representan una línea celular de mamífero, preferiblemente una línea celular de un animal. Líneas celulares de animales adecuadas son conocidas por una persona experta en la técnica y pueden incluir líneas celulares de hámster, ganado, primates (incluidos seres humanos y monos) y de origen de perro. En determinadas realizaciones, las células de la línea celular de mamífero se seleccionan del grupo que consiste en Vero, PerC6, BHK, 293, COS, PCK, MRC-5, MDCK, MDBK y WI-38, preferiblemente las células son células MDCK. Los virus pueden cultivarse en células de acuerdo con cualquier método adecuado que sea conocido por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, los virus se pueden cultivar en cultivo celular adherente o en cultivo celular en suspensión. En una realización, las células se cultivan en microsopos. En una realización adicional, las células también pueden adaptarse para crecer en suspensión. Para sistemas de cultivo basados en células, se puede utilizar cualquier medio adecuado. En una realización preferida, las células se cultivan en medio libre de suero y/o libre de proteínas. Para la propagación de virus basada en células, habitualmente, el virus o la preparación del virus vivo, respectivamente, se inocula en el cultivo celular en donde se multiplica. La propagación del virus puede realizarse de forma discontinua, o por lotes de alimentación, o por perfusión. Después de 2-5 días a 25-37 C, la propagación del virus se detiene generalmente. El fluido que contiene virus contenido en el biorreactor de propagación de virus puede alimentarse directamente en su proceso de purificación o transferirse a un recipiente separado. Luego, el fluido que contiene el virus en el recipiente separado es alimentado en un proceso de purificación de la vacuna.

- Alternativamente, los virus pueden propagarse en sistemas basados en huevos. En una fabricación basada en huevos, habitualmente el virus de la semilla de trabajo se inyecta en huevos de gallina embrionados. Los virus comienzan a propagarse en el líquido alantoideo (clara de huevo) del huevo para aumentar la cantidad de virus. Después de dos a tres días de incubación, los huevos se enfrían rápidamente a 2-8 C y el fluido alantoideo de los huevos individuales se recolecta y sondea utilizando sistemas de cosecha al vacío manuales o automáticos. El virus recogido que contiene fluido alantoideo es el fluido basado en huevos que comprende el virus y se procesa adicionalmente en el proceso de purificación posterior.

- 45 Dependiendo del sistema de cultivo utilizado para la propagación del virus, el fluido que comprende las partículas virales propagadas puede contener diferentes contaminantes. Por ejemplo, contaminantes potenciales que están presentes en el cultivo basado en huevos son proteínas basadas en huevos tales como albúmina de huevo o antibióticos, mientras que una contaminación típica que está presente en cultivos basados en células es ADN residual de la célula huésped. Ventajosamente, el método de acuerdo con la presente invención no está restringido con respecto al sistema utilizado para la propagación del ortomixovirus; más bien, los efectos beneficiosos se pueden alcanzar cuando se utiliza fluido que comprende ortomixovirus propagados en sistemas de cultivo basados en células y también en sistemas de cultivo basados en huevos.

- El fluido en la etapa a) puede producirse utilizando un biorreactor desechable. Al utilizar un biorreactor desechable, por ejemplo el propio producto obtenido se puede mejorar, p. ej., en términos de calidad y/o pureza. Esto es, en particular, beneficioso si el método se lleva a cabo a gran escala, p. ej., a escala industrial.

- 55 El fluido que comprende el ortomixovirus con envoltura se somete a una etapa de clarificación. La etapa de clarificación se lleva a cabo en el fluido que comprende partículas de virus, pero no en materia sedimentada o

- depositada de otro modo. Dentro del significado de la presente invención, el propósito de esta etapa de clarificación es separar la materia en partículas del fluido, tal como desechos celulares, impurezas de proteínas y/o material de soporte utilizado para cultivar células, tales como microsoportes. Dentro del significado de la presente invención, la etapa de clarificación, p. ej., separa la materia en partículas del fluido, pero retiene más del 80% de los antígenos virales del ortomixovirus. Las impurezas de proteínas pueden ser, por ejemplo, alantoína, colágeno y/o albúmina tal como ovoalbúmina. Para la clarificación se puede utilizar cualquier medio o método adecuado que sea conocido por una persona experta en la técnica. En la presente invención, se aplica filtración de flujo tangencial (TFF), filtración en profundidad o centrifugación. De ese modo, los ajustes de cada uno de los medios de clarificación aplicados respectivamente (TFF, filtración en profundidad, centrifugación) se eligen de tal forma que se alcanza el propósito arriba indicado. En general, y dado este propósito, dichos ajustes para cada uno de los medios respectivos son conocidos por una persona experta en la técnica. En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, cuando se aplica la centrifugación, se puede aplicar una fuerza centrífuga igual o inferior a 10000 g durante un período de tiempo igual o inferior a 2 minutos (min). Aplicar menos fuerza centrífuga durante un período de tiempo igual o inferior a 2 minutos en esta etapa de clarificación, p. ej., igual a o menor que 1000 g, preferiblemente igual a o menor que 500 g, más preferiblemente igual a o menor que 300 g, incluso más contribuye a los efectos beneficiosos de la presente invención, por ejemplo, puede contribuir a una recuperación mejorada adicional del antígeno viral. En cuanto a los parámetros adicionales cuando se aplica la centrifugación, así como con respecto a los parámetros para la filtración de flujo tangencial o filtración en profundidad, se hace referencia a otra parte en esta memoria descriptiva.
- 20 Dentro del significado de la presente invención, el fluido clarificado obtenido se denomina "cosecha líquida".
- Un aspecto clave del método de acuerdo con la presente invención es la reducción del volumen del fluido clarificado que contiene las partículas de ortomixovirus propagadas, seguido directamente de una etapa de solubilización/tratamiento con detergente de las partículas virales que están presentes en la cosecha líquida de volumen reducido, concentrada. Sorprendentemente, se ha encontrado que esta reducción del volumen, seguida directamente del tratamiento de las partículas de ortomixovirus con detergente tal como se describe en otra parte de esta memoria, conduce a una recuperación mejorada y, por lo tanto, a un rendimiento mejorado del antígeno viral. Además, se ha encontrado, sorprendentemente, que si la propagación del ortomixovirus se ha llevado a cabo con sistemas basados en células, se puede alcanzar una reducción potenciada inesperada del ADN de la célula huésped.
- 30 Dentro del significado de la presente invención, la expresión "seguido directamente" designa que, p. ej., no se llevan a cabo etapas de tratamiento o no se llevan a cabo etapas de purificación activas especiales entre las etapas c) y d). Esto significa que, p. ej., no se llevan a cabo etapas de tratamiento para la cosecha líquida entre las etapas c) y d), por ejemplo, no se lleva a cabo etapa de inactivación o purificación alguna. Esto también puede significar que no se toman más reactivos o se agregan a la cosecha líquida entre las etapas c) y d). En otro aspecto, la etapa b) es seguida directamente de la etapa c) que es seguida directamente seguido de la etapa d). Esto puede contribuir adicionalmente a una mejora del método de la presente invención, p. ej., en términos de simplificación, o en términos de eficacia de tiempo y reducción de costes, mientras sigue siendo alta la recuperación, el rendimiento y/o la pureza del producto (antígeno viral).
- 40 La inactivación conduce a la eliminación de la infectividad del virus y típicamente se lleva a cabo mediante el tratamiento de virus con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes medios químicos: detergentes, formaldehído, β -propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifulereño (C60), etilamina binaria, acetil-etilenimina o combinaciones de los mismos. La persona experta en la técnica conoce métodos adicionales de inactivación, y éstos comprenden, por ejemplo, tratar virus con medios físicos tal como irradiación gamma y/o luz UV.
- 45 En determinadas realizaciones de la presente invención, no se lleva a cabo inactivación alguna aplicando el mismo detergente que se utiliza para solubilizar el ortomixovirus (etapa d)).
- En realizaciones adicionales de acuerdo con la presente invención, no se lleva a cabo inactivación alguna, particularmente inactivación alguna que incluye el tratamiento de ortomixovirus con formaldehído, β -propiolactona y/o luz UV (tal como UV-C), preferiblemente con formaldehído y/o β -propiolactona, antes de la etapa d). En otro aspecto, es posible aplicar una etapa de inactivación de los ortomixovirus después de la etapa de solubilización del ortomixovirus, es decir, después de la etapa d). En un aspecto incluso más amplio, no se lleva a cabo etapa de inactivación alguna durante las etapas a) a f). Esto puede contribuir adicionalmente a una mejora del método de acuerdo con la presente invención, p. ej., en términos de costes y/o trabajo. A veces, la β -propiolactona también se utiliza para la inactivación del ADN residual de la célula huésped que puede estar presente si la propagación del virus se ha llevado a cabo en sistemas basados en células. Sin embargo, la β -propiolactona es un agente alquilante que no solo alquila ADN, sino también los antígenos producto (antígenos virales) y, por lo tanto, podría influir negativamente en la calidad, p. ej., en términos de estabilidad y/o inmunogenicidad, de dichos antígenos. Por lo tanto, es una ventaja del método de acuerdo con la presente invención que, sorprendentemente, a pesar de la omisión de agentes de inactivación tales como β -propiolactona, se puede cumplir con los límites de las impurezas máximas permitidas de ADN de la célula huésped en el producto final (tal como preparación de la vacuna).

