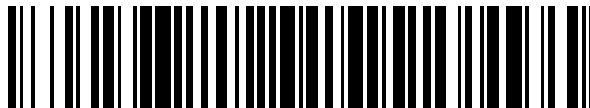


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 150**

51 Int. Cl.:

A61K 39/13 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2014 PCT/NL2014/050395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14204303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2014 E 14734942 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3010537**

54 Título: **Métodos para la prevención de agregación de componentes víricos**

30 Prioridad:

17.06.2013 EP 13172263

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

08.11.2018

73 Titular/es:

**DE STAAT DER NEDERLANDEN, VERT. DOOR
DE MINISTER VAN VWS, MINISTERIE VAN
VOLKSGEZONDHEID, WELZIJN EN SPORT
(100.0%)**

**Parnassusplein 5
2500 EJ Den Haag, NL**

72 Inventor/es:

**VAN 'T OEVER, AREND GESINUS;
BAKKER, WILFRIDUS ADRIANUS MARIA y
THOMASSEN, YVONNE ELISABETH**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 689 150 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 prevención de agregación de componentes víricos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para la prevención y/o reducción de la agregación de componentes víricos.
La invención por lo tanto se refiere al campo de la producción y formulación de biofarmacéuticos y al campo de vacunología.

Antecedentes de la invención

[0002] La agregación es un problema bien conocido en la producción de (bio) farmacéuticos, especialmente proteínas tales como anticuerpos monoclonales y virus.
Más antecedentes en la agregación de proteína pueden ser descubiertos en la siguiente revisión (Wei Wang, 2005).

La agregación puede estar asociada a pérdidas de producción/fabricación altas, inestabilidad, tiempo de conservación reducido, efectos adversos sobre administración, reacciones inmunogénicas diferentes y hasta la formación de la misma enfermedad (como por ejemplo, Alzheimer Parkinson (Taylor et al. 2002), encefalopatía de prion y Huntington).

La agregación se puede evitar por selección cuidadosa de tampones o medios aplicados en el proceso de producción (Gu et al., 2003, Cromwell et al. 2006).

La adición de compuestos como urea o sales de guanidinio ha sido conocida por solubilizar proteínas.

Sin embargo, estos agentes también afectan a la estructura y eficacia de la proteína.

Suprimir o evitar la agregación no siempre es exitoso y se deben hacer compromisos que pueden llevar a pérdidas de producto (relativamente) altas durante la fabricación, almacenamiento o pérdida de eficacia a lo largo del tiempo.

[0003] Durante la producción de componentes víricos tal como por ejemplo poliovirus inactivado basado en Sabin, también se sabe que se produce una agregación no deseada, que puede dar lugar a variaciones grandes en la recuperación (rendimiento) de producto de purificación en la fabricación de (componentes) víricos.
Hay así una necesidad de un método mejorado para la producción de componentes víricos.

[0004] Los virus son agentes infecciosos que pueden replicar solo células vivas de interior, dependiendo del virus estos pueden infectar diferentes tipos de organismos tales como animales, plantas, bacterias y arqueas (Koonin EV et al. 2006).

El virus consiste en dos o tres partes diferentes, el material genético y un revestimiento de proteína vírica, suplementado a veces por una membrana de doble capa lipídica o revestimiento.

El revestimiento vírico se compone de múltiples proteínas, que forman una estructura cuaternaria altamente compleja en una estructura helicoidal, icosaédrica o aún más compleja.

Más antecedentes en virus se pueden descubrir en la siguiente referencia (Fields Virology, 2007).

[0005] En nuestro estudio, nosotros focalizados en el poliovirus y gripe como un modelo para virus sin envoltura y envueltos, respectivamente.

El poliovirus se usa comúnmente como un virus de modelo no-específico para virus de ARN sin envoltura en los estudios de validación de eliminación vírica como representativos de Picornaviruses en general (nota técnica Millipore:AN1650EN00; www.bioreliance.com/library/?id=90, http://www.criver.com/files/pdfs/bps/bp_r_virico_tse-clearance_studies.aspx).

Además, el poliovirus es un virus bien estudiado sobre el que está disponible un gran cuerpo de bibliografía científica haciéndolo un candidato adecuado.

Como representativas de virus con envoltura diferentes cepas de gripe fueron usadas.

La gripe es un virus que está causando una gran cantidad de interés cada año debido a su variabilidad (desviación antigénica).

La gripe se estudia a nivel mundial y debido a la carga de la enfermedad, un posible objetivo para cualquier mejora de vacuna.

La variabilidad alta hace al virus de la gripe un representante adecuado para probar rápidamente este método para reducir y prevenir la agregación contra muchas variaciones, mostrando el amplio rango donde esta técnica puede ser utilizada.

[0006] La poliomielitis, también referida como polio o parálisis infantil, es una enfermedad vírica infecciosa provocada por tres serotipos víricos relacionados: poliovirus 1, 2 y 3. Los poliovirus pertenecen al género enterovirus de la familia Picornaviridae.

En seres humanos, los poliovirus se adquieren principalmente por transmisión fecal-oral u oral-oral.

Después de la infección, el poliovirus prolifera en el tracto gastrointestinal y de allí esto se puede introducir en el sistema nervioso central.

Tal infección puede causar parálisis.

La polio no se puede curar.

Sin embargo, esto se puede evitar por vacunación.

5 Actualmente, hay dos vacunas seguras y eficaces para la polio disponibles en el mercado: vacuna oral contra la poliomielitis (OPV) y vacuna inactivada contra la poliomielitis (IPV). El OPV se basa en cepas atenuadas de vida del poliovirus (las denominadas cepas Sabin, después Albert Sabin, quien primero desarrolló la OPV), esta vacuna se administra por medio de vía oral.

En cambio, la IPV, se basa en usar cepas de poliovirus tipo salvaje purificadas, que se matan químicamente y se administran de forma intramuscular por inyección.

10 La IPV fue primero desarrollada por Jonas Salk [hay diferentes reseñas disponibles en polio y polio vacunas: Koch and Koch, 1985; Duchene et al., 1990; Kew et al. 2005; Heinsbroek and Ruitenberg, 2010].

[0007] Ambas vacunas disponibles contra la poliomielitis (OPV e IPV) proporcionan altos niveles de protección de poliomielitis paralítica.

15 La OPV hasta ahora ha sido la vacuna de elección para la erradicación global de la polio, ya que tiene diferentes ventajas: fácil de administrar y menos costosa.

Sin embargo, en algunos casos, la OPV puede causar poliomielitis paralítica asociada a la vacuna (VAPP) o puede llevar a poliovirus derivado de la vacuna (VDPV) y debería ser preferiblemente interrumpida, tan pronto como se tenga éxito con la erradicación [Kew et al., 2005; Heymann et al., 2005 & 2006; Chumakov et al., 2007; Nathanson & Kew, 2010; Aylward and Tangemann, 2011].

20 Tampoco se excluye que la OPV pueda revertir de nuevo a la variante de tipo salvaje (Lee et al 2012).

Por lo tanto, la necesidad de nuevas vacunas, seguras y eficaces contra la polio está en aumento.

La vía a una política de vacunación post-erradicación global contra la polio depende de entre otros, la disponibilidad y precio de IPV [Heinsbroek and Ruitenberg, 2010; Thompson y Tebbens, 2012].

25

[0008] Para interrumpir el uso de la OPV después de la erradicación de la polio y para reducir el coste de IPV por dosis, se siguen métodos diferentes.

Entre otros, estos métodos incluyen: a) IPV basado en las cepas de poliovirus atenuadas Sabin (Sabin-IPV) [Bakken et al., 2011; Hamidi & Bakken, 2012]; b) IPV basado en las cepas de semilla de poliovirus de alternativas recién diseñadas [Chumakov et al., 2008; Robinson HL 2008; Hamidi & Bakken, 2012]; c) IPV producido de células mamíferas alternativas que soportan eficientemente la replicación de poliovirus [Hamidi & Bakken, 2012; Sanders et al., 2012; Crucell, US0027317,2011].

30

En todos tales desarrollos, se pueden conseguir oportunidades en la reducción del precio costoso por implementación de métodos conocidos en la optimización de procesos aguas arriba y aguas abajo (por ejemplo uso más eficaz de la capacidad de biorreactor), y la modernización en general (por ejemplo, usando células libre de componentes animales y medios de cultivo vírico, filtros desechables y semejantes).

35

[0009] Actualmente, IPV está basado más frecuentemente en usar tres cepas virulentas tipo salvaje, Mahoney (poliovirus de tipo 1), MEF-1 (poliovirus de tipo 2) y Saukett (poliovirus de tipo 3).

40

Los poliovirus crecen separadamente en el cultivo celular mamífero.

Posteriormente, después de diferentes etapas de purificación, el poliovirus se inactiva usando formalina (formaldehído) después de lo cual se pueden mezclar a la formulación deseada final y rellenar.

[0010] El virus de gripe causa una infección respiratoria aguda, con morbilidad y mortalidad considerables.

45

La prevalencia es máxima en niños en edad escolar.

Los niños pequeños, personas mayores y aquellos con condiciones tales como enfermedad pulmonar y cardiopatía, diabetes o asma severa están en riesgo de gripe severa.

Clínicamente, la gripe comprende la enfermedad febril aguda con mialgia, dolor de cabeza y tos.

50

[0011] Aunque la enfermedad de la gripe se ha conocido durante siglos, el agente causativo fue desconocido durante mucho tiempo.

El primer virus de gripe humana fue aislado en 1933.

[0012] El virus podría ser propagado en huevos embrionados (todavía una práctica común, más tarde complementada con la capacidad para crecer el virus en cultivos de células), que inmensamente facilitan la capacidad de estudiar el virus.

55

[0013] El virus de gripe es un virus de ARN de la familia Orthomyxoviridae y está compuesto de un revestimiento lipídico alrededor de ocho segmentos de ARN. En el revestimiento dos (antígenos) proteínas mayores están presentes: la neuraminidasa (NA/N) y la hemaglutinina (HA/H). La hemaglutinina es la proteína que agrega el virus a las células del epitelio respiratorio y posteriormente se fusiona la membrana vírica con la membrana de la célula epitelial, para permitir la introducción del virus.

60

La neuraminidasa es una enzima vírica que facilita la liberación de partículas víricas recién producidas de células infectadas.

65

[0014] Además del hombre, el virus de la gripe puede infectar una amplia gama de especies animales, la más pertinente para seres que son pájaros y cerdos, debido a que los virus de estas especies pueden generalmente también infectar a seres humanos.

Una característica destacada de virus de gripe es variabilidad.

5 La variación se conduce por selección inmunitaria, lo que significa que el virus constantemente tratará de escapar de la inmunidad del huésped.

Puede hacerlo mediante la mutación gradual de sus antígenos conocidos como desviación antigénica o por intercambio de segmentos de ARN enteros que codifican antígenos con cepas relacionadas, conocidas como desvío antigénico.

10 La selección inmunitaria se refiere a respuestas de anticuerpos contra los antígenos de superficie y, en menor medida, a respuestas de células T, que se dirigen principalmente contra las proteínas internas.

[0015] Debido a la desviación antigénica, se tuvieron que producir cada año vacunas nuevas contra la gripe estacional, con los antígenos que se expresan en las cepas víricas circulantes en la estación respectiva.

15 El desvío antigénico o una serie de mutaciones de desviación antigénicas pueden causar una pandemia.

La protección contra un brote pandémico necesita el uso de vacunas potentes recién desarrolladas con los antígenos expresados por el virus pandémico.

[0016] Como se ha explicado aquí, los inventores identificaron un método mejorado para la producción de componentes víricos y para una composición mejorada que comprende tales componentes víricos, donde se evita o reduce la agregación.

20

Resumen de la invención

25 [0017] En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de una composición que comprende partículas de Enterovirus, donde el método comprende los pasos de: a) producir un medio con las partículas de Enterovirus; b) purificación de las partículas de Enterovirus desde el medio, por lo cual durante al menos una parte de la purificación un aminoácido básico o un derivado está presente a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus; y c) inactivación de las partículas de Enterovirus; y, opcionalmente d) formulación de las partículas de Enterovirus, donde el aminoácido básico o derivado es seleccionado del grupo que consiste en: arginina, lisina, histidina, arginina HCl, lisina HCl, histidina HCl, agmatina, dihidrocloruro de éster etílico de L-arginina, ácido tranexámico, N-ε-formil-L-lisina, hidrocloreuro DL-5-hidroxilisina, dihidrocloruro de éster metílico de L-lisina, 3-metil-L-histidina, α-metil-DL-histidina dihidrocloruro, sales derivadas y combinaciones de los mismos.

30
35 [0018] Preferiblemente durante el paso d) el aminoácido básico o derivado está presente a una concentración suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus para formular una composición farmacéutica que comprende las partículas de Enterovirus y opcionalmente una concentración del aminoácido básico o derivada suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus.

40 [0019] Más preferiblemente, en el método preferiblemente, la concentración del aminoácido básico o derivado está a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus y se mantiene en toda la duración entera de al menos uno de los pasos c) y d).

45 [0020] En el método según la invención, las partículas de Enterovirus preferiblemente son seleccionadas de un enterovirus del grupo que consiste en poliovirus, virus Coxsackie A, virus Coxsackie B, Echovirus y Enterovirus 68, 69, 70, 71 y 73.

Más preferiblemente, las partículas de Enterovirus comprenden poliovirus de los serotipos 1, 2 y 3. En una forma de realización, las partículas de Enterovirus preferiblemente son partículas de tipo virus de un enterovirus.

50 [0021] En el método según la invención, la composición que comprende partículas de Enterovirus es preferiblemente una vacuna.

Más preferiblemente, la vacuna es una vacuna inactivada contra la poliomieltitis (IPV).

55 [0022] La invención además se refiere al uso de un aminoácido básico o derivado para prevenir o reducir la agregación de partículas de Enterovirus durante la purificación de las partículas de Enterovirus a partir de un medio, por lo cual durante al menos una parte de la purificación del aminoácido básico o su derivado está presente a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus y donde el aminoácido básico o derivado es seleccionado del grupo que consiste en: arginina, lisina, histidina, arginina HCl, lisina HCl, histidina HCl, agmatina, dihidrocloruro de éster etílico de L-arginina, ácido tranexámico, N-ε-formil-L-lisina, hidrocloreuro DL-5-hidroxilisina, dihidrocloruro de éster metílico de L-lisina, 3-metil-L-histidina, α-metil-DL-histidina dihidrocloruro, sales derivadas y combinaciones de los mismos, donde preferiblemente, las partículas de Enterovirus son seleccionadas de un Enterovirus del grupo que consiste en poliovirus, virus Coxsackie A, virus Coxsackie B, echovirus, rinovirus y enterovirus 68, 69, 70,71 y 73, más preferiblemente, las partículas de Enterovirus son los poliovirus de al menos uno de los serotipos 1, 2 y 3, de la forma más preferible, las partículas de Enterovirus son una vacuna inactivada contra la poliomieltitis (IPV).

60
65

Descripción de la invención

- 5 [0023] Sorprendentemente descubrimos que aminoácidos básicos (tal como por ejemplo arginina) y diferentes derivados de los mismos se pueden usar para la prevención de formación de agregados, durante el procesamiento de diferentes virus (con envoltura (es decir gripe) y sin envoltura (es decir poliovirus)) en la fabricación de la vacuna.
- 10 Estos virus fueron derivados de distintos sistemas de cultivo (gripe por huevos embrionados y poliovirus por cultivo celular).
Como resultado, se han logrado recuperaciones de producto vírico significativamente más altas y/o mejor eliminación de contaminantes mientras se mantiene un producto activo biológico.
- 15 Estos mayores rendimientos víricos, que proporcionan ventajas económicas significativas sobre métodos de purificación vírico conocidos no estaban previstos.
Como parte de la divulgación, aminoácidos básicos (tal como por ejemplo arginina) y diferentes derivados de los mismos se pueden usar para la solubilización (disolución/desintegración) o agregados ya formados, durante el almacenamiento de productos víricos (intermedios).
- 20 [0024] La prevención de agregación usando aminoácidos básicos ha sido mostrada previamente para anticuerpos monoclonales (MAbs) (Arakawa T, et al, 2004; US2012264918) y proteínas (Baynes BM, 2004 and 2005).
Sin embargo, no se demostró para estructuras de proteína cuaternarias altamente complejas como virus.
En el caso de toxoide de Clostridium (US 2011/0045025), la arginina incluso facilitó la agregación.
- 25 [0025] Además, el aminoácido básico, tal como arginina ha mostrado tener además actividades virucidas (Yamasaki H, et al, 2008; Utsunimoia H, et al, 2009; Arakawa T, et al, 2009) haciéndolos improbablemente agentes para uso durante el procesamiento de virus y componentes víricos.
La US2012/273424 A1 se refiere a métodos de preparación de composiciones que comprenden partículas víricas.
La US5618539A se refiere a la preparación de vacunas de poliovirus.
- 30 Bräutigam et al. (1993, virologia, doi: 10.1006/viro.1993.1067) se refiere a la preparación de partículas tipo poliovirus de células.
- 35 [0026] Las vías de agregación de supresión de proteínas normales que usan aminoácidos básicos ya han sido identificadas.
La US 2006/035364 A1 y WO 2009/035707 A1 y Baines et al. (2005, Biochemistry, doi: 10.1021/BI047528R) se refieren al uso de aminoácidos para reducir la agregación de polipéptidos.
En la presente invención, descubrimos que la agregación podría ser suprimida, reducida y/o evitada para estructuras complejas altamente compuestas por diferentes "bloques" de proteínas (poliproteína/subunidad de multiestructuras) que forman una estructura cuaternaria estable (como es el caso de vacunas víricas o complejos biológicos).
- 40 La persona experta entiende que algunas proteínas solo forman una estructura terciaria que en algunos casos se pueden estabilizar por un aminoácido básico.
Sin embargo, los virus consisten en múltiples de estas estructuras terciarias (diferente)s juntas y unir/ensamblar para formar un producto (temporal)/estable (estructura cuaternaria) con una estructura helicoidal, isocahedral o una aún más compleja.
- 45 Uno de los virus evaluados en la presente invención tiene tal especie de estructura compleja ya que esta comprende una envoltura de membrana.
Los virus difieren de estructuras de proteína cuaternaria (biológica) compleja normal en el sentido de que estas se pueden replicar y multiplicar/reproducir ellas mismas usando células huésped y se pueden desarrollar por selección natural (Holes EC 2007; Taylor DJ, et al 2013).
- 50 Además, algunos virus han mostrado tener la capacidad de formar estructuras especializadas para el transporte de material genómico en células huésped (Sun L, et al 2014) o ser parasitadas por otros virus, denominados, virofagos (Pearson H, 2008; and Desnues, C, et al 2010).
- 55 [0027] La introducción de ambos virus envueltos y sin envoltura en una célula requiere interacciones entre receptores celulares y el revestimiento vírico o envoltura.
Estos son específicos para ciertas células huéspedes como una clave para un bloqueo.
Esta estructura cuaternaria vírica necesita ser mantenida en la estructura/conformación correcta (parcialmente forma el revestimiento vírico) ya que su función primaria es proteger (por ejemplo, de calor, pH, UV, etc.) el genoma entre células y para enlazar a células huésped susceptibles, bien internamente dentro de una forma de realización o del ambiente externo en una forma de realización individual/huésped completamente nuevo.
- 60 [0028] En vistas de la complejidad, los trabajos e intrincación de la estructura de los componentes víricos, la persona experta podría no tener previsto que el uso de un aminoácido básico podría prevenir o reducir la agregación mientras la estructura vírica permanece intacta y la contagiosidad, especificidad e inmunogenicidad se mantienen.
- 65

[0029] Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de una composición que comprende partículas de Enterovirus, donde el método comprende los pasos de:

- a) producción de un medio con las partículas de Enterovirus;
- b) purificación de las partículas de Enterovirus del medio, por lo cual durante al menos una parte de la purificación un aminoácido básico o un derivado está presente a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus; y
- c) inactivación de las partículas de Enterovirus;

donde el aminoácido básico o derivado es seleccionado del grupo que consiste en: arginina, lisina, histidina, arginina HCl, lisina HCl, histidina HCl, agmatina, dihidrocloruro de éster etílico de L-arginina, ácido tranexámico, hidrocloreuro DL-5-hidroxisilina, dihidrocloruro de éster metílico de L-lisina, 3-metil-L-histidina, sales derivadas y combinaciones de los mismos.