La concentración de la cosecha líquida en la etapa c) se puede lograr mediante métodos adecuados. Dichos métodos están dirigidos a reducir el volumen de la cosecha líquida. No es el propósito de esta etapa purificar específicamente partículas de ortomixovirus, es decir, esta etapa no es una etapa de purificación principal. Más bien, esta etapa tiene como objetivo reducir el volumen de la cosecha líquida que comprende la partícula de ortomixovirus para obtener una cosecha líquida concentrada.

Durante la etapa de reducir el volumen, puede suceder que pequeñas impurezas se separen de la cosecha viral líquida. Las pequeñas impurezas son cualquier materia tal como moléculas, partículas o componentes del medio, que tienen un tamaño que está por debajo del virus con envoltura, preferiblemente por debajo de aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 500 kDa, incluso más preferiblemente por debajo de aproximadamente 300 kDa. Esta separación de pequeñas impurezas, si tiene lugar, sólo se basa en el tamaño de las impurezas separadas, sin embargo, no en la densidad de las impurezas. Una separación de impurezas que no sólo se basa en el tamaño de dichas impurezas, sino también en la densidad de dichas impurezas, tiene lugar cuando se llevan a cabo métodos de purificación que comprenden gradientes, tales como centrifugaciones en gradiente. Un ejemplo de una centrifugación en gradiente es la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. La etapa de reducción del volumen, p. ej., contribuye a obtener una recuperación mejorada de antígenos virales y/o una separación mejorada del ADN de la célula huésped.

En una realización preferida, el volumen se puede reducir aplicando ultrafiltración TFF o ultrafiltración TFF y diafiltración en una etapa (ultrafiltración/diafiltración TFF), ultracentrifugación o precipitación, preferiblemente se utiliza ultrafiltración TFF con el fin de reducir el volumen. Con ello, los ajustes de cada uno de los medios de concentración aplicados respectivamente (TFF, ultrafiltración/diafiltración de TFF, ultracentrifugación o precipitación) se eligen de tal manera que se alcanza el propósito arriba indicado, es decir, la reducción del volumen y la concentración de las partículas de virus. En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, la reducción del volumen se alcanza aplicando ultrafiltración/diafiltración de TFF utilizando membranas de corte de 50 kDa-1000 kDa, preferiblemente 100 kDa-300 kDa, y preferiblemente no menores que 50 kDa.

En una realización, cuando se utiliza la ultracentrifugación para reducir el volumen, las condiciones de la ultracentrifugación pueden ser, por ejemplo, 30,000 g-200,000 g de RCF durante más de 10 min.

En una realización, si la concentración se lleva a cabo aplicando precipitación, una persona experta en la técnica conoce productos químicos adecuados, que pueden ser, por ejemplo, sal, alcohol metílico y etílico y polietilenglicol, en una concentración respectivamente apropiada. Los productos químicos adecuados a una concentración apropiada precipitan el producto, p. ej., las partículas que contienen antígeno viral, pero tienen un efecto negativo nulo o mínimo sobre dichos antígenos virales. Los productos químicos se eligen de modo que no reaccionen con los antígenos deseados hemaglutinina y/o neuraminidasa, es decir, los antígenos ortomixovirales y no alteren la inmunogenicidad de los antígenos deseados.

También se prefiere que la etapa de reducción del volumen en la etapa c) no se lleve a cabo utilizando un método de centrifugación en gradiente de densidad tal como ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Una ultracentrifugación en gradiente es una etapa de procedimiento de alto costo y laboriosa que requiere un alto nivel de mantenimiento, y la operación es costosa. Por lo tanto, al omitir la etapa de ultracentrifugación en gradiente, el procedimiento puede mejorarse, por ejemplo, en términos de costos de producción y mano de obra reducidos.

En una realización de la presente invención, el volumen se reduce en un factor de al menos 5, o al menos 9, también preferiblemente al menos 12, también preferiblemente al menos 13, o al menos 15, y también preferiblemente al menos 20, o al menos 25. Una reducción del volumen máxima típica es 30, 35, 40 o 45. Se ha encontrado en la presente invención que al reducir el volumen en un factor tal como se indica en esta memoria, en particular en combinación con un detergente en una concentración tal como se indica a continuación, contribuye adicionalmente a una mejora de la recuperación del antígeno viral hemaglutinina y/o neuraminidasa. Además, si se utiliza un sistema basado en células para la propagación de ortomixovirus, se puede alcanzar una reducción inesperadamente potenciada del ADN de la célula huésped, p. ej., una reducción de al menos 2,5 log.

Este volumen reducido y concentrado que comprende partículas de ortomixovirus se somete directamente a una etapa de solubilización. Los antígenos virales hemaglutinina y/o neuraminidasa pueden estar presentes en diferentes formas tales como partículas grandes en agregados y/o unidas a células y desechos celulares, virus de forma filamentosa, partículas de virus esféricas intactas y libres, fragmentos de virus y antígenos virales sueltos que no están asociados con virus. La etapa de solubilización se lleva a cabo con el fin de liberar los antígenos virales de las diferentes estructuras.

La solubilización del ortomixovirus que está presente en la cosecha líquida se lleva a cabo mediante la adición de un detergente, o mezcla de detergentes, que comprende o consiste en un detergente catiónico para la cosecha líquida obtenida después de la etapa c). Los detergentes catiónicos son conocidos por una persona experta en la técnica y están basados, p. ej., en cationes de amonio cuaternario tales como bromuro de cetiltrimetilamonio u otras sales de alquil-trimetilamonio, sales de alquilamina tales como acetato de estearilamina o acetato de alquilamonio de coco, cloruros y bromuros de benzalconio, por ejemplo cloruro de bencetonio o cloruro de metilbencetonio, estearilaminopoliglicoléter u oleilaminopoliglicoléter, en donde se prefiere CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). De

manera adicionalmente preferida se utiliza una mezcla de al menos dos detergentes. Preferiblemente, la mezcla de detergentes comprende o consiste en detergentes catiónicos y no iónicos. Preferiblemente, la mezcla de detergentes comprende o consiste en un detergente catiónico, preferiblemente CTAB, y un detergente no iónico tal como óxido de alquilpolietileno, alquilpoliglicósido, que incluye: octilglicósido y decilmaltósido, p. ej., tensioactivos nonidet P10 o nonidet P40, MEGA-8, -9 o -10, Triton X 100 y detergentes o polisorbatos relacionados tales como detergentes de la familia Tween tales como Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, APO-10, APO-12, C8E6, C10E6, C12E6, C12E8, C12E9, C12E10, C16E12, C16E21, heptano-1,2,3-triol, lubrol PX, familia de genapol, n,-dodecil-b-D-glucopiranosido, thesit, familia plurónica, etc.; preferiblemente, se utiliza un polisorbato tal como polisorbato 80.

Múltiples detergentes se pueden añadir como una premezcla (lo que significa que están presentes en una mezcla) o se añaden por separado, pero al mismo tiempo o directamente uno después del otro. Se prefiere no llevar a cabo un intercambio de detergente en el que se separe un primer detergente antes de la adición de un segundo detergente.

La cantidad total, es decir, la concentración final, de detergente(s) catiónico(s), preferiblemente CTAB, es alta, lo que significa que es mayor que la cantidad final que se utiliza típicamente para propósitos de solubilización. Por lo tanto, la concentración final es de al menos aproximadamente 2000 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 2500 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 3000 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 3500 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 4000 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 4500 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 5000 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 5500 µg/ml y también se prefiere al menos aproximadamente 6000 µg/ml. Una posible cantidad máxima de detergente(s) catiónico(s) es aproximadamente 8000 µg/ml, también se prefiere aproximadamente 7000 µg/ml, también se prefiere aproximadamente 6000 µg/ml. Intervalos particularmente preferidos son aproximadamente 4000 µg/ml - aproximadamente 6000 µg/ml, aproximadamente 4500 µg/ml - aproximadamente 6000 µg/ml, aproximadamente 4000 µg/ml - aproximadamente 5000 µg/ml, aproximadamente 4500 µg/ml - aproximadamente 5000 µg/ml.

La cantidad total, es decir, la concentración final, de detergente(s) no iónico(s), preferiblemente polisorbato, es al menos aproximadamente 300 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 500 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 800 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 900 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 1000 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 1200 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 1400 µg/ml, también se prefiere al menos aproximadamente 1800 µg/ml. Una cantidad máxima preferida de detergente(s) no iónico(s) es aproximadamente 4000 µg/ml. también se prefiere aproximadamente 3000 µg/ml, también se prefiere aproximadamente 2000 µg/ml. Intervalos particularmente preferidos son aproximadamente 300 µg/ml - aproximadamente 1500 µg/ml, aproximadamente 300 µg/ml - aproximadamente 1100 µg/ml, aproximadamente 900 µg/ml - aproximadamente 1500 µg/ml, aproximadamente 900 µg/ml - aproximadamente 1200 µg/ml.

En una realización adicional, la cosecha viral líquida se reduce en un factor de al menos 20 en presencia de una concentración final de detergente catiónico de al menos 5000 µg/ml, o la cosecha se reduce en un factor de al menos 15 en presencia de una concentración final de detergente catiónico de al menos 4000 µg/ml, o la cosecha se reduce en un factor de al menos 10 en presencia de una concentración final de detergente catiónico de al menos 2500 µg/ml.

Al aplicar estas condiciones, se pueden lograr resultados particularmente beneficiosos con respecto a la recuperación del producto. Además, si se utiliza un sistema basado en células para la propagación del ortomixovirus, además de la recuperación potenciada del producto, se puede lograr una reducción potenciada de las impurezas del ADN de la célula huésped.

La solubilización puede llevarse a cabo en condiciones que sean adecuadas con el fin de lograr la solubilización de esencialmente todas, preferiblemente todas las partículas virales que están presentes en la cosecha líquida concentrada. En una realización preferida, la solubilización se lleva a cabo incubando la cosecha viral concentrada entre 0,2 h y 20 h a por encima de 0°C, preferiblemente a una temperatura de 2°C a 30°C, preferiblemente entre 0,5 h y 6,0 h a una temperatura de 2-25°C, más preferiblemente a una temperatura de 2-8°C.