Aminoácido básico o derivado

[0030] Un aminoácido básico puede ser cualquier aminoácido D o L que es farmacéuticamente aceptable. Un aminoácido básico puede estar en forma de un muriato (por ejemplo, limitado a una o más sales clorhídricas) u otra forma de sustancia química acoplada.

Tales aminoácidos incluyen los 3 aminoácidos estándar 'proteínogénicos' o 'naturales': histidina, arginina, lisina al igual que un derivado de las mismas. Histidina, arginina y/o lisina puede ser bien isómeros D o L ópticos o mezclas derivadas, aunque preferiblemente lo(s) aminoácido(s) son isómeros L.

[0031] Un derivado de un aminoácido básico puede ser cualquier forma derivada del mismo que podría ser sintetizado por una persona experta: ver por ejemplo:

www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistryproducts.html?TablePage=1625523 o Sigma Aldrich's "aminoácido Derivatives" catálogo de producto o cualquier otra fuente comercial.

[0032] Un derivado de un aminoácido básico puede ser una forma quiral o isomérica de histidina, arginina o lisina.

Un derivado de un aminoácido básico puede ser un producto metabólico de histidina, arginina o lisina.

Los derivados preferidos de lisina son seleccionados de: ácido tranexámico, N-ε-formil-L-lisina y mono o sales de dihidrocloruro de lisina tales como hidrocloreuro DL-5-Hidroxisilina y dihidrocloruro de éster metílico de L-lisina.

Los derivados preferidos de arginina son seleccionados de: L-arginina de N-α-acetilo, agmatina, sal de sulfato de agmatina y mono o sales de dihidrocloruro de arginina tal como Dihidrocloruro de Ester etílico de L-arginina.

Los derivados preferidos de histidina son seleccionados de: 3-metil-L-histidina y mono o sales de dihidrocloruro de histidina tales como α-metil-DL-histidina dihidrocloruro.

[0033] En una forma de realización preferida, el aminoácido básico o un derivado es seleccionado del grupo que consiste en: L-arginina, d-arginina, l-lisina, L-histidina, formas quiral/isomérica/racemato de arginina, lisina, histidina, arginina HCl, lisina HCl, histidina HCl, agmatina, sal de sulfato de agmatina, dihidrocloruro de éster etílico de L-arginina, ácido tranexámico, sal de monohidrocloruro de lisina, sal de monohidrocloruro de histidina, sal de monohidrocloruro de arginina, sal de dihidrocloruro de lisina, sal de dihidrocloruro de histidina, sal de dihidrocloruro de arginina, hidrocloreuro DL-5-hidroxisilina, dihidrocloruro de éster metílico de L-lisina, 3-metil-L-histidina, glutamato de arginina, acetato de arginina, aspartato de arginina, sulfato de arginina, glutamato de lisina, acetato de lisina, acetato de histidina y cocoato de L-arginina.

También comprende que un aminoácido básico o un derivado se puede combinar con una forma de sal como ácido glutámico de arginina, ácido de acetato de arginina, ácido de aspartato arginina etc. Como parte de la divulgación, el aminoácido básico o un derivado es seleccionado del grupo que consiste en: producto metabólico de arginina, lisina, histidina, L-arginina de N-α-acetilon, N-ε-formil-L-lisina y α-metil-DL-histidina dihidrocloruro, butiroil-L-arginina, N α-cocoil-L-arginina ester etílico y N-[3-alkil(12,14)oxi-2-hidroxipropil]-L-arginina hidrocloreuro.

[0034] Un aminoácido básico o un derivado se puede adicionar a una composición o solución que comprende componentes víricos y agregados del mismo para obtener una concentración final de al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 81, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 mM y/o menos del 1000 mM, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 390, 380, 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 mM. Se describen concentraciones finales inferiores a 1, 0.50, 0.45, 0.40, 0.35, 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.1, 0.05, 0.015 o 0.01 mM o en el rango de 0.01-1000 mM o 0.015-1000 mM, o al menos 0.01, 0.015, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, o 0.5 mM. Si más de un aminoácido básico diferente o derivado está presente en dicha composición o solución como más tarde se ha explicado aquí, la concentración identificada arriba se refiere a la concentración total de aminoácido básico o derivados de la misma.

Si un aminoácido básico o un derivado se usa, la concentración total de aminoácido básico o derivada es sinónima con la concentración de dicho aminoácido.

Se entiende que un aminoácido básico o un derivado se puede adicionar como un aditivo (también referido como excipiente, cosolvente o cosoluto), como un sólido (para ser disuelto en la mezcla), como una solución acuosa (concentrada) en el agua o tampón o cambiada contra el agua o tampón que contiene dicho aminoácido básico vía por ejemplo diafiltración, a una composición o solución que comprende componentes víricos y agregados de los mismos.

[0035] Dependiendo de la identidad del virus, la persona experta puede adaptar la concentración para alcanzar el efecto deseado en la prevención o reducción de agregación.

Por ejemplo, para poliovirus, la concentración de un aminoácido básico o derivado de la misma es preferiblemente no mayor que 100 mM o no mayor que 150 mM.

[0036] Un aminoácido básico preferido es arginina, más preferiblemente L-arginina.

Una concentración preferida de L-arginina en dicha composición o solución comprende los componentes víricos y agregados de la misma oscila de 1-1000 mM, 1-900 mM, 1-600 mM, 5-500 mM, 10- 400 mM, 15- 300 mM, 20- 200 mM, 25- 200 mM, 30- 200 mM, 35- 200 mM, 40- 200 mM, 45- 200 mM, 50- 300 mM o 70-250 mM. Resultados buenos fueron obtenidos con 150 mM en el caso de poliovirus y 350 mM en el caso de virus de gripe. Los rangos de concentración descritos de L-arginina son 0.01-1000 mM, 0.015-1000 mM, 0.05-1000 mM, 0.1-1000 mM, 0.5-1000 mM, 0.8-1000 mM, 0.1-900 mM, 0.8-900 mM, 0.1-800 mM, 0.8-800 mM, 0.1-700 mM y 0.5-700 mM.

[0037] Un derivado preferido o producto de arginina es agmatina.

Una concentración preferida de agmatina en dicha composición o solución que comprende los componentes víricos y agregados de la misma oscila de 1-1000 mM, 1-900 mM, 1-600 mM, 5-500 mM, 10- 400 mM, 15- 300 mM, 20- 200 mM, 25- 200 mM, 30- 200 mM, 35- 200 mM, 40- 200 mM, 45- 200 mM, 50- 300 mM o 70-250 mM. Resultados buenos fueron obtenidos con 100 mM y con 25 mM. Rangos de concentración descritos de agmatina son 0.01-1000 mM, 0.015-1000 mM, 0.05-1000 mM, 0.1-1000 mM, 0.5-1000 mM, 0.8-1000 mM, 0.1-900 mM, 0.8-900 mM, 0.1-800 mM, 0.8-800 mM, 0.1-700 mM y 0.5- 700 mM.

[0038] Otro aminoácido básico preferido es lisina, más preferiblemente L-lisina.

Una concentración preferida de lisina en dicha composición o solución que comprende los componentes víricos y agregados de la misma oscila de 1-1000 mM, 1-900 mM, 1-600 mM, 5-500 mM, 10- 400 mM, 15- 300 mM, 20- 200 mM, 25- 200 mM, 30- 200 mM, 35- 200 mM, 40- 200 mM, 45- 200 mM, 50- 300 mM o 100-250 mM. Resultados buenos fueron obtenidos con 150 mM y con 75 mM. Los rangos de concentración descritos de lisina son 0.01-1000 mM, 0.015-1000 mM, 0.05-1000 mM, 0.1-1000 mM, 0.5-1000 mM, 0.8-1000 mM, 0.1-900 mM, 0.8-900 mM, 0.1-800 mM, 0.8-800 mM, 0.1-700 mM y 0.5- 700 mM,

[0039] La solución que comprende un aminoácido básico o un derivado tiene preferiblemente un pH neutro, por ejemplo, un pH en el rango de 6.0 - 8.0, o 6.5 - 7.5 o un pH de aproximadamente 7.0.

Más preferiblemente, el pH de la solución está por debajo del pI del aminoácido básico que se usa.

Esta solución preferiblemente comprende un tampón para mantener el pH en los valores indicados.

En principio cualquier tampón farmacéuticamente aceptable, que preferiblemente tenga una capacidad de tamponamiento eficaz en el rango de valores de pH como se indican, se puede usar en la solución.

El tampón está preferiblemente presente en una concentración en el rango de 0.5 - 100 mM, más preferiblemente en el rango de 1 - 75 mM y más preferiblemente en el rango de 2 - 40 mM, tal como 20 o 40 mM.

[0040] Los tampones adecuados para usar en la solución incluyen, pero no están limitados a tampón Mcllvaine (una mezcla de 0.1M ácido cítrico y 0.2M fosfato disodio), un tampón de citrato, un tampón fosfato, un tampón HEPES, un tampón de tuberías y un tampón de histidina.

[0041] Más preferiblemente, cada uno de los aminoácidos básicos o derivados usados aquí es preferiblemente tamponado a pH 7. Más preferiblemente, el tampón es un tampón fosfato a una concentración de 20 o 40 mM.

[0042] Sin embargo, se incluye también en el contexto de la invención que no se necesita ningún tampón o ningún tampón está presente.

En este caso, la composición o solución comprende o consiste en el componente vírico y un aminoácido básico o un derivado tal y como se define aquí y no otro tampón.

Preferiblemente, dicha composición o solución consiste en el componente vírico y un aminoácido básico tal y como se define aquí.

[0043] Se incluye en el contexto de la invención que más de unos aminoácidos básicos y/o más de unos derivados de los mismos se usan en un método de la invención para la prevención y/o reducción de la agregación de componentes víricos.

Una combinación preferida de aminoácido básico es una combinación que comprende arginina, lisina e histidina.

También se incluye el uso de un aminoácido básico dado o derivado del mismo en un paso del proceso de la invención (es decir, un procesamiento aguas arriba, paso de procesamiento aguas arriba, un paso de

inactivación y/o un paso de formulación) y para usar un aminoácido básico diferente o derivado en otro paso de este mismo proceso.

Por ejemplo, agmatina se puede adicionar a material concentrado, mientras la arginina se puede usar durante un paso de proceso de purificación final, por ejemplo, durante un paso cromatográfico.

5

[0044] El aminoácido básico está presente durante el paso b) pero se puede adicionar o estar presente durante cualquier paso del proceso y esto puede pero no necesariamente estar presente durante todos los pasos del proceso.

10

El aminoácido básico puede fácilmente ser quitado o cambiado, cuando se desee, mediante filtración, cromatografía o diálisis (véase ejemplo 6).

Componentes víricos

15

[0045] Un "componente vírico" se entiende aquí que se refiere a un agente biológico, que es activo fisiológicamente o activa una respuesta fisiológica cuando se aplica a un mamífero, especialmente cuando se aplica a un humano, preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable.

Un componente vírico se puede producir por u obtener a partir de un organismo huésped, tal como animal, planta, bacterias u hongos.

20

Un componente vírico puede ser un agente a base de proteínas, es decir un agente que comprende material proteináceo tal como proteínas, polipéptidos y péptidos.

Un componente vírico puede comprender además o consistir en ácido nucleico, por ejemplo ADN, ARN o un análogo de ácido nucleico.

25

Un componente vírico puede comprometer además lípido(s) de membrana por ejemplo del OMV, liposomas, virosomas.

[0046] Un componente vírico preferido comprende o consiste en un virus o un virión, preferiblemente un virus que infecta mamíferos, preferiblemente un virus que infecta a seres humanos.

El virus puede ser un virus envuelto pero es preferiblemente un virus sin envoltura.

30

Se entiende aquí que el término "virus" o "componente vírico" como se utiliza en este caso incluye virus tipo salvaje, ya que estos se producen en la naturaleza (por ejemplo aislados naturales), al igual que virus atenuado 'artificial', mutante, quimérico, pseudo- y virus defectuosos.

El término 'virus' o "componente vírico" también incluye virus recombinantes, es decir, virus construidos utilizando la tecnología del ADN recombinante, tal como virus defectuosos, por ejemplo, carentes de (partes de) uno, más o todos los genes víricos y vectores de terapia genética donde parte del genoma vírico se sustituye por uno o más gen(es) de interés.

35

[0047] En una forma de realización preferida, el componente vírico es una partícula vírica.

En el contexto de la invención del término "partícula vírica" se entiende que incluye viriones completos al igual que partículas tipo víricas que tienen un tamaño y/o composición de cápsida que son idénticas o similares a aquellas del virión tipo salvaje correspondiente pero que no contienen el genoma vírico completo o no contienen ningún ácido nucleico y/o que carecen de (el complemento completo de) proteínas de núcleo vírico (tales como por ejemplo nucleoproteínas).

40

[0048] Los componentes víricos que se pueden utilizar en un método o composición de la invención preferiblemente son de virus seleccionados del grupo que consiste en el *Picornaviruses* y virus de ARNs de cadena negativa que incluyen *Orthomyxovirus* y *Paramixovirus*.

45

[0049] Un *Picornavirus* preferido es un *Enterovirus*.

50

[0050] Los enterovirus son los miembros de la familia de picornavirus, un grupo grande y diverso de virus de ARN pequeño caracterizado por un ARN genómico de cadena positiva única. Todos los enterovirus contienen un genoma de aproximadamente 7,500 bases y se conocen por tener una alta frecuencia de mutación debido a replicación de baja fidelidad y recombinación frecuente.

55

Después de la infección de la célula huésped, el genoma se traduce en una manera independiente de la capa en una poliproteína única, que se procesa posteriormente por proteasas codificadas de virus en las proteínas cápsidas estructurales y las proteínas no estructurales, que están principalmente implicadas en la replicación del virus.

60

El género enterovirus incluye las siguiente doce especies: enterovirus A (anteriormente enterovirus humano A), enterovirus B (anteriormente enterovirus humano B), enterovirus C (anteriormente enterovirus humano C), enterovirus D (anteriormente enterovirus humano D), enterovirus E (bovino anteriormente enterovirus grupo A), enterovirus F (anteriormente enterovirus bovino grupo B), enterovirus G (anteriormente enterovirus porcino B), enterovirus H (anteriormente enterovirus símico A), enterovirus J, rinovirus A (anteriormente rinovirus humano A), rinovirus B (anteriormente rinovirus humano B) y rinovirus C (anteriormente rinovirus humano C).

Dentro de estas doce especies están los serotipos:

65

Coxsackievirus:

ES 2 689 150 T3

- serotipos CV-A2, CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8; CV-A10; CV-A12; CV-A14 y CV-A16 (descubiertos bajo las especies Enterovirus A).
- serotipos CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6 y CV-A9 (descubiertos bajo las especies Enterovirus B).
- serotipos CV-A1; CV-A11; CV-A13; CV-A17; CV-A19; CV-A20; CV-A21; CV-A22 y CV-A24 (descubiertos bajo las especies Enterovirus C).

Echovirus:

- serotipos E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9; E-11; E-12; E-13; E-14; E-15; E-16; E-17; E-18; E-19; E-20; E-21; E-24; E-25; E-26; E-27; E-29; E-30; E-31; E-32 y E-33 (descubiertos bajo las especies Enterovirus B).

Enterovirus:

- tipos EV-A71; EV-A76; EV-A89; EV-A90; EV-A91; EV-A92; EV-A114; EV-A119; SV19; SV43; SV46 y BA13 (descubiertos bajo las especies Enterovirus A).
- tipos EV-B69; EV-B73; EV-B74; EV-B75; EV-B77; EV-B78; EV-B79; EV-B80; EV-B81; EV-B82; EV-B83; EV-B84; EV-B85; EV-B86; EV-B87; EV-B88; EV-B93; EV-B97; EV-B98; EV-B100; EV-B101; EV-B106; EV-B107; EV-B110 y SA5 (descubiertos bajo las especies: Enterovirus B).
- tipos EV-C95; EV-C96; EV-C99; EV-C102; EV-C104; EV-C105; EV-C109; EV-C116; EV-C117 y EV-C118 (descubiertos bajo las especies Enterovirus C).
- tipos EV-D68; EV-D70; EV-D94; EV-D111 y EV-D120 (descubiertos bajo las especies Enterovirus D).
- tipos: EV-H1 (descubiertos bajo las especies Enterovirus H).
- tipos: SV6; EV-J103; EV-J108; EV-J112; EV-J115 y EV-J121 (descubiertos bajo las especies Enterovirus J).

Rinovirus humanos:

- tipos HRV-A1, HRV-A2, HRV-A7, HRV-A8, HRV-A9; HRV-A10; HRV-A11; HRV-A12; HRV-A13; HRV-A15; HRV-A16; HRV-A18; HRV-A19; HRV-A20; HRV-A21; HRV-A22; HRV-A23; HRV-A24; HRV-A25; HRV-A28; HRV-A29; HRV-A30; HRV-A31; HRV-A32; HRV-A33; HRV-A34; HRV-A36; HRV-A38; HRV-A39; HRV-A40; HRV-A41; HRV-A43; HRV-A44; HRV-A45; HRV-A46; HRV-A47; HRV-A49; HRV-A50; HRV-A51; HRV-A53; HRV-A54; HRV-A55; HRV-A56; HRV-A57; HRV-A58; HRV-A59; HRV-A60; HRV-A61; HRV-A62; HRV-A63; HRV-A64; HRV-A65; HRV-A66; HRV-A67; HRV-A68; HRV-A71; HRV-A73; HRV-A74; HRV-A75; HRV-A76; HRV-A77; HRV-A78; HRV-A80; HRV-A81; HRV-A82; HRV-A85; HRV-A88; HRV-A89; HRV-A90; HRV-A94; HRV-A95; HRV-A96; HRV-A98; HRV-A100; HRV-A101; HRV-A102 y HRV-A103 (descubiertos bajo las especies Rinovirus A).
- tipos HRV-B3, HRV-B4, HRV-B5, HRV-B6; HRV-B14; HRV-B17; HRV-B26; HRV-B27; HRV-B35; HRV-B37; HRV-B42; HRV-B48; HRV-B52; HRV-B69; HRV-B70; HRV-B72; HRV-B79; HRV-B83; HRV-B84; HRV-B86; HRV-B91; HRV-B92; HRV-B93; HRV-B97, y HRV-B99 (descubiertos bajo las especies Rinovirus B).
- tipos HRV-C1, HRV-C2, HRV-C3, HRV-C4, HRV-C5, HRV-C6, HRV-C7, HRV-C8, HRV-C9; HRV-C10; HRV-C11; HRV-C12; HRV-C13; HRV-C14; HRV-C15; HRV-C16; HRV-C17; HRV-C18; HRV-C19; HRV-C20; HRV-C21; HRV-C22; HRV-C23; HRV-C24; HRV-C25; HRV-C26; HRV-C27; HRV-C28; HRV-C29; HRV-C30; HRV-C31; HRV-C32; HRV-C33; HRV-C34; HRV-C35; HRV-C36; HRV-C37; HRV-C38; HRV-C39; HRV-C40; HRV-C41; HRV-C42; HRV-C43; HRV-C44; HRV-C45; HRV-C46; HRV-C47; HRV-C48; HRV-C49; HRV-C50 y HRV-C51 (descubiertos bajo las especies Rinovirus C).

Los poliovirus:

- serotipos PV-1, PV-2, y PV-3 (descubiertos bajo las especies: Enterovirus C).

[0051] Los enterovirus preferidos incluyen el virus Coxsackie A, virus Coxsackie B, ecovirus y enterovirus 68, 69, 70, 71 y 73 (por ejemplo, tipos EV-D68; EV-B69; EV-D70 y EV-A71).