Cuando se utiliza un sistema basado en células para la propagación del ortomixovirus, se prefiere no añadir nucleasa, p. ej., una DNasa, tal como Benzonase®, antes de la etapa d), o durante todas las etapas a) a f). En la técnica anterior, el fluido que comprende virus o la cosecha líquida se trata con nucleasa y/o mediante β-propiolactona (BPL) y/o mediante ultracentrifugación zonal y/o llevando a cabo etapas de cromatografía con el fin de degradar y/o separar ácidos nucleicos de las células huéspedes y, por lo tanto, minimizar las impurezas del ADN de la célula huésped. Por ejemplo, para los procesos de purificación basados en la gripe, a menudo se debe lograr una reducción de más de 4 log del ADN de la célula huésped con el fin de cumplir con las regulaciones administrativas. Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que aplicando el método de la invención se puede lograr una reducción suficientemente alta del ADN de la célula huésped para cumplir con las regulaciones administrativas, incluso sin tratamiento con nucleasas tal como el tratamiento con Benzonase®. Esto mejora significativamente el procedimiento en términos de eficacia de costos y tiempo. Además, el tratamiento con BPL no es necesario y puede limitarse a los casos deseados, si corresponde. En determinadas realizaciones, no se lleva a cabo tratamiento con BPL alguno antes de la etapa d), en determinadas realizaciones no se lleva a cabo ningún tratamiento con BPL.

Después de la etapa d), se puede llevar a cabo una etapa e) de separar de la composición los núcleos virales obtenidos después de la etapa d). La separación de los núcleos virales se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado que dé como resultado dicha separación deseada.

5 En una realización de la presente invención, esta etapa de separación se lleva a cabo mediante la sedimentación de los núcleos virales, p. ej., mediante ultracentrifugación (sin embargo, en una realización preferida no mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad). Las proteínas de la superficie viral, p. ej., las proteínas (de la superficie) virales de la gripe tales como HA, NA (neuraminidasa) o proteína M, permanecen en el sobrenadante y pueden someterse a etapas de procedimiento adicionales con el fin de finalmente llegar a las vacunas de virus de subunidad. Por ejemplo, las condiciones de centrifugación elegidas para sedimentar los núcleos virales son conocidas por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, la ultracentrifugación puede ser en lotes o en continuo, y las condiciones de ultracentrifugación utilizadas son de 30,000 g durante más de 10 minutos (min), a 10 200,000 g durante más de 10 min., respectivamente a una temperatura adecuada, tal como a 2-25°C, más preferiblemente a 2-8°C. En una realización, las condiciones de ultracentrifugación para sedimentar los núcleos virales obtenidos son 100.000 g durante 30 min en un intervalo de temperaturas de 2-8°C.

15 En una realización adicional, después de la etapa d) y antes de la etapa g), se puede separar el detergente derivado de la etapa d). Esta separación de detergente puede llevarse a cabo mediante cualquier método que sea adecuado para este fin, por ejemplo, mediante tratamiento con Amberlite o TFF. Cuando se utiliza el tratamiento con Amberlite, y después de que se ha llevado a cabo la etapa e), en una realización preferida el Amberlite se añade al sobrenadante recogido después de haber sedimentado los núcleos virales en una relación de la masa de Amberlite a la masa de los detergentes catiónicos de aproximadamente 100:1, incubado a una temperatura adecuada tal como una temperatura que está en el intervalo de entre 2-8°C, durante un tiempo adecuado, p. ej., de 8 a 24, adecuadamente durante 16 horas. Luego, el Amberlite se separa mediante cualquier método adecuado que sea conocido por una persona experta en la técnica tal como utilizando filtración de flujo convencional/filtración sin salida, tamices o TFF. Cuando se utiliza un filtro, éste debe elegirse de tal manera que sea capaz de retener 20 partículas que sean mayores que 5 µm o mayores que 7 µm. Además, el Amberlite se puede separar mediante el uso de tamices. La abertura de los tamices apropiados está en el intervalo de 30-200 µm, preferiblemente menos de 150 µm, más preferiblemente menos de 100 µm, incluso más preferiblemente alrededor de 50 µm. En una realización, para la separación del o de los detergentes no se utiliza cromatografía.

25 Finalmente, en la etapa g), que representa la etapa de purificación principal o el método de purificación principal, respectivamente, se purifica el antígeno hemaglutinina y/o neuraminidasa de ortomixovirus.

La purificación del antígeno viral hemaglutinina y/o neuraminidasa se puede llevar a cabo mediante cualquier método que sea adecuado para purificar específicamente el antígeno viral a partir de la composición obtenida después de la etapa e) o, si la etapa f) se ha llevado a cabo, después de la etapa f). Métodos de purificación 35 preferidos son métodos de purificación tales como métodos cromatográficos, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de pseudo-afinidad, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquido-líquido y similares. En una realización, los métodos de purificación preferidos son la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica.

El procedimiento de la presente invención se puede utilizar como parte de un procedimiento de producción global de preparación de una vacuna subunidad de ortomixovirus, preferiblemente una vacuna subunidad de la gripe.

40 La presente invención se refiere, además, al método de acuerdo con la presente invención en donde el método se utiliza en la producción de vacunas subunidad de la gripe.

La presente invención se refiere, además, a un método tal como se describe en esta memoria, que comprende, además, una etapa adicional de formular el antígeno viral purificado obtenido, hemaglutinina y/o neuraminidasa, en una composición farmacéutica, en donde, preferiblemente, la composición farmacéutica es una preparación de 45 vacuna o un producto intermediario de la misma. En una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica es una vacuna de la gripe. Esta o estas etapas adicionales es (son) (a) etapa(s) que pueden tener que llevarse a cabo con el fin de llegar a composiciones farmacéuticas. Una etapa de este tipo puede ser, por ejemplo, una etapa de inactivación de virus tal como una etapa de irradiación, p. ej., una etapa de irradiación UVC. En general, una etapa de este tipo asegura que el antígeno viral sea inactivo y esté libre de virus contaminantes activos. 50 Para minimizar la contaminación microbiana, es posible que se deba llevar a cabo, p. ej., una reducción de la carga biológica. Además, por ejemplo, si el antígeno viral tiene que formularse en una vacuna de virus, es posible que el o los adyuvantes se tengan que añadir en una determinada concentración. Una etapa adicional puede ser la adición de antígeno viral adicional, tal como el antígeno viral derivado de otra cepa de virus. Una etapa adicional puede ser la adición de tampón y/o la inclusión de conservante. Una etapa adicional puede ser una etapa de aclaramiento o 55 una etapa de filtración en condiciones estériles.

La expresión "composición farmacéutica" designa una composición que puede utilizarse en, o sobre el cuerpo para prevenir, diagnosticar, aliviar, tratar o curar una enfermedad en seres humanos o animales. Preferiblemente, una composición farmacéutica de este tipo es una preparación de vacuna o un producto intermedio de la misma, más preferiblemente una preparación de vacuna de virus con envoltura tal como una preparación de vacuna contra el

virus de la gripe, incluyendo, p. ej., una vacuna contra el virus de la gripe estacional, pandémico o epidémico. Ejemplos de una preparación de vacuna contra la gripe pandémica o epidémica son una preparación de vacuna contra el virus de la gripe aviar, humana o porcina.

5 La presente invención también se refiere a un método para la fabricación de una preparación de vacuna que contiene una hemaglutinina y/o neuraminidasa derivada de un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en células, que comprende las etapas a) a g) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y una etapa de formular la hemaglutinina y/o neuraminidasa purificada, obtenida, en una preparación de vacuna.

Con respecto a las expresiones "preparación de vacuna", "antígeno viral hemaglutinina y/o neuraminidasa", "basado en células", "cosecha líquida", "ortomixovirus" y "detergente" se hace referencia a la memoria descriptiva.

10 Sorprendentemente, se ha encontrado que al utilizar el método anterior en la fabricación de una preparación de vacuna, la contaminación del ADN de la célula huésped puede reducirse significativamente.

Descripción de las figuras

15 **Fig. 1:** Esta figura muestra el efecto de la concentración de CTAB y del factor de concentración global, es decir, la concentración final de la cosecha después de que se ha añadido el detergente CTAB, en la recuperación del antígeno de superficie principal HA. La Fig. 1 representa un ejemplo de muchos resultados y gráficos.

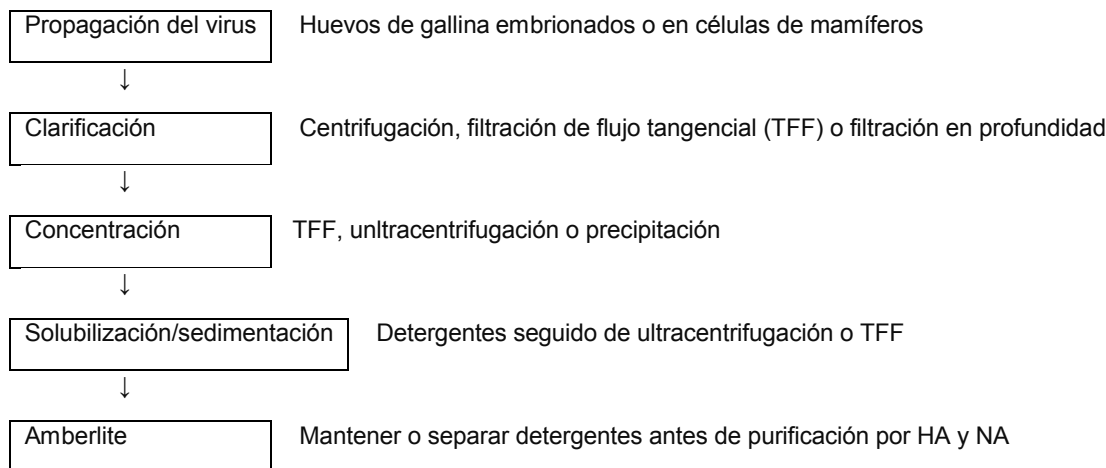
Fig. 2: Esta figura muestra el efecto de la concentración de CTAB y el factor de concentración global, es decir, la concentración final de la cosecha después de que se ha añadido el detergente CTAB, en la reducción de ADN. La Fig. 2 representa un ejemplo de muchos resultados y gráficos.

EJEMPLOS

20 *Ejemplo 1*

Este ejemplo demuestra cómo procesar la cosecha del virus de la gripe en el producto intermedio parcialmente purificado de los antígenos de superficie viral Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) con una pérdida de producto mínima y con una reducción logarítmica de más de tres en el ADN de la célula huésped. El producto intermedio obtenido se purificará adicionalmente utilizando cromatografía.

25 Se proporciona una descripción general de las etapas de procedimiento en el siguiente flujo de trabajo:



30 El virus de la gripe se propagó en las células MDCK. Las cosechas se clarificaron por centrifugación a 3220 g durante 8 min. La cosecha clarificada se concentró aproximadamente 4 - 13,7 veces por TFF utilizando un casete de 100 kD - 300 kD. La cosecha clarificada y concentrada se solubilizó utilizando 2400-3000 µg/ml de CTAB y 600-90 µg/ml de Tween-80 a 2-8°C. La cosecha clarificada, concentrada y solubilizada se centrifugó a 100.000 g durante 30 min a 2-8°C. Se recogió el sobrenadante. Se añadió Amberlite al sobrenadante recogido en la relación de la masa de Amberlite a la masa de CTAB de 100:1. Después de incubar a 2-8°C durante 16 h, se separó el Amberlite añadido filtrando la suspensión a través de filtros de 5 µm. El filtrado es el producto intermedio parcialmente purificado de los antígenos de superficie virales Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA). La HA se midió por inmunodifusión radial simple (SRD) y el ADN se midió por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Los resultados se representan a continuación:

Recuperación HA de A/Uruguay X-175C, clarificación a 3220 g durante 8 min, cosecha 10 veces concentrada utilizando casete de 300 kDa, solubilizada a 900 µg/ml de Tween-80 y 3000 µg/ml de CTAB, centrifugada a 100.000 g durante 30 min y tratada con Amberlite. Después de corregido para la dilución introducida durante la solubilización, el factor de concentración total es 4 veces:

Muestra	HA [µg/ml]	Recuperación total de HA [%]
Cosecha	32	
Filtrado de cosecha clarificada, 10 veces concentrada, solubilizada, centrifugada, tratada con Amberlite. Factor de concentración total es 4	120	92%

5

Recuperación HA de B/Malaysia/2506/2004W, condición de clarificación 300 g durante 2 min, cosecha 4 veces concentrada utilizando casete de 100 kDa, solubilizada a 600 µg/ml de Tween-80 y 2400 µg/ml de CTAB, centrifugada a 100.000 g durante 30 min y tratada con Amberlite. Después de corregido para la dilución introducida durante la solubilización, el factor de concentración total es 1,8x:

Muestra	HA [µg/ml]	Recuperación total de HA [%]
Cosecha	25	100%
Cosecha clarificada y 4 veces concentrada (100 kDa)	93,5	94%
Filtrado de cosecha clarificada, concentrada, solubilizada, centrifugada, tratada con Amberlite. El factor de concentración total es 1,8 veces.	42	93%

10

Recuperación HA de A/California X-179A. Condición de clarificación: 300 g durante 2 min, cosecha 13,7 veces concentrada utilizando casete de 100 kDa, solubilizada a 900 µg/ml de Tween-80 y 3000 µg/ml de CTAB, centrifugada a 100.000 g durante 30 min y tratada con Amberlite. Después de corregido para la dilución introducida durante la solubilización, el factor de concentración total es 4,8 veces:

Muestra	HA [µg/ml]	Recuperación total de HA [%]	ADN [ng/ml]	ADN Reducción Log
Cosecha	25	100%	72513	0
Cosecha clarificada y 13,7 veces concentrada (100 kDa)	292	85%	42187	1,4
Filtrado de cosecha clarificada, concentrada, solubilizada, centrifugada, tratada con Amberlite, el factor de concentración total es 4,8 veces.	112	93%	53	3,8

15

Ejemplo 2

El Ejemplo 2 demostró que los antígenos HA y NA del filtrado de la cosecha de Amberlite clarificada, concentrada y solubilizada se pueden purificar suficientemente mediante cromatografía de intercambio iónico de modo que su proteína total (TP)/100 µg de HA sea inferior a 240 µg/100 µg de HA y su ADN de célula huésped sea inferior a 20 ng/100 µg de HA. El antígeno NA se co-purifica junto con antígenos HA.

20

El virus de la gripe se propagó en células MDCK. Las cosechas se clarificaron por centrifugación a 300 g durante 2 min o a 3220 g durante 8 min. Las cosechas clarificadas se concentraron aproximadamente 10 veces mediante TFF utilizando un casete de 300 kD. Las cosechas clarificadas y concentradas se solubilizaron utilizando 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween-80 a 2-8°C. Las cosechas clarificadas, concentradas y solubilizadas se centrifugaron a 100.000 g durante 30 min a 2-8°C. Se recogieron los sobrenadantes. Se añadió Amberlite al sobrenadante recogido en una relación de la masa de Amberlite a la masa de CTAB de 100:1. Después de incubar a 2-8°C durante 16 h, el Amberlite añadido se separó haciendo pasar la suspensión a través de filtros de 5 µm de profundidad. El filtrado se acondicionó antes de ser cargado en columnas de cromatografía Capto® Q. Después de lavar con tampones de

25

carga, se eluyeron los antígenos HA y NA. El flujo, el lavado y la elución se fraccionaron. En base a la señal UV, se seleccionaron varias fracciones para HA-SRD, NA, ADN, análisis de proteína total. Los resultados se indican a continuación:

Capto Q

Cepa	Conductividad de carga y Tampón de equilibrado	pH de carga y Tampón de equilibrado	Recuperación de HA de fracción de elución recogida	Proteína total $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de HA	ADN mg/100 μg de HA	NA
A/California X-179-A	6	8	45%	104	4	No medido
A/Uruguay X-175-C	5	7,3	55%	208		No medido
A/California X-179-A	4,65	8	92%	225	≥ 1	presente
A/California X-179-A	3,6	8	91%	189	≥ 1	presente
A/California X-179-A	3,9	8	85%	189	≥ 1	presente

5 Como se observa, la recuperación de HA de A/California fue influenciada por la conductividad. Cuando la conductividad está en el intervalo de 3,6-4,65 mS/cm, la recuperación de HA estaba entre 85% -92%. Teniendo en cuenta la recuperación de HA de la preparación de la carga de la etapa de cromatografía, las etapas clarificada, concentrada, solubilizada y de Amberlite, la recuperación total de HA puede ser de aproximadamente 80% para A/California. NA se co-purificó junto con antígenos HA. El contenido de ADN y TP de la célula huésped cumplió con sus especificaciones.

15 Para A/Uruguay, la recuperación de HA fue del 55% cuando la conductividad era de 5 mS/cm a pH 7,3. Teniendo en cuenta la recuperación de HA de la preparación de la carga de la etapa de cromatografía, las etapas clarificada, concentrada, solubilizada y Amberlite, la recuperación total de HA puede ser de aproximadamente 50% para A/Uruguay. El antígeno NA no se midió. El contenido de TP cumple con sus especificaciones. El ADN de la célula huésped no se midió. Al disminuir la conductividad como A/California, también se esperaba que aumentara la recuperación de HA de A/Uruguay.

Ejemplo 3

20 El Ejemplo 3 demostró que los antígenos HA y NA del filtrado de la cosecha clarificada, concentrada, solubilizada y de Amberlite se pueden purificar suficientemente mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, de modo que su proteína total/100 μg de HA sea inferior a 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y su contenido en ADN de la célula huésped sea inferior a 20 ng/100 μg de HA. El antígeno NA se co-purifica junto con antígenos HA.

25 La preparación de la cosecha clarificada, concentrada, solubilizada y de Amberlite es la misma que la del ejemplo 2. El filtrado se acondicionó antes de cargarlo en columnas de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Después de lavar con tampones de carga, se eluyeron los antígenos HA y NA. El flujo, el lavado y la elución se fraccionaron. En base a: señal UV, se seleccionaron varias fracciones para HA-SRD, NA, ADN y análisis de proteína total. Los resultados se indican a continuación:

HIC

Cepa	Concentración salina de carga y Tampón de equilibrado	pH de carga y Tampón de equilibrado	Recuperación de HA de fracción de elución recogida	Proteína total $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de HA	ADN mg/100 μg de HA	NA
A/California X-179-A	2,3 M	7,4	68%	152	19	presente
A/Uruguay X-175-C	2,6 M	7,4	91%	88	15	presente
B/Malaysia	1,5 M	7,4	73%	202	8	presente
B/Malaysia	1,7 M	7,4	68%	118	15	presente
B/Malaysia	2,0 M	7,4	71%	180	9	presente

5 Como se observa, la recuperación de HA de A/California de la cromatografía de interacción hidrofóbica era 68% - 91% en las condiciones ensayadas. La concentración salina influyó en la recuperación de HA. Teniendo en cuenta la recuperación de HA de la preparación de la carga de la etapa cromatográfica, las etapas clarificada, concentrada, solubilizada y de Amberlite, la recuperación total de HA estaba entre 60-80% para A/California. NA se co-purificó junto con antígenos HA. El contenido de ADN y TP de la célula huésped cumplió con sus especificaciones.