De la forma más preferible el virus es un poliovirus.

El componente vírico puede comprender uno o más de los serotipos poliovíricos 1, 2 y 3 pero preferiblemente los componentes víricos comprenden todos los tres serotipos poliovíricos 1, 2 y 3. Las cepas adecuadas de poliovirus de serotipo 1 incluyen pero de forma no limitativa una o más de las cepas Sabin 1, Mahoney, Brunenders, Brunhilde, chat y Cox.

Las cepas adecuadas de poliovirus de serotipo 2 incluyen pero de forma no limitativa una o más de las cepas Sabin 2, MEF-1 y Lansing.

Las cepas adecuadas de poliovirus de serotipo 3 incluyen pero de forma no limitativa una o más de las cepas Sabin 3, Saukett H y G, y Leon.

En unos ejemplos de realización preferidos, el componente vírico es o comprende una vacuna trivalente inactivada contra la polio tal como por ejemplo el Salk-IPV, que contiene la cepa Mahoney vírico de la polio inactivada para tipo 1, la cepa MEF-1 de tipo 2 vírico de la polio inactivada y la cepa Saukett vírico de la polio inactivada para tipo 3 o sIPV, que contiene las cepas Sabin-1; -2 y -3 víricos de la polio inactivadas (van Wezel et al, 1978; Montagnon et al, 1983 & 1984).

VLP (partículas tipo virus) se incluyen también dentro del campo de la invención.

[0052] En otra forma de realización, el virus es un virus de ARNss de cadena negativa (Mononegavíricos). Los virus de ARNss de cadena negativa incluyen los virus siguientes:

5	Bornaviridae:	Bornavirus	Virus de enfermedad de Borna
	Rhabdoviridae:	Vesiculovirus	Virus de la estomatitis vesicular de Indiana
		Lissavirus	Virus de la rabia
		Efemerovirus	Virus de fiebre efímera bovina
		Novirhabdovirus	Virus de necrosis hematopoyética infecciosa
	Filoviridae:	Marburgvirus	El lago Victoria Marburgvirus
		Ebolavirus	Zaire Ebolavirus
	Paramixoviridae:		
	Paramixovirinae:	Rubulavirus	virus de la parotiditis
		Avulavirus	virus de la enfermedad de Newcastle
		Respirovirus	Virus Sendai
		Henipavirus	Virus Hendra
		Morbillivirus	Virus del sarampión
10	Pneumovirinae:	Pneumovirus	Virus respiratorio sincitial humano
		Metapneumovirus	Metapneumovirus aviar
	Orthomyxoviridae:	Virus gripe A	Virus gripe A
		Virus gripe B	virus gripe B
		Virus gripe C	virus gripe C
		Togotovirus	virus Togoto
		Virus isa	Virus de anemia de salmón infeccioso
	Buniaviridae:	Orthobunyavirus	Virus Bunyamwera
		Hantavirus	Virus Hantaan
		Nairovirus	Virus Dugbe
		Flebovirus	Fiebre de valle del Rift
	Arenaviridae:	Arenavirus	Virus linfocítico choriomeningitis

15 [0053] Un virus de ARNss de cadena negativa preferido es un virus que pertenece a los *Paramixoviridae* o a los *Orthomyxoviridae*.

Un virus preferido de la paramixoviridae es un virus como se ha enumerado arriba que pertenece al *Paramixovirinae* o al *Pneumovirinae*.

20 El *Pneumovirus* es preferiblemente un virus respiratorio sincitial (RSV), más preferiblemente un RSV humano o bovino. El RSV humano puede bien ser un virus subgrupo A o B y es preferiblemente un aislado clínico, más preferiblemente un aislado que no ha sido extensivamente transferido *in vitro* (preferiblemente transferido menos de 10, 8, 6 o 5 veces).

25 Preferiblemente el virus RSV (humano o bovino) es un virus que comprende un genoma vírico con un gen de proteína de unión eliminado o inactivado G, por ejemplo, con una mutación en su genoma vírico por la cual el genoma vírico no codifica una proteína de unión funcional G, tal como por ejemplo los viriones RSV ΔG y RSV ΔG+G como se describe en la WO 2005/061698 y en Widjoatmodjo et al. 2010.

Los virus preferidos del *Paramixovirinae* incluyen *Rubulavirus* (virus de la parotiditis) y *Morbillivirus* (virus del sarampión).

30 [0054] En otra forma de realización, un componente vírico es un virus o un virión de unos Orthomyxoviridae.

Los Orthomyxoviridae preferidos son un virus de gripe.

El virus de la gripe puede ser un virus de gripe de los géneros virus de gripe A, B o C, de los cuales A es más preferido.

35 Los subtipos preferidos de virus de gripe A incluyen H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7, incluyendo el virus de gripe A de origen porcino pandémico 2009 (H1N1) (SOIV o H1N1v).

[0055] Los componentes víricos están preferiblemente presentes en una composición o una solución en una cantidad que varía de 1×10^6 a 7×10^{16} partículas inactivadas o vivas y/o muertas por ml.

40 El número de partículas vivas se puede determinar por ejemplo por unidades de formación de placas, cultivo celular o dosis infecciosa de cultivo de tejido 50% (CCID₅₀ o TCID₅₀) y otros ensayos virológicos adecuados para la determinación del componente vírico.

El número de partículas muertas o inactivadas se puede determinar utilizando un ensayo que cuantifica la cantidad de antígeno, tal como por ejemplo ensayos de proteína o ensayos que determinan unidades de hemaglutinación o unidades de polio D antígeno o unidades de N-antígeno.

Preferiblemente, los componentes víricos están presentes en dicha composición o solución en una cantidad de al menos 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 o 1×10^{10} a 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} partículas vivas y/o muertas o inactivadas por ml y/o en una cantidad de hasta 7×10^{16} , 1×10^{16} , 1×10^{15} de partículas vivas y/o muertas o inactivadas por ml.

[0056] La cantidad de componentes víricos en dicha composición o solución también pueden ser expresadas como peso de dichos componentes víricos por ml de la solución.

Preferiblemente, los componentes víricos están presentes en la solución en un peso/ml que varía de 1 FG/ml a 10 g/ml.

Más preferiblemente, los componentes víricos están presentes en dicha composición o solución en una cantidad de al menos 10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-13} , 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , g/ml y/o en una cantidad de hasta 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} o 10^0 g/ml.

El peso de dichos componentes víricos en dicha composición o solución se puede determinar por medios conocidos en la técnica *per se*, que incluyen por ejemplo ensayos de proteína.

Los pesos anteriormente mencionados del agente biofarmacéutico pueden así también ser expresados como gramos de proteína por ml para ser determinados en un ensayo de proteína adecuado (por ejemplo, el ensayo Bradford; Zor and Selinger, 1996).

[0057] En una forma de realización preferida donde los componentes víricos presentes en una composición o solución son o comprenden poliovirus, la cantidad de poliovirus en dicha composición o solución preferiblemente es al menos 0.01, 0.1, 1.0, o 10 DU/ml y hasta 10.000, 1.000 o 100 DU/ml, donde 1 DU se define como se describe en las recomendaciones OMS (TRS, N0 980, anexo 2, 2014) serie de informes técnicos de la OMS Organización Mundial de la Salud, recomendaciones para la producción y el control de la vacuna contra la poliomiellitis (inactivada) o donde 1 DU se define y determina con un ELISA como se describe por Westdijk et al. 2011 or Ten Have et al. 2012.

En una forma de realización donde la composición o solución que comprende dichos componentes víricos es o comprende una vacuna, preferiblemente una (vacuna) de poliovirus multivalente está presente, se entiende que cada serotipo vírico de la polio está presente en una cantidad de al menos 0,01, 0,1, 1,0, o 10 DU/ml y hasta 10,000, 1,000 o 100 DU/ml.

[0058] En una forma de realización preferida, los componentes víricos presentes en una composición o solución son o comprenden RSV. Más preferiblemente, la cantidad de RSV en dicha composición o solución es al menos 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 TCID₅₀/ml y hasta 7×10^{16} , 1×10^{16} , 1×10^{15} , 1×10^{14} TCID₅₀/ml, donde el TCID₅₀ para RSV se define y determina como se describe por Widjoatmodjo et al. 2010.

Agregación

[0059] En el contexto de la invención, agregación significa una interacción entre componentes, aquí entre componentes víricos tales como partículas víricas.

Sin embargo, agregación también abarca la agregación de partículas víricas con material presente en la composición o solución tales como impurezas tipo proteínas de célula huésped.

Tal interacción puede ser covalente o no covalente, soluble o insoluble reversible o irreversible.

La agregación se puede encontrar en cualquier paso durante un proceso para producir componentes víricos: durante un paso de cultivo, un paso de purificación, una inactivación y/o un paso de formulación.

La agregación también se puede encontrar una vez se hayan producido componentes víricos.

Los agregados así formados están presentes, ya que partículas y directrices actuales limitan el número de partículas que se permiten en una cantidad final de productos (bio)farmacéuticos (Farmacopea de EU y Europea).

[0060] Los componentes víricos en una composición o solución podrían estar presentes como partículas solubles que están vivas, muertas o atenuadas como se ha indicado anteriormente.

Los componentes víricos podrían también estar presentes como agregados en dicha composición o solución.

Normalmente tales agregados de componentes víricos deberían ser retirados.

La presencia de agregados en una composición o solución que comprende componentes víricos se puede evaluar directamente por cuantificación de la reflexión o propiedades de transmisión en función de una longitud de onda determinada.

La longitud de onda está comprendida en el rango de 200 y 1000 nm.

Normalmente se elige 450 o 590 nm.

La densidad óptica es preferiblemente evaluada como se ha realizado en el ejemplo 3 A, la reducción en la densidad óptica indica una reducción en la dispersión ligera que corresponde con una reducción en la agregación.

[0061] Alternativamente, la presencia de agregados en una composición o solución que comprende componentes víricos se puede evaluar por medición de la turbidez, (FTU/NTU) fracción de flujo de campo, microscopía electrónica o la dispersión de la luz tal como DLS o MALS. Hay equipos comerciales disponibles, que se pueden confeccionar para aplicaciones específicas (por ejemplo, ProteoStat de Enzo life science part# ENZ-51023-KP002).

[0062] Alternativamente, la presencia de agregados en una composición o solución que comprende componentes víricos se puede evaluar usando cromatografía de exclusión por tamaño o electroforesis en gel bajo condiciones no desnaturizantes, donde el producto y agregado se separan en una columna o en una tira de gel y se cuantifican o en una combinación de dichas técnicas (Li Y, 2009). Más antecedentes en técnicas analíticas para detección de agregación pueden encontrarse en las siguientes reseñas Das TK 2012 y/o Wei Wang, 2005.

[0063] La disponibilidad de grupos funcionales se puede evaluar por ejemplo por ensayo ELISA o biosensor, donde un aumento en la medición correspondería con una reducción en la agregación. Para el virus de la polio, se ha descrito anteriormente un ensayo de ELISA rápido basado en el epítipo de antígeno D (ten Have et al. 2012). Un aumento de cantidad de antígeno D indica que más epítopos están disponibles/son accesibles para la medición indicando una reducción en la agregación.

[0064] En este contexto, una reducción o una prevención o una reducción en la agregación puede significar:

- una reducción de densidad óptica (por ejemplo, a 590 nm) de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más y/o
- un aumento de la cantidad de antígeno D de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más.

[0065] Dicha reducción de la densidad óptica o aumento de la cantidad de antígeno D es preferiblemente evaluada por comparación a la cantidad de agregados presentes (vía la evaluación de por ejemplo la densidad óptica o cantidad de antígeno D) en una composición o solución que comprende componentes víricos donde:

- ningún aminoácido básico o derivado ha sido adicionado o
- que ha sido producido o es obtenible en un método donde un aminoácido básico o un derivado no ha sido adicionado o
- la concentración total de un aminoácido básico o uno derivado es inferior a 0,01 mM.

[0066] Preferiblemente, una composición o una solución que comprende componentes víricos es ópticamente o visualmente clara, lo que indica que la mayoría de material está en la solución y que casi ninguno de los agregados está presente. Más preferiblemente, dicha composición o solución que comprende componentes víricos es ópticamente o visualmente clara para al menos uno, 2, 3 meses.

[0067] Los aminoácidos básicos se pueden detectar por medios bien conocidos en la técnica *per se*, con por ejemplo, fluorescencia fotométrica, HPLC, RMN y espectrometría de masa.

Métodos para producir la composición que comprende componentes víricos

[0068] En una forma de realización preferida del método para la prevención y/o reducción de la agregación de componentes víricos, el método se aplica en o como parte de un método para la producción de una composición que comprende componentes víricos. Por consiguiente, esta forma de realización se refiere a un método para la producción de una composición que comprende un componente vírico, donde el método comprende los pasos de: a) producción de un medio con el componente vírico; b) purificación del componente vírico desde el medio, por lo cual durante al menos una parte de la purificación un aminoácido básico o un derivado está presente en una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación del componente vírico; y, c) inactivación del componente vírico; y, opcionalmente d) formulación del componente vírico, donde el aminoácido básico o un derivado es tal y como se define aquí arriba.

[0069] En el proceso, el aminoácido básico o un derivado se mantiene a una concentración que es suficiente para prevenir o reducir la agregación del componente vírico durante o en toda la duración entera del paso de purificación b).

Más preferiblemente, el aminoácido básico o un derivado está también presente a una concentración que es suficiente para prevenir o reducir la agregación del componente vírico durante al menos una parte del paso c) y/o paso d). Todavía más preferiblemente, el aminoácido básico o un derivado se mantiene a una concentración que es suficiente para prevenir o reducir la agregación del componente vírico durante o en toda la duración entera del paso c) y/o paso d).

Las concentraciones adecuadas del aminoácido básico o un derivado para prevenir o reducir la agregación de componentes víricos son como se da aquí arriba.

5 [0070] Preferiblemente, en el proceso el componente vírico es un componente de un Enterovirus como se ha definido aquí arriba.

Más preferiblemente, el componente vírico son partículas de Enterovirus, es decir, partícula vírica de un Enterovirus como se ha definido aquí arriba, con partículas tipo virus.

10 [0071] Los componentes víricos y partículas como se han identificado aquí son normalmente producidos en procesos multifase.

Tal proceso puede comprender los pasos siguientes:

a) un paso para producir un medio (crudo) que comprende los componentes víricos.

15 Este paso puede comprender células de cultivo que producen componentes víricos, pero también pueden comprender pasos donde los componentes víricos sean reconstituidos, por ejemplo para producir partículas tipo virus.

Estos pasos se pueden referir como pasos de procesamiento aguas abajo (USP), que producen un medio crudo o composición de la que los componentes víricos se deben recuperar y/o purificar; y

b) un paso de tratamiento o purificación aguas abajo (DSP).

20 [0072] Para la producción de IPV (ver figura 1), se realiza un paso de inactivación como el paso c) seguido del paso b). Un paso de formulación (d) también se puede realizar al final del paso b) o c).

[0073] Estos procesos se conocen por la persona experta y podrían ser adaptados dependiendo de la identidad de los componentes víricos para ser producidos.

25 [0074] Un aminoácido básico o un derivado tal y como se define aquí se pueden añadir durante cualquier paso (a, b, c y/o d) para ayudar en el tratamiento del producto.

[0075] Por ejemplo, en el paso a), un organismo huésped adecuado se usa para componentes víricos de replicación.

Tal paso de cultivo lleva a la producción de una composición o solución que comprende componentes víricos.

Para la producción de IPV, las células adecuadas son preferiblemente células mamíferas.

Diferentes células mamíferas se conocen por ser un sustrato adecuado para replicar poliovirus.

35 Según la Farmacopea Europea (6.0,01/2008:0214), para este propósito, el virus se puede propagar en líneas celulares diploides humanas (por ejemplo, WI-38 o MRC-5), líneas celulares continuas (por ejemplo Vero), o en células de riñón de mono primarias, secundarias o terciarias (MKC), o en células PerC6 o CAP.

El poliovirus se puede cultivar en células HeLa.

Los desarrollos últimos son descritos en Hamidi et al 2012.

40 [0076] Si el virus es un poliovirus, se prefiere la línea celular Vero.

Para replicación de poliovirus, las siguientes tres cepas virulentas tipo salvaje se prefieren: Mahoney (poliovirus tipo 1), MEF-1 (poliovirus tipo 2) y Saukett (poliovirus tipo 3).

También otras cepas tipo salvaje, como Brunhilde (poliovirus de tipo 1) se pueden utilizar en la preparación de IPV. Alternativamente, las cepas Sabin de poliovirus se usan para la fabricación de IPV (Verdijk et al., 2011).

45 Preferiblemente, las células se cultivan en microportadores como se describe en Van Wezel A.L., et al 1978.

El microportador preferido es Cytodex 1. Un paso de cultivo preferido para IPV se describe en la parte experimental.

Los desarrollos últimos se describen en Hamidi et al 2012, Widjojoamodjo et al 2010, Thomassen et al 2013a.

50 [0077] En el paso b), los componentes víricos son purificados desde la composición o solución que los comprende, como se proporciona, produce u obtiene en el paso a).

Hay muchas formas diferentes de purificar componentes víricos dependiendo de la identidad del virus.

Este paso de purificación se puede realizar por clarificación, centrifugación, concentración, diafiltración, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y/o cromatografía de intercambio iónico (IEC). Preferiblemente para IPV, esta purificación se realiza por clarificación, seguida de concentración, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y seguida de cromatografía de intercambio iónico (IEC). La clarificación se puede realizar en la mezcla producida en el paso a) usando filtros.

55 La concentración se puede realizar utilizando filtración de flujo tangencial (TFF), conocida también como filtración de flujo cruzado (CFF) o ultrafiltración (UF). Un paso de purificación preferido para la producción de IPV se describe en la parte experimental y en Thomassen et al 2010 y 2013.

Para RSV, normalmente la clarificación se puede seguir por concentración, centrifugación de gradiente de densidad y posteriormente diafiltración utilizando un estabilizador.

Para gripe, la centrifugación se puede seguir por filtración y concentración/diafiltración.

60 Después de lo cual, un paso de centrifugación de gradiente de densidad se puede realizar seguido de una inactivación y nuevamente tiene lugar un paso de diafiltración antes de la formulación.

[0078] El proceso que lleva a una composición o solución que comprende componentes víricos puede consistir en dos pasos a) y b).

Dicho proceso puede comprender un paso adicional, llamado un paso de inactivación, paso c) como se ha explicado abajo.

5 En el paso c), después de diferentes pasos de purificación, los componentes víricos son inactivados.

Los métodos para inactivación de las cepas víricas de la polio para uso seguro en vacunas se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no están limitados a por ejemplo inactivación usando formalina o beta-propiolactona (ver Jonges et al 2010).

Dicho proceso se puede seguir por un paso de formulación (d).

10

[0079] Por consiguiente, el proceso o método de la invención es preferiblemente de manera que los componentes víricos se obtienen por un proceso que incluye un tratamiento aguas arriba y unos pasos de tratamiento de recuperación aguas abajo y opcionalmente un paso de inactivación y/o paso de formulación.

15 Por consiguiente, un aminoácido básico o derivado se puede utilizar durante cualquiera de estos pasos, preferiblemente durante los tratamientos de recuperación y/o inactivación y/o pasos de formulación.

[0080] Un proceso de producción preferido para el poliovirus se describe en la parte experimental.

[0081] Un método de la invención se puede aplicar para prevenir la agregación de componentes víricos.

20 Un aminoácido básico o un derivado se puede utilizar en el paso a), paso b) y/o paso c) y/o paso d).

Preferiblemente, dicho aminoácido básico o derivado se usa en el paso b) y/o paso c).

Más preferiblemente, dicho aminoácido básico o derivado se usa en el paso b).

Significa que un aminoácido básico o un derivado se pueden utilizar en cualquier técnica de purificación usada en el paso b), en alguno de ellos, en todos ellos.