10 Para B/Malaysia, la recuperación de HA fue de alrededor del 70% cuando la concentración salina utilizada era 1,5-2,0 M a pH 7,4. Teniendo en cuenta la recuperación de HA de la preparación de la carga de la etapa de cromatografía, las etapas clarificada, concentrada, solubilizada y de Amberlite, la recuperación total de HA era del 60% para B/Malaysia. El antígeno NA se co-purificó junto con antígenos HA. El contenido de ADN y TP de la célula huésped cumplió con sus especificaciones.

Ejemplo 4

Método y materiales

15 El virus de la gripe se propagó en células MDCK. Las cosechas se clarificaron por centrifugación a 300 g durante 2 min o a 3220 g durante 8 min. Las cosechas clarificadas se concentraron diferentes veces mediante TFF utilizando un casete de 100-300 kDa. Las cosechas clarificadas y concentradas se solubilizaron utilizando 600 - 3000 µg/ml de CTAB y 300 - 900 µg/ml de Tween-80 a 2-8°C. Las cosechas clarificadas, concentradas y solubilizadas se centrifugaron a 100.000 g durante 30 min a 2-8°C. Se recogieron los sobrenadantes. Se añadió Amberlite al sobrenadante recogido en una relación de la masa de Amberlite a la masa de CTAB de 100:1. Después de la incubación a 2-8°C durante 16 h, se separó el Amberlite añadido, haciendo pasar la suspensión a través de filtros de 5 µm de profundidad. El filtrado se midió para HA-SRD (ensayo de inmunodifusión radial simple), NA, ADN, y se llevó a cabo un análisis de proteína total.

Ejemplo 4.1

25 Este ejemplo demuestra que la combinación de un factor de alta concentración y una alta concentración de detergente catiónico es preferible tanto para la recuperación del antígeno como para la separación del ADN de la célula huésped. La cepa utilizada era B/Brisbane. Después de la clarificación y la concentración, la cosecha se incubó en presencia de detergentes en diferentes condiciones. Se variaron las concentraciones de los detergentes, el tiempo de incubación y los factores de concentración. El efecto de la concentración de CTAB y los factores de concentración sobre la recuperación del antígeno de superficie principal HA y la reducción de ADN se muestran en la Figura 1 y en la Figura 2. Como puede verse, el aumento de la concentración de detergentes catiónicos y el factor de concentración es beneficioso tanto para la recuperación de los productos (Fig. 1) como para la reducción del ADN de la célula huésped (Fig. 2).

Ejemplo 4.2

35 Este ejemplo demuestra que tanto la alta recuperación de producto de B/Florida/4/2006 como la reducción significativa del ADN de la célula huésped pueden realizarse utilizando 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween-80 y seguido de centrifugación a 100.000 g durante 30 min.

Muestra y descripción	ADN [ng/ml]	Log Red de ADN	SRD [µg/ml]	Recuperación de HA	Observación
Cosecha clarificada y 8,4 veces concentrada	26349		42		
Solubilizada a 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween 80, centrifugada y tratada con Amberlite	1	4,0	23	≥ 95%	2,5 veces diluida

Ejemplo 4.3

40 Este ejemplo demuestra que tanto la elevada recuperación de producto de A/Wisconsin como la reducción significativa del ADN de la célula huésped pueden realizarse utilizando 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween-80 y seguido de centrifugación a 100.000 g durante 30 min.

ES 2 653 197 T3

Muestra y descripción	ADN [ng/ml]	Log Red de ADN	SRD [µg/ml]	Recuperación de HA	Observación
Cosecha clarificada y 8,4 veces concentrada	32895		258		
Solubilizada a 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween 80, centrifugada y tratada con Amberlite	2	3,8	97	94%	2,5 veces diluida

Ejemplo 4.4

- 5 Este ejemplo demuestra que tanto la elevada recuperación de producto de A/Victoria como la reducción significativa del ADN de la célula huésped pueden realizarse utilizando 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween-80 y seguido de centrifugación a 100.000 g durante 30 min.

Muestra y descripción	ADN [ng/ml]	Log Red de ADN	SRD [µg/ml]	Recuperación de HA	Observación
Cosecha clarificada y 10,2 veces concentrada	37417		185		
Solubilizada a 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween 80, centrifugada y tratada con Amberlite	5	3,5	87	≥ 95%	2,5 veces diluida

Ejemplo 4.5

- 10 Este ejemplo demuestra que tanto la elevada recuperación de producto de A/California como la reducción significativa del ADN de la célula huésped pueden realizarse utilizando 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween-80 y seguido de centrifugación a 100.000 g durante 30 min.

Muestra y descripción	ADN [ng/ml]	Log Red de ADN	SRD [µg/ml]	Recuperación de HA	Observación
Cosecha clarificada y 13,7 veces concentrada	42187		292		
Solubilizada a 3000 µg/ml de CTAB y 900 µg/ml de Tween 80, centrifugada y tratada con Amberlite	53	2,5	112	96%	2,5 veces diluida

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de hemaglutinina y/o neuraminidasa derivada de ortomixovirus, que comprende las siguientes etapas, en el orden indicado:
- 5 a) proporcionar un fluido derivado de un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en células o un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en huevos que comprende dicho virus,
- b) clarificar el fluido que comprende ortomixovirus aplicando centrifugación, filtración de flujo tangencial o filtración profunda, lo que da como resultado una cosecha líquida que comprende dicho virus,
- 10 c) reducir el volumen de la cosecha líquida obtenida después de la etapa b) en un factor de al menos 4 para obtener una cosecha líquida concentrada, en donde esta etapa reductora del volumen se lleva a cabo en un solo paso,
- d) solubilizar el ortomixovirus que está presente en la cosecha líquida mediante la adición de un detergente o una mezcla de detergentes que comprende un detergente catiónico a la cosecha líquida concentrada obtenida en la etapa c), en donde la concentración final de dicho detergente catiónico es al menos de 2000 µg/ml,
- 15 e) separar núcleos virales de la composición obtenida después de la etapa d),
- f) separar opcionalmente el detergente catiónico de la composición obtenida después de la etapa e),
- g) purificar hemaglutinina y/o neuraminidasa aplicando cromatografía,
- en donde la etapa c) es seguida directamente por la etapa d),
- y
- 20 en donde antes de la etapa d) no se lleva a cabo etapa de purificación alguna que esté dirigida a purificar específicamente ortomixovirus.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la única etapa de cromatografía que se lleva a cabo se lleva a cabo en la etapa g).
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se lleva a cabo una etapa de inactivación y/o de aclaramiento viral.
- 25 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el volumen en la etapa c) se reduce en un factor de al menos 5.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el detergente catiónico se basa en cationes de amonio cuaternario.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa b) es seguida directamente por la etapa c), la cual es seguida directamente por la etapa d).
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que no tiene lugar un intercambio de detergente.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que antes de la etapa d) no se añade nucleasa u otra enzima de digestión de ADN, preferiblemente no se añade nucleasa en ninguna fase del procedimiento.
- 35 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ortomixovirus es virus de la gripe A, B o C.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fluido en la etapa a) se produce utilizando un biorreactor desechable.
- 40 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, definido por los rasgos seleccionados de uno cualquiera de los siguientes:
- la etapa c) se lleva a cabo aplicando un método seleccionado del grupo que consiste en filtración de flujo tangencial, ultracentrifugación y precipitación;
- 45 - la etapa e) se lleva a cabo aplicando un método seleccionado del grupo que consiste en ultracentrifugación y filtración de flujo tangencial; y/o