25 Aún más preferiblemente, dicho aminoácido básico o derivado se añade al tampón de elución de SEC y/o en el tampón de elución de IEC. Sin embargo, también incluye usar un aminoácido básico o un derivado en cualquier paso que lleva a la producción de una composición o solución que comprende partículas víricas.

Tales pasos incluyen: paso de cosecha, paso a), paso b), paso c), durante la elución de capturar cromatografía, durante el paso de almacenamiento de un producto intermedio o final, durante el paso de formulación d).

30 Las concentraciones finales preferidas de un aminoácido básico o derivado ya han sido descritas aquí.

Uso de un aminoácido básico o derivado para prevenir la agregación de componentes víricos

[0082] Un método de la invención se puede aplicar para la reducción de la agregación de componentes víricos.

35 Preferiblemente, tales componentes víricos son obtenibles por un proceso que comprende los pasos a), b) y c) y opcionalmente d) como se ha descrito anteriormente.

En tal método, un aminoácido básico o un derivado se añade a una composición o solución que comprende componentes víricos.

40 Así, en un aspecto, la invención se refiere al uso de un aminoácido básico o derivado tal y como se define aquí arriba, para prevenir o reducir la agregación de partículas de Enterovirus durante la purificación de las partículas de Enterovirus a partir de un medio, por lo cual durante al menos una parte de la purificación del aminoácido básico o su derivado está presente en una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus.

45 [0083] En el contexto de la invención, el uso de un aminoácido básico o un derivado del mismose dice que tiene que evitar o reducir o disminuir la agregación de componentes víricos en una composición o solución cuando el uso de tal aminoácido básico o derivado lleva a una reducción o una reducción de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100% de la cantidad de agregados en dicha composición o solución como se ha evaluado utilizando la medición de OD a 590 nm o utilizando cualquiera de los otros métodos descritos anteriormente aquí, en comparación con la cantidad de agregados presentes (por ejemplo por evaluación de la densidad óptica y/o cantidad de antígeno D) en una composición o solución que comprende componentes víricos donde:

- 55 – ningún aminoácido básico o derivado ha sido añadido o
- que ha sido producido o es obtenible en un método donde un aminoácido básico o un derivado no ha sido adicionado o
- la concentración total de un aminoácido básico o un derivado es inferior a 0,01 mM.

60 [0084] En el contexto de la invención, el uso de un aminoácido básico o un derivado se dice que ha evitado o reducido la agregación de componentes víricos en una composición o solución cuando el uso de tal aminoácido básico o derivado lleva a un aumento de la graduación de partículas inactivadas o vivas o muertas en la solución ha aumentado al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100% en comparación con la graduación de partículas inactivadas, vivas o muertas representativas en la solución cuando ningún aminoácido básico o derivado se ha usado.

65 La graduación se evalúa como se ha descrito anteriormente aquí.

[0085] En el contexto de la invención, el uso de un aminoácido básico o un derivado se dice que ha evitado o reducido la agregación de componentes víricos como IPV en una composición o solución cuando el uso de tal aminoácido básico o derivado lleva a un aumento de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100% de unidades de antígeno D de la polio por comparación con el número de unidades de antígeno D de la polio antes de la adición de dicho aminoácido básico o derivado.

Composición que comprende componentes víricos

[0086] Como parte de la divulgación, se proporciona una composición o solución que comprende componentes víricos.

Una "composición que comprende componentes víricos" conforme a la divulgación se entiende que incluye soluciones, la solución preferiblemente acuosa, conforme a la divulgación que comprende componentes víricos.

Una composición que comprende componentes víricos puede ser obtenible u obtenida en un método como se ha identificado anteriormente aquí.

Una composición preferida que comprende componentes víricos es obtenible en un método del primer aspecto como se ha definido en la presente anteriormente.

Sin embargo, las composiciones que comprenden componentes víricos obtenidos en otros métodos que aquellos de la presente invención se incluyen expresamente aquí.

Los componentes víricos en la composición preferiblemente son componentes víricos tal y como se define aquí arriba.

Los componentes víricos preferidos en la composición de la divulgación son componentes, preferiblemente partículas, de virus de ARNss de cadena negativa, con virus que pertenece a los *Paramyxoviridae* o a los *Orthomyxoviridae*.

Un virus preferido de la *Paramyxoviridae* es un virus (como se ha enumerado arriba) que pertenece al *Paramyxovirinae* o al *Pneumovirinae*.

Los virus preferidos del *Pneumovirinae* (pneumovirus) es un virus respiratorio sincitial (RSV), más preferiblemente un RSV humano o bovino. El RSV humano puede bien ser un subgrupo de virus A o B.

Los virus preferidos del *Paramyxovirinae* incluyen *Rubulavirus* (virus de la parotiditis) y *Morbillivirus* (virus del sarampión).

Como parte de la divulgación, los componentes víricos en la composición son componentes, preferiblemente partículas, de un virus que pertenecen a los *Orthomyxoviridae*.

Un *Orthomyxoviridae* preferido es un virus de gripe con influenzaviruses de los géneros Influenzavirus A, B o C, de los cuales A es más preferido.

Los subtipos preferidos de gripe A de un virus incluyen H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7, con el virus de gripe de origen porcino pandémico A (HINI) (SOIV, o H1N1v).

Como parte de la divulgación, la composición que comprende componentes víricos comprende un aminoácido básico o un derivado, como se ha definido aquí arriba, en una concentración total como se especifica aquí arriba.

Como parte de la divulgación, dicha composición comprende un aminoácido básico o un derivado, como se ha definido aquí arriba, en una concentración total que es superior a la concentración total de un aminoácido básico o derivado presente en un medio, preferiblemente un medio de cultivo.

En este contexto, "más alto" significa al menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% más alto o 5, 10, 20, 50 o 100 veces más alto.

Un medio de cultivo preferido es M199 como se usa en la parte experimental.

Tal medio tiene una concentración total de aminoácidos básicos o derivado de 0.81 mM: 0.33 mM L-arginina, 0.1 mM histidina y 0.38 mM L-lisina.

La identidad y concentraciones posibles de un aminoácido básico o derivado en un medio de cultivo pueden variar.

Una composición o solución de la divulgación comprende un aminoácido básico o un derivado en una concentración total que es superior a 0.81 mM. Dicha concentración total puede ser más alta que 0.85 mM, 0.90 mM, 0.95 mM, 1 mM, 1.1 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, o superior a 1.7 mM. Tal composición o solución puede comprender componentes víricos, un aminoácido básico o un derivado como se ha definido en la presente anteriormente y cualquier otra posible molécula normalmente presente en tal composición o solución.

Tal molécula incluye un tampón como se ha definido en la presente anteriormente y/o cualquier otra molécula normalmente presente en un medio de cultivo.

Como parte de la divulgación, dicha composición o solución comprende un aminoácido básico o un derivado vírico ambos como se ha identificado aquí y no comprende un tampón como se ha definido en la presente anteriormente.

Tal tampón está normalmente presente en un medio de cultivo.

Un componente de tampón preferido que no se comprende en dicha composición o solución es rojo de fenol.

Como parte de la divulgación se proporciona una composición o solución que consiste en o que consiste esencialmente en componentes víricos y un aminoácido básico o un derivado en una concentración total de al menos 0.01 mM. Preferiblemente dicha composición o solución consiste en o esencialmente consiste en componentes víricos y al menos 0.02 mM, 0.025 mM, 0.03 mM, 0.04 mM, 0.05 mM, 0.06 mM, 0.07 mM, 0.08 mM, 0.09 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 0.6 mM, 0.7 mM, 0.8 mM de un aminoácido básico o un derivado.

La identidad de dicho aminoácido básico o un derivado y de los componentes víricos presentes en esta composición o solución ha sido ya definida aquí.

Tal composición o solución preferiblemente no comprende cualquier otra molécula que aquellas específicamente identificadas aquí: los componentes víricos, el aminoácido básico o derivado y, opcionalmente, agua.

5 Como parte de la divulgación, en cualquiera de la composición o solución identificada aquí, la formación de agregados víricos se reduce en comparación con la formación de agregados víricos en una composición correspondiente que no comprende dicho aminoácido básico o derivado de estos.

10 En este contexto, reducido significa una reducción o una reducción de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de la cantidad de agregados víricos formados en comparación con la cantidad de agregados víricos en una composición correspondiente que no comprende aminoácido básico o derivado del mismo.

Esta reducción se puede observar sobre un periodo de al menos 1min, 1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, una semana o más.

15 [0087] Preferiblemente, cualquier composición o solución como se ha previsto aquí es de uso como una sustancia profiláctica o terapéutica/medicamento, más preferiblemente para inducir una respuesta inmune en un individuo contra dichos componentes víricos.

20 Esta composición se puede formular de forma adicional y se puede llamar una formulación o composición farmacéutica y es de uso como una sustancia/medicamento profiláctico o terapéutico, más preferiblemente para inducir una respuesta inmune en un individuo contra dichos componentes víricos.

[0088] Para uso como una sustancia/medicamento profiláctico o terapéutico, la formulación se puede usar como formulación líquida (suspensión) como formulación seca o se puede reconstituir por disolución de la formulación seca, por ejemplo, usando agua u otro líquido adecuado.

25 La formulación es preferiblemente reconstituida a su volumen original, es decir el volumen antes del secado.

Preferiblemente, la formulación es una formulación para inducir una respuesta inmune (en un individuo) contra una enfermedad o una enfermedad infecciosa o cancerosa.

30 Se entiende que el individuo o sujeto para el que las formulaciones de la divulgación sean administradas puede ser un humano, pero también puede ser un animal, tal como un animal de granja o mascota, incluyendo por ejemplo mamíferos (herbívoros, carnívoros y omnívoros), pájaros, reptiles, (como ganado, aves, ganado bovino, bovinos, cerdo, gatos).

Más preferiblemente, la formulación es una formulación para la vacunación contra una enfermedad (infecciosa).

La formulación es así preferiblemente una formulación para la prevención o tratamiento de una enfermedad infecciosa.

35 La divulgación también se refiere al uso de la formulación obtenible u obtenida en un método según la invención como se describe en este caso arriba para la producción de un medicamento para la inducción de la respuesta inmune, para vacunación y/o para la prevención o tratamiento de una enfermedad infecciosa.

La divulgación también se refiere a un método para inducir una respuesta inmune contra un agente infeccioso por administración de una cantidad eficaz de la formulación a un sujeto con la necesidad de la misma.

40 La respuesta inmune es preferiblemente inducida contra un antígeno presente en los componentes víricos.

El antígeno es preferiblemente un antígeno de un patógeno que causa la enfermedad infecciosa o un antígeno que induce una respuesta inmune contra el patógeno.

El patógeno es preferiblemente un virus como se ha definido aquí arriba.

45 La formulación de la divulgación puede estar administrada con o sin reconstitución mediante vía intranasal, parenteral, intramuscular, subcutánea y/o transdérmica.

[0089] En este documento y en sus reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los aspectos seguidos a la palabra están incluidos, pero artículos no específicamente mencionados no están excluidos.

50 Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "uno" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos.

El artículo indefinido "un" o "una" así normalmente significa "al menos uno".

55 [0090] Para facilidad de uso, el término IPV en este documento, se utiliza para abarcar el producto final al igual que su (proceso) intermedio, que todavía no están inactivados.

[0091] Los ejemplos siguientes se ofrecen para uso ilustrativo solo y no se destinan para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

60 Descripción de las figuras

[0092]

65 Figura 1: esquemas del proceso de producción de vacuna inactivada de la poliomielititis.

Durante el tratamiento aguas arriba, las células son expandidas utilizando dos pasos de pre-cultivo antes del cultivo celular y cultivo vírico.

El tratamiento aguas abajo consiste en la clarificación, concentración, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico seguida de inactivación.

Para obtener la vacuna de la polio trivalente, este procedimiento se sigue para cada polio tipo virus separadamente antes de mezclar para la formulación de producto final (Bakker, 2011).

5

Figura 2: efecto de la adición de diferentes aminoácidos básicos y derivados para soluciones que contienen un virus agregado en la dispersión de la agregación existente.

Se asumió que ninguna de las adiciones (0 mM) supondría la agregación máxima y se estableció en el 100% de virus agregado.

10

La reducción se muestra cuando se usan adiciones diferentes de aminoácidos básicos y derivados de la misma en concentraciones diferentes.

La detección de agregación fue realizada utilizando las mediciones de absorbancia a 590nm.

Otras longitudes de onda se pueden utilizar también, lo que lleva a espectros diferentes.

15

Los experimentos realizados en la figura 2(A) han sido realizados usando virus de la polio sin envoltura, Figura 2(B) con virus de gripe envuelto.

Las figuras 2C, 2D y 2E representan el efecto de respectivamente tres aminoácidos básicos diferentes (L-arginina, L-lisina y L-histidina) en la agregación de tres cepas de gripe diferentes (gripe A/Uruguay H3N2 (NIBSC) gripe B/Florida/4/2006 (NIBSC) y gripe A/PR/8/34 (NIBSC)). En las Figuras 2F, 2G y 2H representan el efecto de respectivamente tres aminoácidos básicos diferentes (L-arginina, L-lisina y L-histidina) en la agregación de tres poliovirus diferentes (Sabin) subtipos 1, 2 y 3.

20

Figura 3: potencia de rata Sabin-IPV (Albrecht P et al. 1984) utilizando el proceso de producción regular IPV como por ejemplo descrito por Thomassen, 2013b, contra el proceso optimizado según la invención.

Salk-IPV se usa como estándar de referencia (establecido a 1).

25

Sabin-IPV preparado utilizando el proceso optimizado, es decir usando métodos para prevenir la agregación, vacunas producidas con inmunogenicidad comparable o mejor en ratas en comparación con Sabin-IPV preparado como se describe por Thomassen 2013b.

Salk-IPV se usa como estándar de referencia interno (establecido a 1).

30

Figura 4: eliminación de L-arginina de un producto de poliovirus (Sabin tipo 2) SEC por diafiltración.

La eliminación de L-arginina a partir de un producto de poliovirus (Sabin tipo 2) SEC por diafiltración acciona la agregación de virus.

Una cantidad de L-arginina (cuadrados) se elimina por diafiltración, después de diez volúmenes se eliminó toda L-arginina.

35

El virus agregado (rombos) fue medido utilizando las mediciones de absorbancia.

Después de la eliminación completa de la L-arginina, los agregados de poliovirus se forman en una manera en función del tiempo.

Así la eliminación de L-arginina, como seguida de mediciones y cambios en la conductividad, produce una dispersión ligera aumentada (aumento de UV) provocada por la formación de agregados víricos.

40

Figura 5: efectos de diferentes aminoácidos básicos y derivados de los mismos en la reducción de agregados de poliovirus.

Los compuestos diferentes claramente muestran un efecto, dependiendo de su tipo y concentración.

45

Por ejemplo, agmatina, L-lisina y la mezcla de 3 aminoácidos básicos la reducción más profunda en el rango de concentración inferior hasta 50mM. En cualquier caso, una reducción de agregados desde la materia prima, como se ha medido por UV, es visible claramente y depende de su concentración.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: producción vírica

[0093] El cultivo celular a escala de laboratorio. El uso de diferentes sistemas. Producción de cepas de poliovirus atenuadas inactivadas a escala de laboratorio.

55

[0094] El proceso comienza con el cultivo de células Vero.

La línea de célula Vero se origina de células de riñón de mono verde africano (MKC) (ATCC CCL-81).

Los cultivos comienzan con una ampolla a partir de un banco de células congeladas caracterizado por pocillos.

Para adquirir la cantidad apropiada de células para inocular un biorreactor, un tren de semilla con cultivos de monoestrato en matraces TC comienza con un medio M199 que contiene 5% de suero bovino fetal.

60

El medio M199 es como se describe en Morgan J.F. Et al (1955) o Morgan J.F. Et al (1950). Comprende mM cantidades de aminoácidos básicos: L-arginina 0.33 mM, L-histidina 0.1 mM, L-lisina 0.38 mM (http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.86.html).

65

[0095] El tren de siembra es continuo con cultivos parciales en cuatro matraces T, tres matraces Hyper y tres tejidos celulares.

Las fábricas celulares tienen un área de superficie total de 3 * 6320 cm².

ES 2 689 150 T3

Las células se separan por tripsinisation.

Todo el cultivo de semilla lleva aproximadamente 2 semanas.

- 5 [0096] El cultivo de célula Vero (MKC primaria anterior fue usada) en biorreactores se realiza en micro portadores (Cytodex 1 GE Healthcare, número de producto 17-0448-**). Esta técnica fue desarrollada en RIVM a finales de 1960 por van Wezel (1978). Los microportadores proporcionan un área de superficie grande para la fijación de células Vero. El cultivo en micro portadores comienza en el modo de lote en un biorreactor de 5L (litro) (volumen de trabajo de 3L).
- 10 El biorreactor de 5 L se acciona con medio de cultivo 3L MEM suplementado con suero bovino (BS) (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma Aldrich, M4642). El biorreactor se prepara con microportadores 4 g/L Cytodex 1 y medio de cultivo E-MEM. Cuando las condiciones de cultivo son estables, el biorreactor se inocula con células del tren de sembrado para una concentración de células inicial de $0,8 * 10^6$ células/ml.
- 15 El cultivo comienza en el modo por lotes durante 1 día y continúa en modo de recirculación durante 3 días con 12L de medio E-MEM en la botella de recirculación. En las células de modo de recirculación inicia el crecimiento en multi estratos. Este modo de concentración de célula de $4,0 - 4,5 * 10^6$ células/ml se puede alcanzar en el biorreactor de 5L.
- 20 [0097] Las células son separadas del microportador por tripsinización. Las células liberadas se utilizan para iniciar un cultivo celular en un 20L. El biorreactor de 20L se prepara con 3 g/L de microportadores y medio de cultivo E-MEM suplementado con BS. El volumen de trabajo final después de la inoculación es 16L. El nivel de inoculación es $0,2 * 10^6$ células/ml. El biorreactor de 20L se acciona en modo de lote.
- 25 El cultivo tarda de 3-4 días dependiendo de la fase de latencia después de la transferencia de células desde el biorreactor de 5L al biorreactor de 20L. Los metabolitos como glucosa y glutamina se monitorizan para controlar si la alimentación de glucosa o glutamina es necesaria para mantener condiciones de crecimiento óptimas.
- 30 [0098] La propagación vírico se realiza en el biorreactor de 20L. Se realiza un cambio de medio de E-MEM para M199 para crear condiciones favorables para propagación del virus. La temperatura disminuye de 37°C a $32,5^{\circ}\text{C}$. El porcentaje de oxígeno disuelto (DO%) baja de 50 % a 25 %. La pluralidad del nivel de infección (MOI) es 0.01.
- 35 La propagación vírico y lisis llevan de 3-5 días dependiendo del subtipo de virus. La propagación vírico y lisis se monitorizan por inspección microscópica del efecto citopatológico (ECP). El cultivo del virus finaliza cuando el CPE es $\geq 90\%$ y/o cuando el consumo de oxígeno ha cesado y entonces se puede cosechar para purificación (proceso aguas abajo, DSP).
- 40 [0099] El biorreactor contiene un filtro de malla de acero de $75 \mu\text{m}$ para retener microportadores en el reactor. La cosecha del virus, que contiene restos celulares se clarifica mediante dos filtros desechables en serie. El casete de filtro de profundidad se ha incorporado de tierra diatomácea (HC Pod Filter grade COHC Millipore # MC0HC054H1). El filtro final es un filtro de capa doble de $0.5/0.2 \mu\text{m}$ (Millipore Express SHC opticap XL #KHGES015FF3).
- 45 [0100] El paso de concentración en el proceso de producción de la polio se realiza por filtración de flujo tangencial (TFF) (conocida también como filtración de flujo cruzado (CFF) o ultrafiltración (UF)). El factor de concentración total es 700-800. Para evitar altas pérdidas de producto en el volumen muerto del sistema de TFF, dos sistemas se usan uno tras otro. Ambos sistemas usan 100 kD de cassetes de filtro de pantalla plana (0.2 m^2 y 50 cm^2 resp.) Las partículas de virus se retienen y moléculas pequeñas acaban en el filtrado y son retiradas.
- 50 [0101] La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica de purificación que separa partículas y moléculas por tamaño. Las moléculas grandes se eluyen más rápido que las pequeñas. La columna se envasa con CL6B de GE healthcare. El primer valor máximo puede contener agregados y moléculas de alto peso molecular como proteínas de célula huésped (HCP). El segundo valor máximo es el valor máximo del producto con la mayor parte del poliovirus.
- 55 Durante la SEC, las partículas de poliovirus se eluyeron con un tampón fosfato con baja fuerza iónica (20 mM) de pH 7.0 ± 0.2 .
- 60 [0102] La cromatografía de intercambio iónico (IEX) es preferiblemente realizada con una matriz basada en ligando DEAE, Sefadex A50 de GE Healthcare.
- 65 Esta resina particular se suministra como un polvo seco desde el proveedor y necesita ser preparada por el usuario.

Esto implica inflamación y aumento de la resina, relleno de la columna y equilibrado de columna. El objetivo de esta operación unitaria es enlazar componentes cargados negativamente a la matriz. Las proteínas de célula ARN/ADN/huésped son los componentes principales que se ligan a la matriz de columna. El poliovirus ha limitado la interacción con la matriz.

5 [0103] El virus purificado obtenido de la cromatografía de intercambio iónico se estabiliza y diluye a una fuerza específica (cuando sea aplicable).

La estabilización y dilución se realiza con un medio de M199.

La concentración requerida depende del tipo de virus

10 [0104] Finalmente, se añade glicina a una concentración final de 5 g/L en la preparación de la inactivación

[0105] El virus estabilizado, purificado, diluido y preparado es inactivado utilizando formaldehído en una concentración final de 2-3 mM (o 1:4000).

15 La inactivación lleva 13 días y se realiza a una temperatura de 37 °C. Después de 6-8 días de inactivación, una filtración intermedia se realiza para eliminar posibles agregados.

[0106] Después de 13 días de inactivación, el grupo monovalente estéril se prepara para almacenamiento a 2-8 °C. En este punto el poliovirus inactivado obtenido se llama volumen monovalente

20 Mexcla/formulación

[0107] Se prepara una masa mediante la mezcla los serotipos requeridos en las concentraciones predeterminadas.

25 Esta puede ser bien una única formulación de una mezcla mono (tipo 1, tipo 2 o tipo 3) bi/divalente (tipo 1 y tipo 2 o tipo 1 y tipo 3 o tipo 2 y tipo 3) o trivalente (tipo 1 y tipo 2 y tipo 3).

Además, la formulación se puede combinar con otras vacunas tipo Diphteria, tos ferina, tétanos, Hepatitis, Haemophilus, meningitis, neumococal y/o otros.

30 Proceso optimizado

[0108] El proceso optimizado sigue el mismo procedimiento como se ha declarado arriba con las desviaciones siguientes:

- 35
- el paso de la clarificación se purga con el medio, después de que el producto de filtración termine
 - el segundo filtro en el paso de concentración no es un filtro de casete de 50cm² 100kD, sino que se usa una fibra de 115 cm² hueca como segundo filtro de 100kD (Spectrum labs # D02-E100-05-N).
 - el tampón durante la SEC se cambia a un tampón de fosfato suplementado con un aminoácido básico tipo L-arginina a un pH 7,0±0,2.
 - durante la cromatografía de intercambio iónico, el tampón usado para la preparación de la matriz y elución del producto se cambia a un tampón fosfato suplementado con un aminoácido básico como L-arginina a un pH 7,0±0,2.
- 40

El proceso mejorado da un rendimiento de antígeno D más alto (DU/ml) (con inmunogenicidad comparable o mejor como se puede ensayar por un ensayo de cultivo celular de neutralización de poliovirus en sueros de ratas inmunizadas (figura 3).

45 En la tabla 1, las recuperaciones (porcentajes basados en rendimiento de antígeno D) se dan para el proceso actual y optimizado (modificación por adición de un aminoácido básico), al igual que el rendimiento de proceso total para tipos de poliovirus 1 y 2. La antigenicidad del virus polio o producto de IPV fue evaluada utilizando un ELISA de antígeno D de polio (ten Have et al. 2012).

50 Tabla 1: comparación de rendimientos de poliovirus como se observa para el proceso de purificación actual y mejorado:

Paso de proceso	Rendimiento de paso del proceso (%)			
	Actual		con L-arginina añadida	
	Subtipo de poliovirus 1	Subtipo de poliovirus 2	Subtipo de poliovirus 1	Subtipo de poliovirus 2
SEC	69 ± 2.1	51 ± 0.8	77 ± 6.0	70 ± 3.8
IEX (DEAE)	94 ± 19.2	32 ± 4.5	93 ± 8.3	82 ± 7.1
En general	40 ± 1.5	4 ± 0.9	54	27

55 **Ejemplo 2.** Reducción de nivel de agregado

[0109] La reducción de agregación vírica se puede conseguir por adición de una solución (concentrado) de un aminoácido básico o derivado. Cualquier persona experta puede ajustar este método a su necesidad específica. Ver figuras 2A y 2B.

- 5 [0110] En otro experimento, se prepararon soluciones madre de aminoácidos básicos y se añadieron a lotes que contenían virus diferentes en una forma agregada.
 Las soluciones fueron añadidas en una proporción 1:1.
 La agregación fue medida como la absorbancia a 590nm (Biowave ADN, WPA).
 El virus agregado medido antes de la adición de aminoácidos básicos fue establecido al 100%.
- 10 Los efectos de diferentes concentraciones de adición de aminoácido en el porcentaje de virus agregado se muestran en las Figuras 2C, 2D y 2E para los efectos de tres aminoácidos básicos de L-arginina diferentes, L-lisina y L-histidina respectivamente) en tres cepas de gripe diferente (gripe A/Uruguay H3N2 (NIBSC), gripe B/Florida/4/2006 (NIBSC) y gripe A/PR/8/34 (NIBSC)). En las Figuras 2F, 2G y 2H, los resultados se representan para el efecto de respectivamente tres aminoácidos básicos diferentes (L-arginina, L-lisina y L-histidina) en tres subtipos diferentes de polio (Sabin) 1, 2 y 3.

Ejemplo 3. Adiciones sin conexión (disolución de la agregación existente - este es un ejemplo de referencia)

- 20 [0111] El virus agregado fue producido según el protocolo de producción Salk-IPV ligeramente modificado con un tampón de fosfato de 20mM (tipos de lotes Sabin 1, 2 y 3; fracciones de producto intermedio después de la SEC e IEX).
 Las fracciones de virus obtenidas fueron congeladas a -80°C hasta su uso.
 La congelación positivamente facilitó y/o mejoró el efecto de agregación.
- 25 [0112] La gripe (con agregados) fue producida utilizando un proceso basado en huevos de laboratorio que consiste en inoculación de huevos embrionados (cepa: A/Uruguay/H3N2 (NIBSC)), incubación, enfriamiento y cosecha posterior por centrifugación de pila de discos seguida de filtración de profundidad (GE Healthcare).
 El virus fue purificado por centrifugación de densidad de sacarosa, seguida de una inactivación de β-propiolactona con filtración. Finalmente, fue realizada una diafiltración/concentración.
- 30 [0113] El pH se mide utilizando un metro de pH calibrado (Orion scientific), con un electrodo de gel (Mettler Toledo) y corregido usando ácido sulfúrico o hidróxido sódico.
- 35 [0114] La densidad óptica, como medición de agregación se determinó usando un espectrofotómetro Biowave de ADN (WPA) a longitudes de onda de 450 & 590nm en cubetas de plástico desechable (Greiner) o cubetas de cuarzo con un diámetro de 10mm.
- 40 [0115] Ensayo de ELISA; la antigenicidad del virus de la polio o producto de IPV fue evaluada utilizando un ELISA (ten Have et al. 2012).
- 45 [0116] Los productos víricos fueron usados en pruebas fuera de línea con un rango de concentraciones de los aditivos diferentes según la tabla 2. El aditivo fue pesado en una probeta y a esta 1 o 2 ml del producto fueron añadidos, la solución y el aditivo fueron mezclados.
 Cuando los aditivos fueron disueltos, el cambio de pH fue medido y corregido (cuando se necesitó) al pH de producto inicial. Después de 1 hora la densidad óptica fue medida.

Tabla 2: Los aditivos a los que se les evaluó su capacidad de prevenir o deshacer la agregación de virus

Aditivo	Observaciones
L-arginina	
D Arginina	La forma quiral de L-arginina
L-lisina	
N-α-acetil L-arginina	Derivado de arginina
sal de sulfato de Agmatina	derivado de arginina
Mezcla compuesta de:	La misma concentración como se usa en el medio M199
glicina	
alanina	
l-valina	
l-leucina	
l-isoleucina	
l-prolina	
hidroxi-l-prolina	
l-serina	
l-treonina	

l-ácido glutámico l-glutamina l-ácido aspártico l-aspargina M199 (mezcla de >50 componentes)	Medio de cultivo celular
---	--------------------------

[0117] Las adiciones fuera de línea de aditivos diferentes se comportan de manera diferente en compensación de los agregados a molaridades diferentes y con productos diferentes (figuras 2A y 2B).

5 El producto de virus agregado inicial se ajustó al 100% medido sin adiciones, una solución de tampón blanco fue usada como control negativo, por ejemplo, ninguna agregación debe ser alcanzada 0%.

[0118] La adición del M199 al virus fue capaz de retirar los agregados formados de todos los productos víricos almacenados a -80°C del material almacenado o soluciones recientemente preparadas.

10 Para poliovirus, esta resultó en un 22% +/-12 de aumento de epitopo de antígeno D disponible como se ha medido en un ensayo ELISA (ten Have et al, 2012).

Ejemplo 4. Purificación rápida de la gripe (prueba de concepto)

[0119] La gripe fue purificada como una prueba de concepto usando arginina según el protocolo siguiente.

15 El suministro vírico fue obtenido a partir de cosecha de 10.000 SPF (sin patógeno específico) huevos embrionados de gallina inoculados, el día 11 con gripe A/Uruguay H3N2 virus (EID50/ml de 9.17) utilizando una máquina de inoculación semiautomática situada en una cabina de flujo descendente con filtros HVAC.

Antes de la inoculación, los huevos y las agujas fueron desinfectados utilizando un 70% de etanol.

20 Los huevos fueron incubados durante 72 horas durante 3 días a 35°C y luego se enfriaron durante toda la noche a cerca de 4°C, 12 horas con una temperatura eficaz por debajo de 8°C. La cosecha del fluido alantoideo de los huevos de decapados se produjo con una máquina de cosecha semiautomática en una cabina de flujo descendente.

25 La clarificación de la solución alantoica cosechada cruda fue realizada con una centrifugadora continua de separador de pila de disco Westfalia a 65 L/h, retropresión de 1 bar, 10.000 r.p.m., seguida de filtración usando dos filtros de profundidad de cápsula principal paralelos de 10 pulgadas 2.0 µm ULTA GE (GE Healthcare).

[0120] Del lote obtenido aproximadamente 3l fueron separados para la prueba a pequeña escala.

30 [0121] Los 3L fueron nuevamente divididos en 2 partes y cada porción fue concentrada aproximadamente 15 veces utilizando una fibra hueca (Healthcare GE #UFP-750-E-3X2MA) y diafiltrada, con 10 volúmenes, contra PBS (GIBCO) o PBS (GIBCO) suplementado con 0.35M de L-arginina (Sigma-Aldrich).

35 [0122] Del material diafiltrado y concentrado adquirido así, 10ml fueron evaluados en una columna de exclusión de tamaño de 90 cm de altura de cama (columna v111/100 Millipore) que contiene matriz de flujo rápido de sefrosa 6 (Healthcare GE) que usa PBS o PBS suplementado con 0.35M de L-arginina utilizando un sistema cromatográfico de explorador Akta (Healthcare GE)

[0123] Todas las muestras fueron inactivadas usando formaldehído antes del análisis.

40 Ensayos analíticos

[0124] El ensayo de SRID (inmunodifusión radial simple) se basa en la reacción entre los anticuerpos presentes en un gel de agarosa plano y el antígeno que difunde de un punto de solicitud en el gel.

45 Una vez la concentración de anticuerpo y antígeno sea igual, se produce una precipitación con forma de un anillo.

El precipitado fue manchado utilizando Coomassie Brilliant Blue y el tamaño del anillo fue usado como una medida para la concentración.

50 [0125] La concentración de ovalbúmina fue medida utilizando un sándwich directo ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas).

El ensayo fue realizado según las instrucciones del proveedor del equipo ELISA (Serazym Ovalbumina ELISA: Cat. Nº E041C, Seramun Diagnostica GmbH Wolzig).

Los duplicados independientes de dos diluciones diferentes fueron usados como muestras.

55 Las muestras que contienen el antígeno fueron pipetadas en los pocillos de placa ELISA recubiertos con anticuerpos de anti-ovalbúmina policlonales.

La anti-ovalbumina ligada a peroxidasa de rábano fue añadida, seguida del lavado de las sustancias no unidas.

La adición de un sustrato inició el desarrollo de un color azul.

Este proceso fue detenido añadiendo ácido sulfúrico; el color cambió de azul a amarillo.

La absorción a 450nm fue una medida para la cantidad.

60 Un filtro 630nm fue usado como referencia (Biotek lector con KC-jr y KC4 software).

Resultados

5 [0126] El material recogido de la ejecución cromatográfica fue evaluado en un ensayo SRID para el contenido de antígeno de hemaglutinina. El análisis mostró un 8 por ciento de contenido en antígeno de hemaglutinina más alto en el material suplementado con 0.35 m L-arginina.

10 [0127] Además el material concentrado y diafiltrado (UF/DF) de la fibra hueca que contenía el monohidrócloruro de L-arginina suplementado contenía significativamente menos (hasta 76%) de ovalbúmina presente en la muestra, lo que indica que la diafiltración fue mucho más eficaz en la eliminación de impurezas en la presencia del monohidrócloruro de L-arginina.

15 **Ejemplo 5:** efecto de adiciones para cromatografía de poliovirus

[0128] Deshacer la agregación después de que se haya producido es una manera de solucionar el problema. Sin embargo, durante la fabricación es más importante prevenir la agregación del principio. Durante el procesamiento del virus (polio), los agregados formados se retiran durante la SEC y se enlazan como impurezas a la columna IEX (DEAE), lo que lleva a altas pérdidas de producto (hasta 70%).

20 [0129] Las separaciones cromatográficas fueron realizadas en soluciones diferentes según la tabla 3. La materia prima es el poliovirus concentrado desde el congelador -80°C o recientemente preparado. Solo la adición de L-arginina HCL al tampón de fosfato de 20mM fue evaluada durante separaciones cromatográficas junto al control.

25 [0130] El rendimiento (en términos de recuperación de antígeno D) fue determinado, los resultados se dan en las tablas 4 y 5 (nd = no hecho).

30 Tabla 3: adiciones de cromatografía

	Control	Alternativa 1	Alternativa 2
SEC	Fosfato 20mM pH7.0	M199	Fosfato 20mM + L-argininal 150mM pH 7.0
IEX	20mM Fosfato pH7.0	M199	Fosfato 20mM + L-arginina 150mM pH 7.0

Tabla 4: resultado de recuperación de SEC (cromatografía en columna de exclusión de tamaño) (porcentaje (%) basado en antígeno D por mililitro) con tampones de elución diferentes

Recuperación de Poliovirus (%)				
Lote	Tipo de poliovirus	Control: tampón fosfato	Alternativa 1: M199	Alternativa 2: L-arginina
1	1	30	16	73
2	1	67	nd	81
3	2	72	59	66
4	2	66	nd	69
5	3	71	64	58
6	3	75	nd	73
7	3	83	nd	68

35 Tabla 5: cromatografía en columna de intercambio de iones) resultados de recuperación (porcentaje (%) basado en antígeno D por mililitro) con tampones de elución diferentes

Recuperación de Poliovirus (%)				
Lote	Tipo Poliovirus	Control: tampón fosfato	Alternativa 1: M199	Alternativa 2: L-arginina
1	1	37	102	99
2	1	100	Nd	87
3	2	Nd	21	90
4	2	28	Nd	83
5	3	58	76	93
6	3	87	Nd	92
7	3	100	d	105

40 [0131] La adición de L-arginina al tampón de elución puede tener un efecto positivo, que se observa principalmente durante la SEC para tipos 1 y 2, mientras para el IEX está especialmente claro para el tipo 2. La adición de la alternativa 1 (M199) parece ser beneficiosa también, sin embargo durante la purificación de este

compuesto mostró reducir la capacidad en el IEC, limitando su uso considerablemente cuando se compara con la alternativa 2.

5 [0132] En otro experimento, se produjo un lote de producto de alta densidad celular (método semilote, Thomassen et al., 2014), infectado con Sabin subtipo 2 y purificado según Thomassen et al, 2013a y proceso optimizado de ejemplo 1, hasta que se hizo un lote concentrado 400 veces (por cosecha, filtración y ultrafiltración).

10 Este material fue dividido en partes alícuotas y almacenado a -80°C. Este material fue descongelado y purificado usando cromatografía de exclusión por tamaño con una resina Cl6B en un sistema de explorador Akta (Healthcare GE) usando adiciones de aminoácido básico diferentes a concentraciones diferentes al tampón fosfato de 20mM de control.

Las variaciones y resultados se representan en la tabla 6 de abajo.

La concentración de producto (antígeno D) es un promedio de un triplicado [ten Have et al, 2012], el aumento de producto ha sido calculado y proporcionado en una diferencia en porcentaje.

15 Tabla 6: cromatografía de exclusión por tamaño de Sabin subtipo 2 usando adiciones de aminoácido básico diferentes a concentraciones diferentes al tampón fosfato de 20mM de control

	concentración aditiva total (mM)	antígeno D (producto/ml)	% aumento de producto
Control	0	2330	-
L-arginina	0,81	3065	32
	2,5	3273	40
	5	3285	41
	25	3134	35
	50	3200	37
	100	2993	28
	150	2993	28
D-Arginina	2,5	3394	46
	25	3101	33
L-lisina	2,5	3226	38
	25	2735	17
	150	2420	4
L-histidina	2,5	2929	26
	150	2386	2
D-Histidina	2,5	3577	54
	25	3649	57
Agmatina	75	3318	42
His D de 2,5mM+Lys L de 2,5 mM	5	3418	47
his D de 25mM+Lys L de 25mM	50	2735	17
Arg L 50mM+ His L de 50mM + Lys L de 50mM	150	3220	38

20 [0133] De la tabla 6 es obvio que adiciones diferentes y concentraciones diferentes tienen un efecto en la recuperación de producto de la cromatografía de exclusión por tamaño. En cualquier caso, el rendimiento de producto aumentó de moderado (2%) a alto (57%), lo que claramente muestra la mejora del aminoácido básico adicionado.

25 **Ejemplo 6:** eliminación de L-arginina a partir de un producto purificado poliovirus intermedio (SEC) usando diafiltración

[0134] La adición de un aminoácido básico a una partícula vírica que contiene la solución disuelve y/o previene la formación de agregado.

30 Eliminando el aminoácido básico nuevamente, se espera que regrese la agregación.

Este fue ilustrado por la producción de un lote de poliovirus (Sabin tipo 2) usando cromatografía de exclusión por tamaño (C16B en una columna xk26/80 ambos Healthcare GE) utilizando un tampón de elución que contiene L-arginina.

35 La solución de producto de virus obtenida fue posteriormente lavada/diafiltrada, como se sabe en la técnica, utilizando una fibra hueca 100kD, contra una solución tamponada similar sin el aditivo en el mismo índice donde el filtrado se retira, así manteniendo un volumen de retenido constante.