- la cromatografía de la etapa g) se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño.

- 5 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa adicional de formular el antígeno viral obtenido en una composición farmacéutica, preferiblemente la composición farmacéutica es una preparación de vacuna o un producto intermedio de la misma, más preferiblemente la composición farmacéutica es una vacuna contra la gripe.
- 10 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa g) comprende el uso de una composición que tiene una conductividad en el intervalo de entre igual a o mayor que 3,0 a menor que 5,0 mS/cm, preferiblemente entre igual a o mayor que 3,5 a igual a o menor que 4,7 mS/cm, incluso más preferiblemente en un intervalo de entre igual a o mayor que 3,6 e igual o menor que 4,65 mS/cm, cuando se hace referencia a 25°C, y/o en el que la etapa g) comprende el uso de una composición que tiene una concentración molar en el intervalo de entre igual a o mayor que 1,0 M a igual a o menor que 3,5 M, preferiblemente en el intervalo de entre igual a o mayor que 1,0 M a igual a o menor que 3,0 M, más preferiblemente en un intervalo de entre igual a o mayor que 1,5 M a igual a o menor que 3,0 M, e incluso más preferiblemente en un intervalo de entre igual a o mayor que 1,5 M a igual o menor que 2,6 M, cuando se hace referencia a 25°C.
- 15 14. Método para la fabricación de una preparación de vacuna que contiene hemaglutinina y/o neuraminidasa derivada de un cultivo de propagación de ortomixovirus basado en células, que comprende las etapas a) a g) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y una etapa de formular la hemaglutinina y/o neuraminidasa purificada, obtenida, en una preparación de vacuna.
- 20

Fig. 1

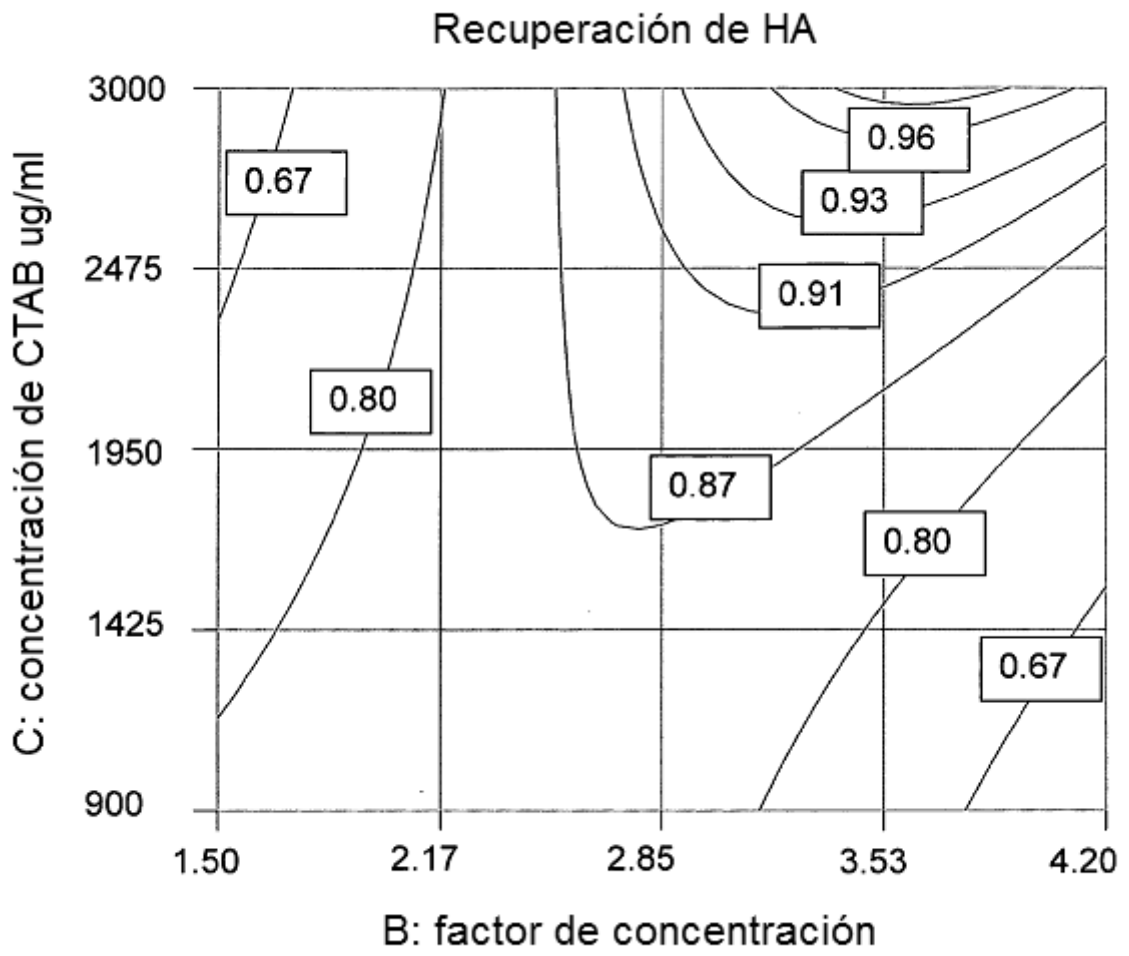


Fig. 2