La absorbancia, medida para la cantidad de agregados, se midió fuera de línea utilizando un espectrofotómetro (Biowave DNA, WPA) la concentración de L-arginina fue medida utilizando un RMN. La presión y conductividad fueron seguidas en línea con sensores desechables Pendotech.

Un volumen de diafiltración corresponde al volumen de producto de virus total (75ml) presente en el sistema. El sistema se dejó a correr 10 volúmenes de diafiltración con flujo constante y TMP (tiempo total de 2.5 horas) y se tomaron muestras (y se corrigieron de volumen) después de cada intercambio en volumen de diafiltración para análisis.

[0135] Los resultados se representan en la figura 4 y muestran que la concentración de L-arginina se reduce rápidamente por debajo del límite de detección (1mM) del RMN usado después de 3 - 4 volúmenes de diafiltración.

De forma correspondiente con esta concentración disminuida de L-arginina la absorbancia aumentó, lo que indica la agregación de partículas de virus.

La L-arginina puede ser indirectamente seguida de la conductividad también.

La conductividad disminuye en paralelo rápidamente con la eliminación de L-arginina para alcanzar una conductividad final de 2.9mS/cm que corresponde con el tampón de control, lo que indica que el aditivo se ha retirado.

La absorbancia se ha más que duplicado después 1 de 0 volúmenes de diafiltración en comparación con el valor inicial cuando este valor de conductividad ha sido alcanzado.

Esto muestra claramente que la adición del aminoácido básico fue la causa de la reducción en la agregación (como se visualiza por UV) y que el proceso es reversible, es decir, el aditivo puede ser retirado, sin embargo, la agregación volverá.

Ejemplo 7: purificación de poliovirus tipo salvaje en presencia o ausencia de aminoácidos básicos

[0136] Se produjo y purificó un virus de polio de tipo salvaje tipo 2 hasta las etapas cromatográficas en un procedimiento como se describe por Thomassen et al (2013 a).

El material fue purificado utilizando dos columnas diferentes SEC, en un tampón de fosfato de 40mM (pH7.0 +/- 0.2).

Un tampón contenía el aditivo (150mM de L-arginina) y un tampón estaba sin aditivo.

Ambos productos obtenidos fueron purificados posteriormente en un IEX (flujo rápido de sefarosa DEAE, Healthcare GE), nuevamente utilizando los dos tampones mencionados anteriormente.

La tabla 7 muestra los resultados para el IEX. Está claro que la presencia del aditivo resultó en un rendimiento de producto mayor casi multiplicando el rendimiento de producto medido por ELISA (Ten Have R et al, 2012) y el área de valor máximo.

En ambos casos, la purificación resultó en los productos de virus de pureza buena (basada en la proporción UV como se ha determinado por Koch y Koch 1985, datos no mostrados).

Tabla 7: la purificación SEC e IEX de poliovirus tipo salvaje en presencia o ausencia de 150 mM de L-arginina. El área de valor máximo corresponde a cantidades de poliovirus. El antígeno D medido corresponde a virus inmunogénico.

	Sin 150 mM de L-arginina	Con 150 mM de L-arginina
El área de valor máximo (mAU*ml)	3621	6006
Antígeno D de poliovirus (DU / ml)	994	1845

[0137] En otro experimento tipo salvaje un virus de la polio tipo 3 fue producido nuevamente y purificado hasta las etapas cromatográficas en un procedimiento como se describe por Thomassen et al (2013a). El material fue purificado utilizando una columna SEC en el tampón de fosfato regular de 40mM de pH 7.0 +/-0.2).

El producto obtenido fue dividido en 2 partes de la misma cantidad.

Para una parte, un tampón concentrado altamente que contiene L-arginina se añadió para hacer una concentración final de 149mM, mientras a la otra parte se añadió la misma cantidad de tampón regular para compensar el efecto de dilución.

Ambos productos fueron purificados posteriormente en un IEX (flujo rápido de sefarosa DEAE, Healthcare GE), utilizando el tampón de fosfato de 40mM con o sin aditivo (150mM de L-arginina), dependiendo de la porción para ser purificada.

En la tabla 8 se muestran los resultados del IEX. Está claro nuevamente que el aditivo resultó en un rendimiento de producto (basado en área de valor máximo).

En ambos casos, la purificación resultó en los productos de virus de pureza buena (basados en la proporción UV como se ha determinado por Koch y Koch 1985, datos no mostrados).

Tabla 8: purificación IEX de poliovirus tipo salvaje tipo 3 en presencia o ausencia de 150 mM L-arginina

	Sin 150 mM de L-arginina	Con 150 mM de L-arginina
El área de valor máximo de producto (mAU*ml)	3887	4789

[0138] Del ejemplo 7 está claro que la adición puede hacerse en formas diferentes para ser eficaz, bien directamente y co-eluyendo o después, ya que un compuesto de materia prima altamente concentrado no importó. El producto con el aditivo, en cualquier caso, mostró un rendimiento más alto.

5 Diferentes formas de adiciones, tal como un sólido, a través de diafiltración o como materia prima concentrada altamente supondrán todas rendimientos más altos también.

Ejemplo 8: purificación de un poliovirus quimérico en presencia o ausencia de aminoácidos básicos

[0139] Se obtuvo un poliovirus experimental, que representa una combinación/quimera/híbrido del virus tipo salvaje (bases de IPV desarrollada por Salk) y virus atenuado (cepas Sabin).

Este virus fue estropeado además por modificación genética para hacerlo menos activo biológicamente en mamíferos para prevenir adicionalmente cualquier enfermedad/percance severo.

Este virus experimental fue producido utilizando el proceso de producción existente (Bakker et al, 2011 and Thomassen et al, 2013a) a escala de laboratorio para evaluar su potencial.

15 Para la parte de separación cromatográfica, se usaron tanto tampón de fosfato de 20 mM puro (control) como un tampón fosfato de 20mM que contenía L-arginina de 150mM.

Los resultados se representan en la tabla 9, que muestra el rendimiento de operaciones unitarias individuales (%) y la operación unitaria cromatográfica combinada.

20 La tabla 9 muestra claramente los efectos beneficiosos del aditivo de L-arginina ya que se alcanzan recuperaciones más altas en general.

Tabla 9: rendimiento de poliovirus quimérico (%) para operaciones unitarias individuales (SEC e IEX) y operaciones unitarias combinadas

	Rendimiento (%)			
	Tipo 1		Tipo 2	
	Control	Aditivo	Control	Aditivo
SEC	67	90	60	100
IEX	75	88	59	70
Combinadas SEC & IEX	50	79	35	70

Ejemplo 9: cromatografía en modo mixto/multimodal en presencia de aminoácidos básicos

[0140] El uso de un aditivo en el tampón de elución, abre la vía para opciones de purificación nuevas, tales como el uso de separaciones cromatográficas en modo mixto/multimodales, en vez de intercambio iónico regular.

30 Por la presente, ambos efectos electroestáticos e hidrofóbicos están en juego para permitir la separación bi-dimensional de partículas, incluso permitiendo que las partículas cercanamente relacionadas, con respecto a un punto isoelectrico, se separen. Un ejemplo se da en la tabla 10. Una HEA Hypercell resina cromatográfica alifática (Pall Corporation) se utiliza para purificar Sabin de tipo 2. La pureza del producto se determina basándose en la proporción UV 260/280 conforme a Koch y Koch (1985), por lo cual la proporción objetivo para poliovirus puro está en el rango de 1.60-1.80.

35 Sin L-arginina presente, el virus HEA-purificado tiene una proporción UV 260/280 de 0.98, mientras que el virus purificado en la columna HEA en presencia de 150mM L-arginina alcanza repentinamente una alta pureza como se indica por una proporción de UV 260/280 de 1.76, es decir en el rango diana.

40 Tabla 10. Pureza de producto de polio vírico en una resina cromatográfica multimodal

	diana	control	aditivo
Proporción UV260/280	1.60-1.80	0.98	1.76

[0141] El uso de nuevo y resinas más modernas crea nuevas opciones para purificación vírica.

Ejemplo 10: efectos de diferente aminoácido básico y derivados del mismo en la reducción de agregación de poliovirus

[0142] Una placa negra de 96 pocillos en forma de chimenea con un fondo claro fue usada para seleccionar diferentes compuestos y concentraciones frente a un lote de polio agregado purificado de forma intermedia (Sabin, tipo 1, derivado de un paso de cromatografía de exclusión por tamaño en un tampón de fosfato sencillo).

50 Las soluciones madre de los varios compuestos fueron preparadas en una placa de 96 pocillos profundos mediante la mezcla soluciones madre concentradas con tampón (ambos a pH 7.0 +/- 0.2) a una molaridad predeterminada, después de la cual estos fueron añadidos a la placa de 96 pocillos negros en cantidades iguales con la preparación de virus que debe evaluarse (1:1).

55 La placa resultante se mezcló en una plataforma de agitación y la absorbancia (590 nm) fue medida después de 5 minutos. Los resultados se representan en la figura 5.

Referencias

- [0143]
- 5 Albrecht P., Van Steenis G., Van Wezel AL., Salk J. Standardization of poliovirus neutralizing antibody tests. *Rev Infect Dis*, 6 (May-June (Suppl. 2)) (1984), pp. S540-S544.
- Aylward B, Tangermann R. The global polio eradication initiative: Lessons learned and prospects for success. *Vaccine* 29(S4), D80-D85 (2011).
- 10 Arakawa, T., John S Philo, Kouhei Tsumoto, Ryosuke Yumioka, Daisuke Ejima. Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions. *Protein Expression and Purification*. 2004 volume 36 (issue 2) Pages 244-248.
- Arakawa, T.; Kita, Y.; Koyama, A.H. Synergistic virus inactivation effects of arginine. *Biotechnol.J.* 2009, 4, 174-178.
- 15 Bakker WA, Thomassen YE, van't Oever AG, Westdijk J, van Oijen MG, Sundermann LC, van't Veld P, Sleeman E, van Nimwegen FW, Hamidi A, Kersten GF, van den Heuvel N, Hendriks JT, van der Pol LA. *Vaccine*. 2011 Sep 22;29(41):7188-96.
- Baynes BM, Trout BL. Rational design of solution additives for the prevention of protein aggregation. *Biophys J*. 2004 Sep;87(3):1631-9.
- 20 Baynes BM, Wang DI, Trout BL. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*. 2005 Mar 29;44(12):4919-25.
- Chumakov K, Ehrenfeld E, Wimmer E, Vadim I. Vaccination against polio should not be stopped. *Nature Rev. Microbiol.* 5, 952-958 (2007).
- Chumakov K, Ehrenfeld E, Plotkin S. New generation of inactivated poliovirus vaccines for universal immunization after eradication of poliomyelitis. *Clin. Infect. Dis.* 47(12), 1587-1592 (2008).
- 25 Cromwell MEM, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2006 September; 8(3): E572-E579.
- Das TK. Protein particulate detection issues in biotherapeutics development - current status. *AAPS PharmSciTech*. 2012 Jun;13(2):732-46.
- Desnues, C., and D. Raoult. 2010. Inside the lifestyle of the viroplasm. *Intervirology* 53:293-303.
- 30 Duchene M, Peetermans, d'Hondt E, Harford N, Fabry L, Stephenne J. Production of poliovirus vaccines: past, present, and future. *Virico Immunology* 3(4), 243-272 (1990).
- Nathanson N, Kew OM. From Emergence to Eradication: The Epidemiology of Poliomyelitis Deconstructed. *Am. J. Epidemiol.* (2010) 172(11): 1213-1229.
- Fields Virology, 5th edition, 2007; Bernard N. Fields, David Mahan Knipe, Peter M. Howley, Wolters Kluwer.
- 35 Gu Z et al. Inhibition of aggregation by media selection, sample loading and elution in size exclusion chromatographic refolding of denatured bovine carbonic anhydrase B.J. *Biochem Biophys Methods*. 2003. 56(1-3):165-75).
- Hamidi A, Bakker WAM. Innovative IPV from attenuated Sabin poliovirus or newly designed alternative seed strains. *Pharmaceutical Patent Analyst* (2012) 5(1):589-599.
- 40 Heinsbroek E, Ruitenber EJ. The global introduction of inactivated polio vaccine can circumvent the oral polio vaccine paradox. *Vaccine* 28(22), 3778-3783 (2010).
- Heymann DL, Sutter RW, Aylward RB, A vision of a world without polio: The OPV cessation strategy. *Biologicals* 34(2), 75-79 (2006).
- Heymann DL, Sutter RW, Aylward RB. A global call for new polio vaccines. *Nature* 434, 699-700 (2005).
- 45 Holmes EC. *Virico* evolution in the genomic age. *PLoS Biol.* 2007;5(10):e278.
- Jonges M, Liu WM, van der Vries E, Jacobi R, Pronk I, Boog C, Koopmans M, Meijer A, Soethout E. Influenza virus inactivation for studies of antigenicity and phenotypic neuraminidase inhibitor resistance profiling. 2010, *J. Clin. Microbiol.* 48:928-940.
- 50 Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct*. 2006 Sep 19;1:29.
- Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Ann. Rev. Microbiol.* 59, 587-635 (2005).
- Koch and Koch. *The molecular biology of poliovirus*. 1985 Springer-Verlag Wien-New York ISBN 3-211-81763-8.
- 55 Li Y, Weiss WF, Roberts CJ. Characterization of high-molecular-weight non native aggregates and aggregation kinetics by size exclusion chromatography with inline multi-angle laser light scattering. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009 vol 98 issue 11 p3997-4016.
- Lee Sang-Won, Philip F. Markham, Mauricio J. C. Coppo, Alistair R. Legione, John F. Markham, Amir H. Noormohammadi, Glenn F. Browning, Nino Ficorilli, Carol A. Hartley, Joanne M. Devlin. Attenuated Vaccines Can Recombine to Form Virulent Field Viruses. *Science* 13 July 2012: 188.
- 60 Montagnon BJ, Fanget B, Vincent-Falquet JC. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. *Rev Infect Dis*. 1984 May-Jun;6 Suppl 2:S341-4.
- Montagnon B, Vincent-Falquet JC, Fanget B. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. Promising results. *Dev Biol Stand*. 1983;55:37-42.
- Morgan, J.F. and Campbell, M.E. (1955) *J. Natl. Cancer Inst.*, 16:557.
- 65 Morgan, J.F., Morton, H.J. and Parker R.C. (1950) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73:1.

Nathanson & Kew. From emergence to eradication: the epidemiology of poliomyelitis deconstructed. *Am J Epidemiol.* 2010 Dec 1;172(11):1213-29.

Pearson, H. 2008. 'Virophage' suggests viruses are alive. *Nature* 454:677.

Robinson HL. Vírico attenuation by design. *Nature Biotechnology.* 2008 Sep;26(9):1000-1.

5 Sanders P, Edo-Matas D, Custers JHHV, Koldijk MH, Klaren V, Turk M, Luitjens A, Bakker WAM, Uytdehaag F, Goudsmit J, Lewis JA, Schuitemaker H, PER.C6® cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: A potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine.* 2013 Jan 21;31(5):850-6.

10 Sun L, Young LN, Zhang X, Boudko SP, Fokine A, Zbornik E, Roznowski AP, Molineux IJ, Rossmann MG, Fane BA. Icosahedral bacteriophage ΦX174 forms a tail for DNA transport during infection. *Nature.* 2014 Jan 16;505(7483):432-5.

Taylor, J. P.; Hardy, J.; Fischbeck; K. H. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science.* 2002 Jun 14;296(5575):1991-5.

15 Taylor DJ, Ballinger MJ, Bowman SM, Bruenn J. Virus-host co-evolution under a modified nuclear genetic code. *PeerJ* 2013 March 5; 1e50.

Ten Have R, Thomassen YE, Hamzink MR, Bakker WA, Nijst OE, Kersten G, Zomer G. Development of a fast ELISA for quantifying polio D-antigen in in-process samples. *Biologicals.* 2012 Jan;40(1):84-7.

Thomassen YE, van Sprang EN, van der Pol LA, Bakker WA. Multivariate data analysis on historical IPV production data for better process understanding and future improvements. *Biotechnology & Bioengineering* 2010 Sep 1;107(1):96-104.

20 Thomassen YE, Rubingh O, Wijffels RH, van der Pol LA, Bakker WA, *Vaccine.* 2014 May 19;32(24):2782-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.022. Epub 2014 Feb 26.

Thomassen YE, van't Oever AG, Vinke M, Spiekstra A, Wijffels RH, van der Pol LA, Bakker WA. Scale-down of the inactivated polio vaccine production process. *Biotechnol Bioeng.* 2013a May; 110(5):1354-65.

25 Thomassen, YE, van 't Oever, AG, van Oijen MGCT, Wijffels, R.H., van der Pol, LA, Bakker, WAM. Next generation inactivated polio vaccine manufacturing to support post polio-eradication biosafety goals. *PLOS One.* 2013b Dec 12;8(12):e83374

Thompson KM, Tebbens RJ. Current polio global eradication and control policy options: perspectives from modeling and prerequisites for oral poliovirus vaccine cessation. *Expert Review of Vaccines* 11(4), 449-459 (2012).

30 Utsunimoya, H.; Ichinose, M.; Tsujimoto, K.; Katsuyama, Y.; Yamasaki, H.; Koyama, A.H.; Ejima, D.; Arakawa, T. Co-operative thermal inactivation of herpes simplex virus and influenza virus by arginine and NaCl. *Int. J. Pharm.* 2009, 366, 99-102.

Van Wezel AL, van Steenis G, Hannik CA, Cohen H. 1978. New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines. *Develop, biol. Standard.* 41 : 159-168.

35 Verdjik P, Rots NY, Bakker WAM. Clinical development of a novel inactivated poliomyelitis vaccine based on attenuated Sabin poliovirus strains. *Expert Review of Vaccines* (2011) 10(5):635-644.

Wei Wang. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. *International journal of pharmaceutics* 2005; 289: 1-30.

40 Westdijk, J., et al., Characterization and standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines. *Vaccine*, 2011. 29(18): p. 3390-7.

Widjoatmodjo MN, Boes J, van Bers M, van Remmerden Y, Roholl PJ, Luytjes W. A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats. *Virology* 2010 Jun 2;7:114.

45 Yamasaki, H.; Tsujimoto, K.; Koyama, A.H.; Ejima, D.; Arakawa, T. Arginine facilitates inactivation of enveloped viruses. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 3063-3073.

Zor and Selinger, Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996 May 1;236(2):302-8.

50 Abreviaturas

[0144]

	AU	- unidades de absorbancia
55	CCID50	- 50% de dosis infecciosa de cultivo celular
	CFF	- filtración de flujo cruzado
	Cm	- centímetros
	CPE	- efecto citopático
	DEAE	- dietilaminoetanol
60	DF	- diafiltración
	DLS	- dispersión de luz dinámica
	ADN	- ácido desoxirribonucleico
	DO	- oxígeno disuelto
	DSP	- proceso aguas abajo
65	DU	- unidad de antígeno D
	EID50	- 50% de dosis infecciosa en huevo

	ELISA	- ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
	E-EM	- medio mínimo esencial de Eagle
	FTU	- unidad de turbidez de formazina
	HCP	- proteína de célula huésped
5	HEA	- hexilamina
	HPV	- virus del papiloma humano
	HVAC	- calentamiento, ventilación y aire acondicionado
	IEC/IEX	- cromatografía de intercambio iónico
	IPV	- vacuna inactivada contra la poliomielitis
10	KD	- kiloDalton
	M199	- medio 199
	MALS	- dispersión de luz multiángulo
	MKC	- célula de riñón de mono
	MM	- milimolar
15	MOI	- pluralidad de infección
	MS	- milli-Siemens
	NIBSC	- Instituto Nacional para Estándares Biológicos y Control
	Nm	- nanómetro
	RMN	- resonancia magnética nuclear
20	NTU	- unidad nefelométrica de turbidez
	OD	- densidad óptica
	OPV	- vacuna contra la poliomielitis oral
	PBS	- suero salino tamponado con fosfato
	RIVM	- Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente
25	ARN	- ácido ribonucleico
	RSV	- virus respiratorio sincitial
	SEC	- cromatografía de exclusión por tamaño
	SIPV	- vacuna inactivada contra la poliomielitis basada en Sabin
	SPF	- sin patógeno específico
30	SRID	- inmunodifusión radial única
	TCID50	- 50% de dosis infecciosa de cultivo de tejido
	TFF	- filtración de flujo tangencial
	UF	- ultrafiltración
	USP	- proceso aguas arriba
35	UV	- ultravioleta
	VAPP	- Poliomielitis parálitica asociada a vacuna
	VDPV	- Poliovirus derivado de vacuna
	VLP	- partículas tipo virus

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de una composición que comprende partículas de Enterovirus, donde el método comprende las etapas de:
- 5 a) producción de un medio que contiene las partículas de Enterovirus;
b) purificación de las partículas de Enterovirus desde el medio, por lo cual durante al menos una parte de la purificación un aminoácido básico o un derivado está presente a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus; e,
10 c) inactivación de las partículas de Enterovirus;
- donde el aminoácido básico o derivado es seleccionado del grupo que consiste en: arginina, lisina, histidina, arginina HCl, lisina HCl, histidina HCl, agmatina, dihidrocloruro de éster etílico de L-arginina, ácido tranexámico, hidrocloreuro DL-5-hidroxisina, dihidrocloruro de éster metílico de L-lisina, 3-metil-L-histidina, sales derivadas y combinaciones de los mismos.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además un paso d) donde las partículas de Enterovirus son formuladas.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde el aminoácido básico o derivado está presente a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus durante al menos una parte del paso c).
- 25 4. Método según la reivindicación 3, donde también durante el paso d) el aminoácido básico o derivado está presente a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, donde la concentración del aminoácido básico o derivado es al menos 1 mM y suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus mientras se mantiene en toda la duración de al menos uno de los pasos b), c) y d).
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, donde la concentración final del aminoácido básico o derivado es al menos 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM o 100 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, donde las partículas de Enterovirus son partículas tipo virus de un Enterovirus.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, donde las partículas de Enterovirus son seleccionadas de un Enterovirus del grupo que consiste en poliovirus, virus Coxsackie A, virus Coxsackie B, echovirus, rinovirus y enterovirus 68, 69, 70, 71 y 73.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, donde las partículas de Enterovirus comprenden poliovirus de los serotipos 1, 2 y 3.
- 50 10. Método según cualquier según la reivindicación 1 a 9, donde la composición que comprende partículas de Enterovirus es una vacuna.
11. Método según la reivindicación 10, donde la vacuna es una vacuna de la polio inactivada (IPV).
- 55 12. Uso de un aminoácido básico o derivado para prevenir o reducir la agregación de partículas de Enterovirus durante la purificación de las partículas de Enterovirus a partir de un medio, por lo cual durante al menos una parte de la purificación, el aminoácido básico o su derivado está presente a una concentración final de al menos 1 mM y es suficiente para prevenir o reducir la agregación de las partículas de Enterovirus y donde el aminoácido básico o derivado es seleccionado del grupo que consiste en: arginina, lisina, histidina, arginina HCl, lisina HCl, histidina HCl, agmatina, dihidrocloruro de éster etílico de L-arginina, ácido tranexámico, hidrocloreuro DL-5-hidroxisina, dihidrocloruro de éster metílico de L-lisina, 3-metil-L-histidina, sales derivadas y combinaciones de los mismos.
- 60 13. Uso según la reivindicación 12, donde las partículas de Enterovirus son seleccionadas de un *Enterovirus* del grupo que consiste en poliovirus, virus Coxsackie A, virus Coxsackie B, echovirus, rinovirus y enterovirus 68, 69, 70, 71 y 73.
- 65 14. Uso según la reivindicación 13, donde las partículas de Enterovirus son los poliovirus de al menos uno de los serotipos 1, 2 y 3.

15. Uso según la reivindicación 13, donde las partículas de Enterovirus son una vacuna inactivada contra la polio (IPV).

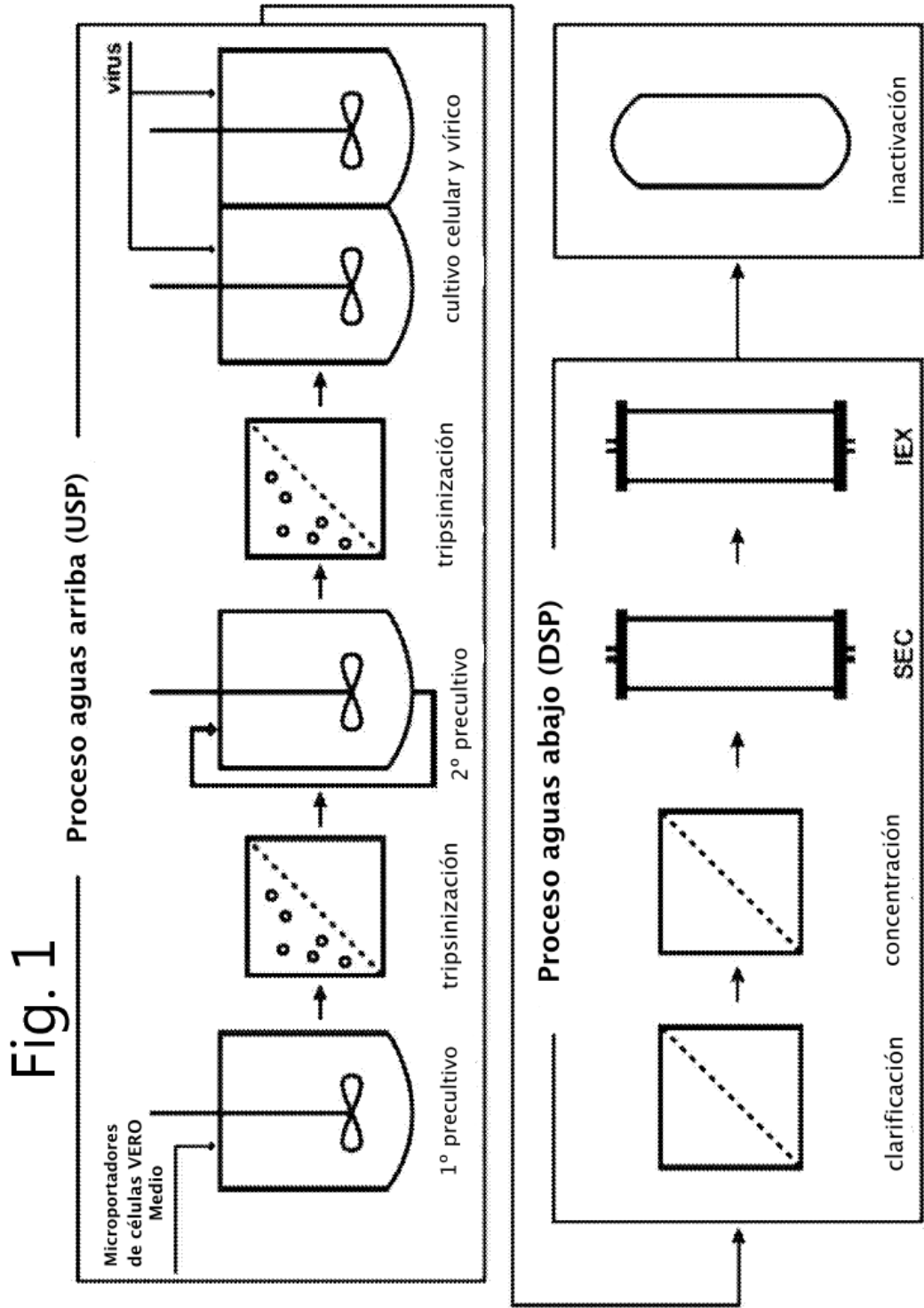


Fig. 2a

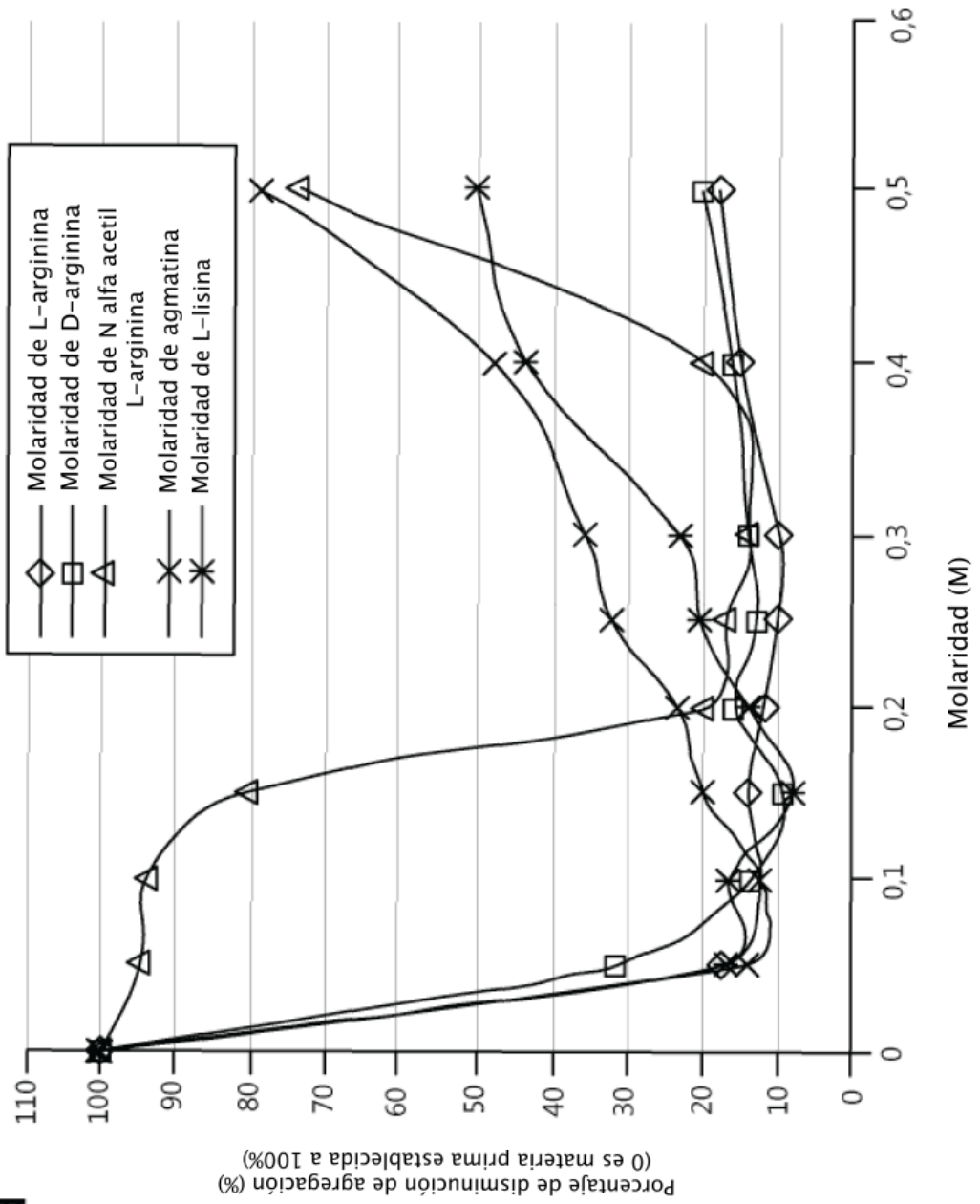


Fig. 2b

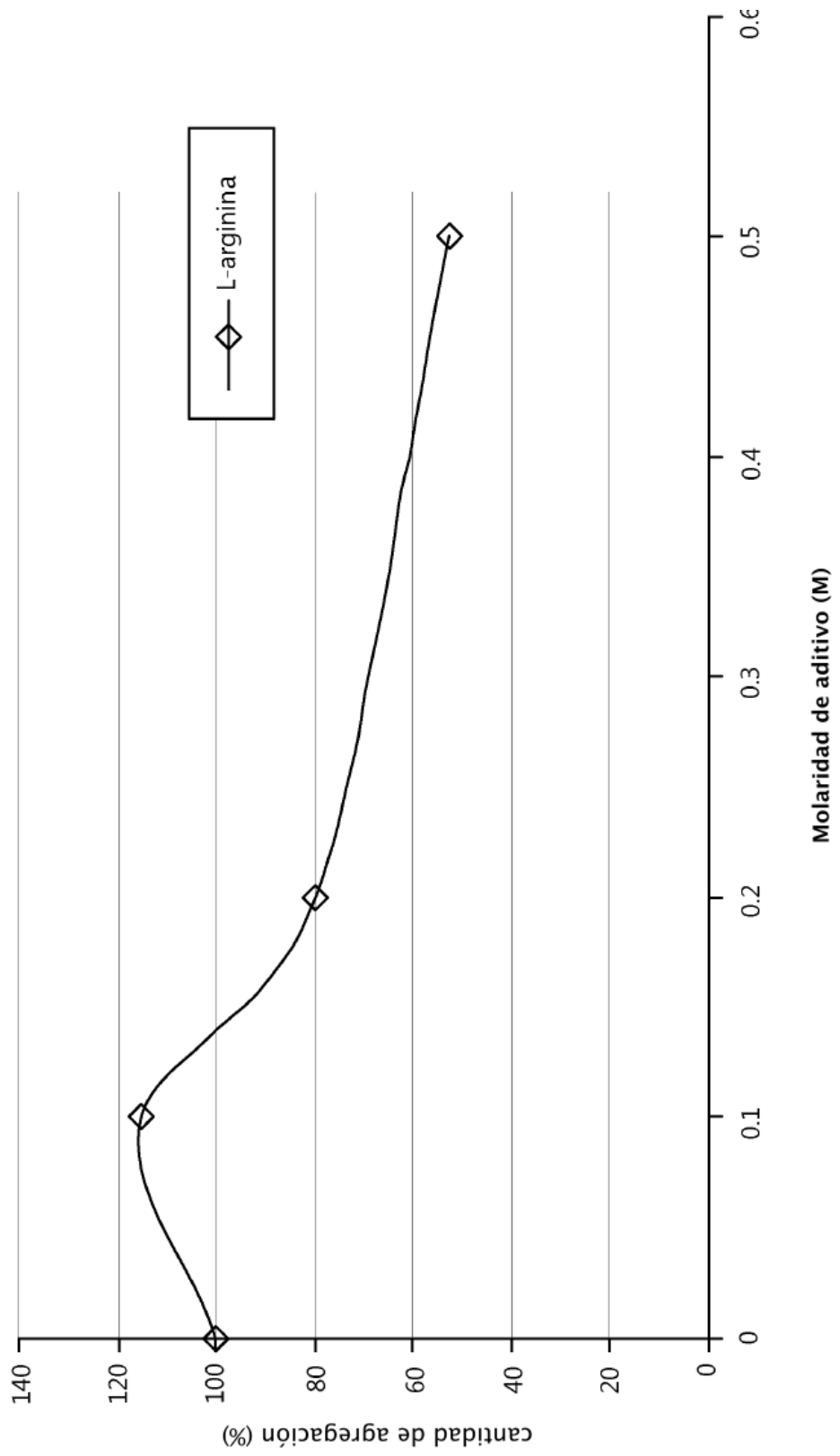


Fig. 2c

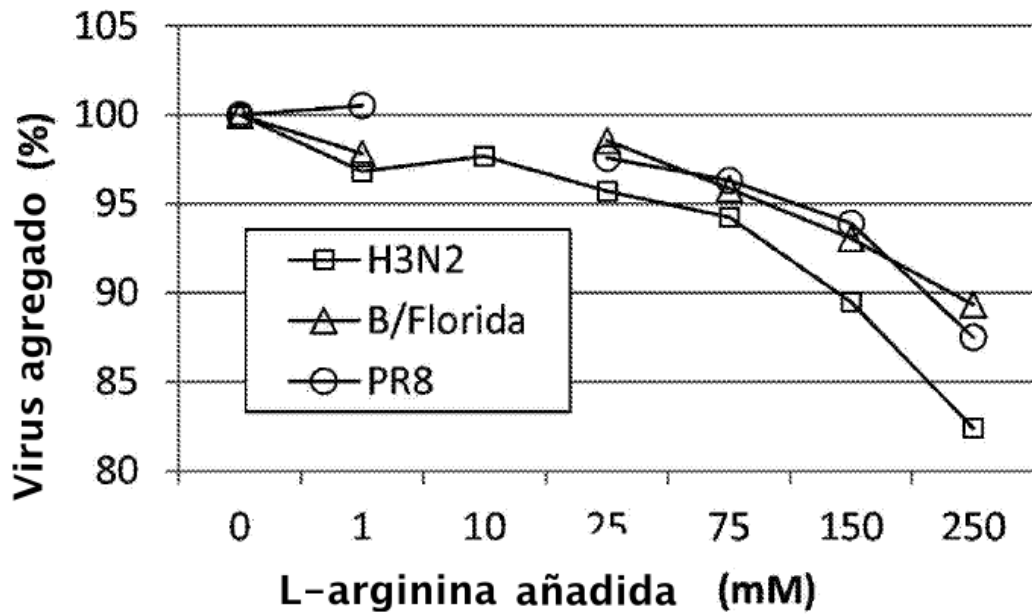


Fig. 2d

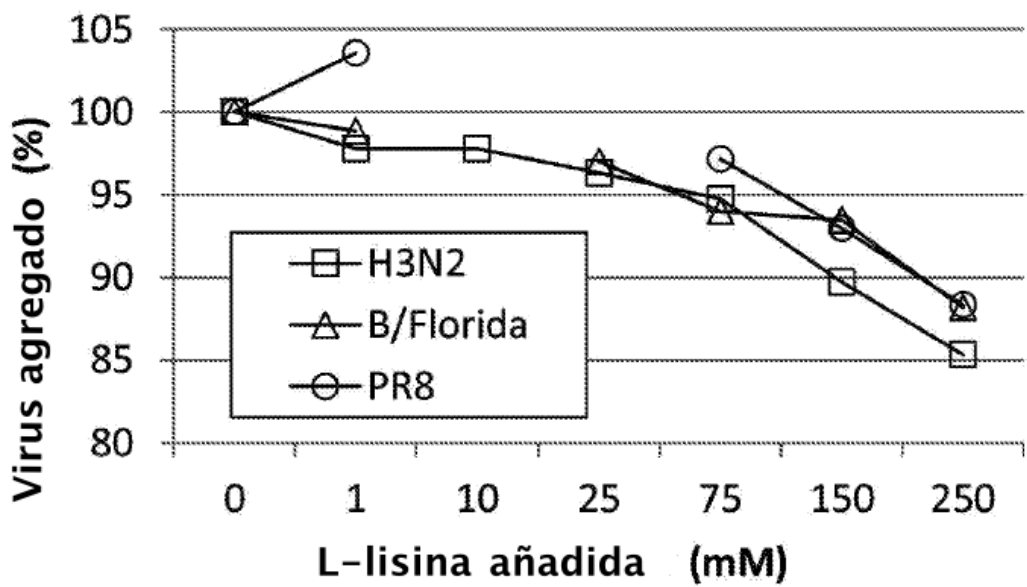


Fig. 2e

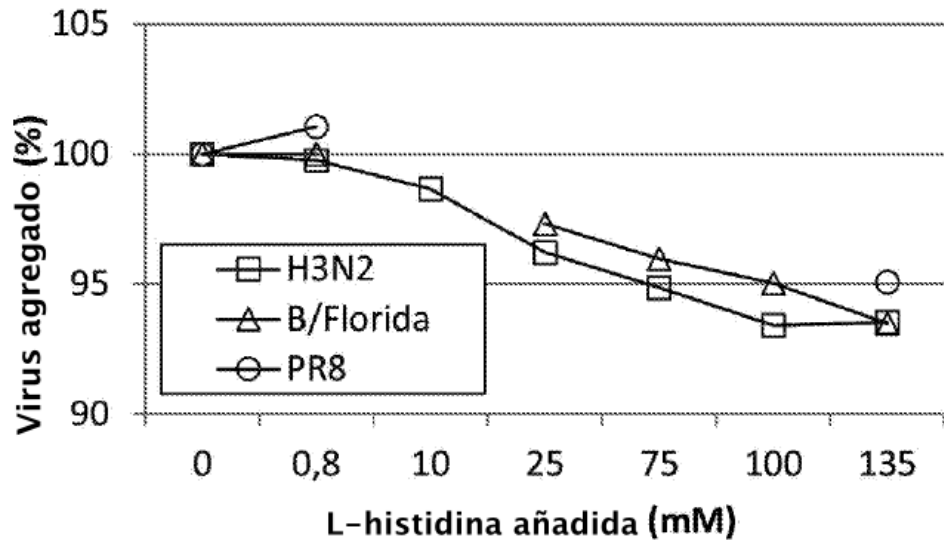


Fig. 2f

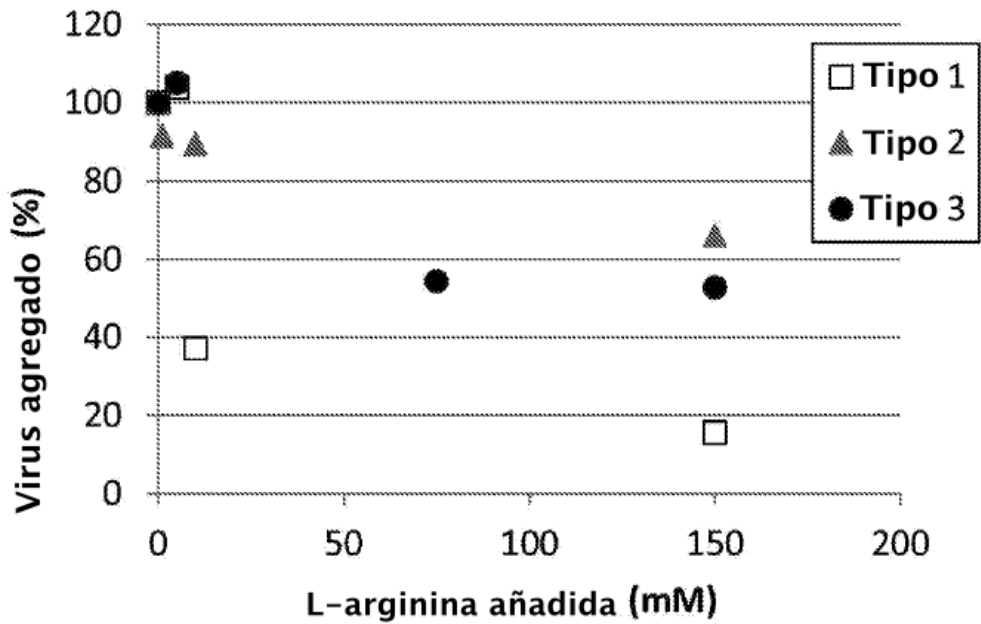


Fig. 2g

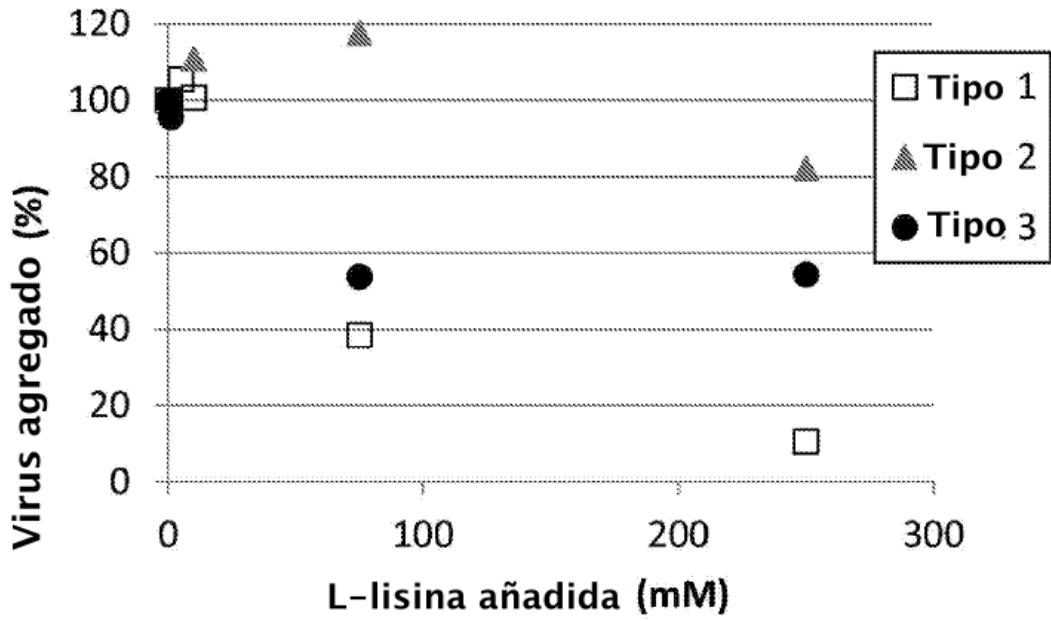


Fig. 2h

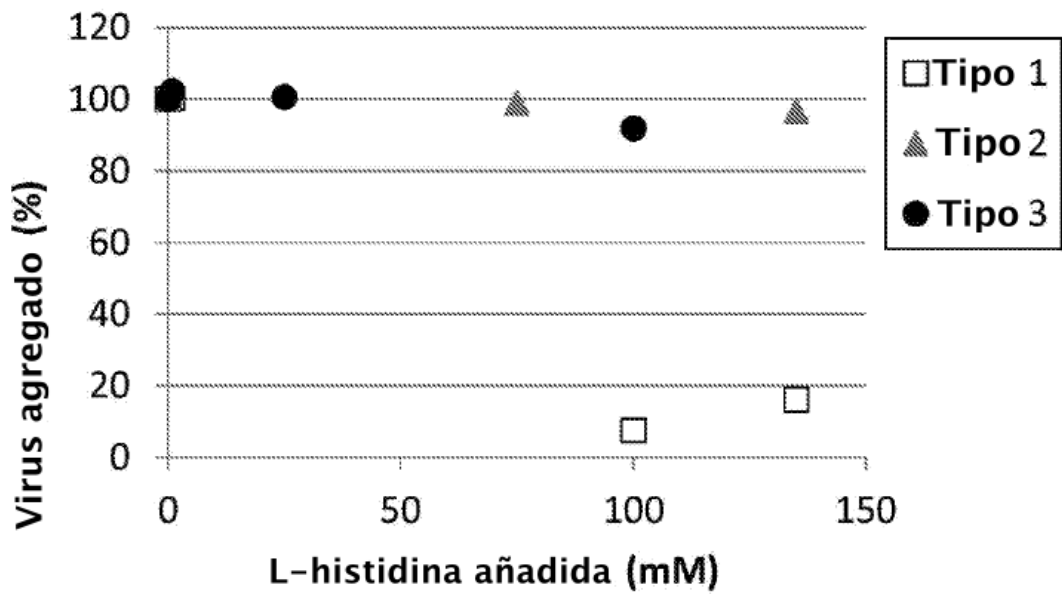


Fig. 3a

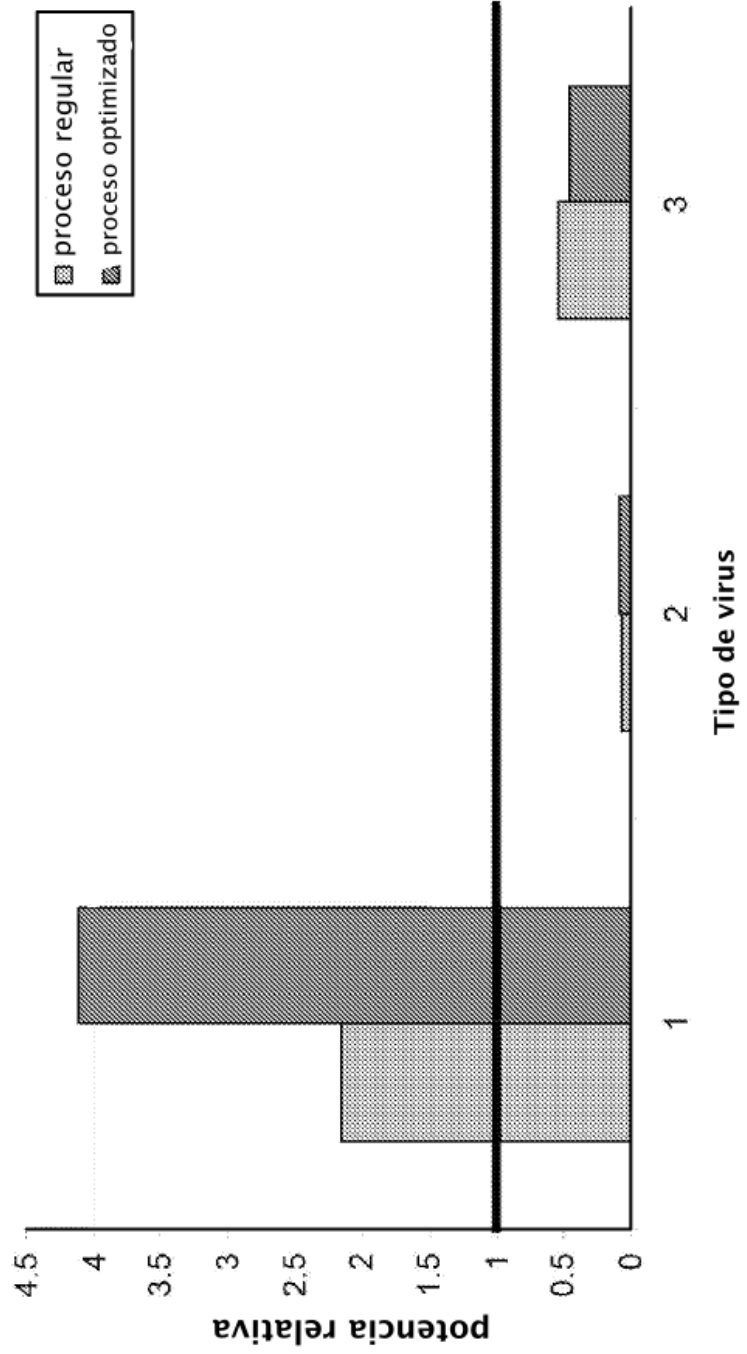


Fig. 3b

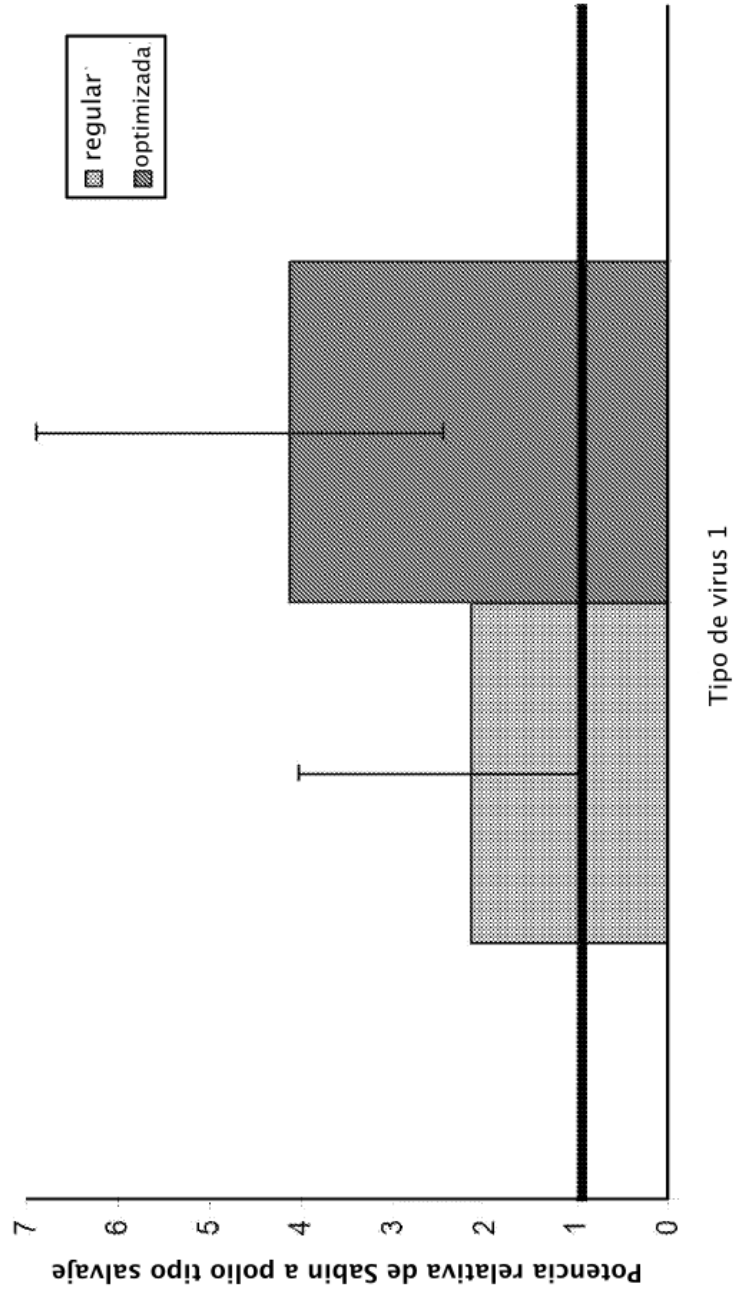


Fig. 3c

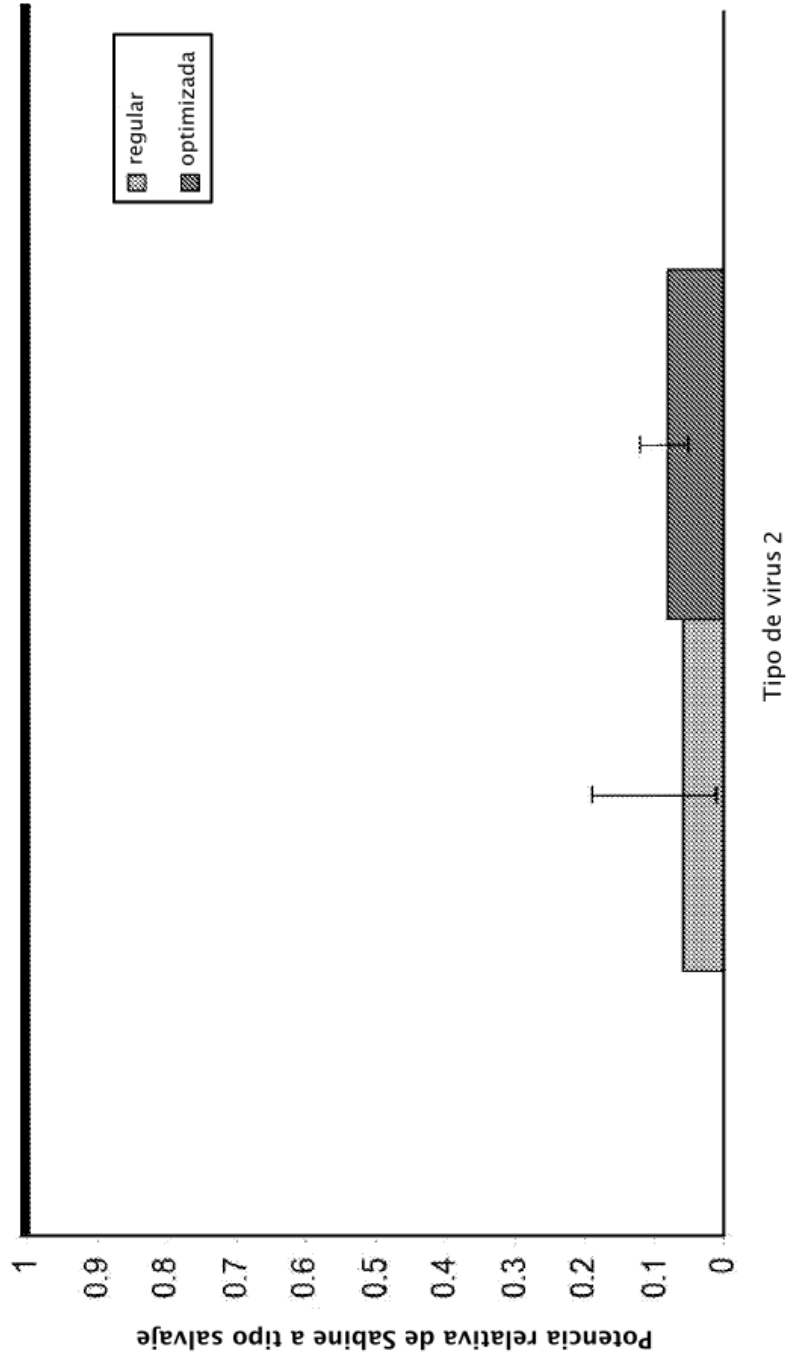


Fig. 3d

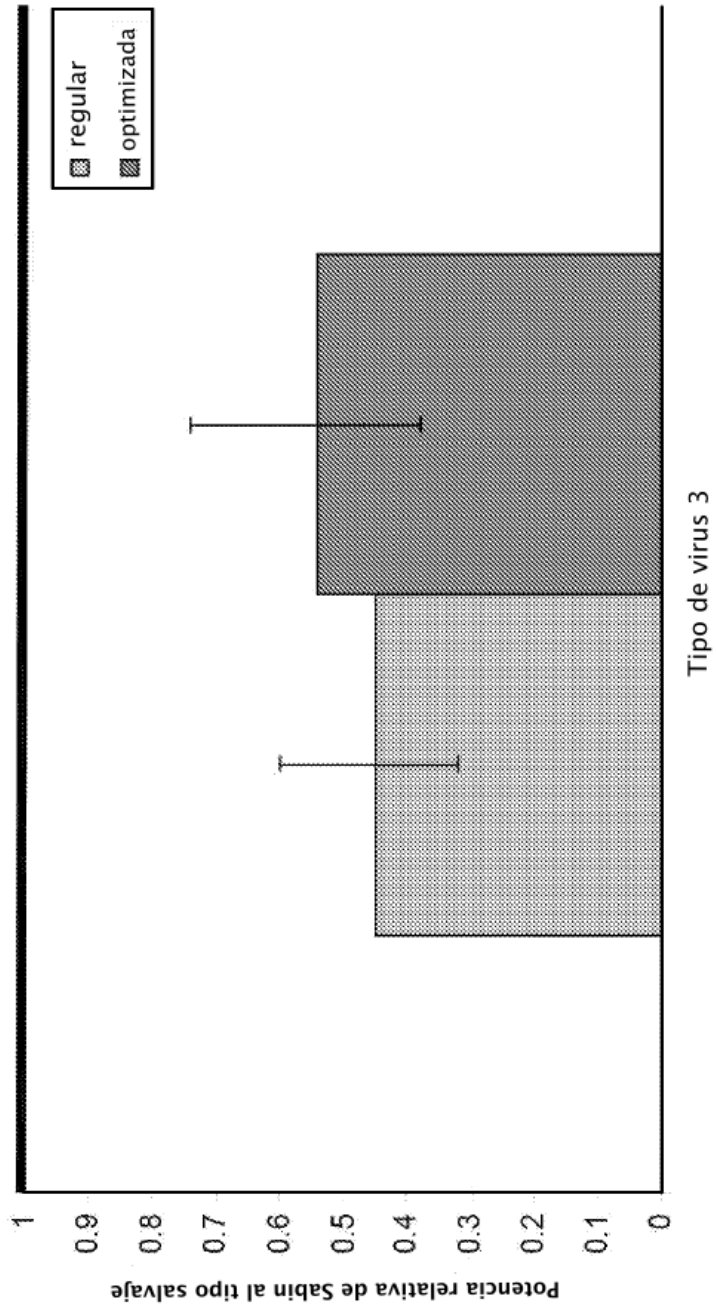


Fig. 4

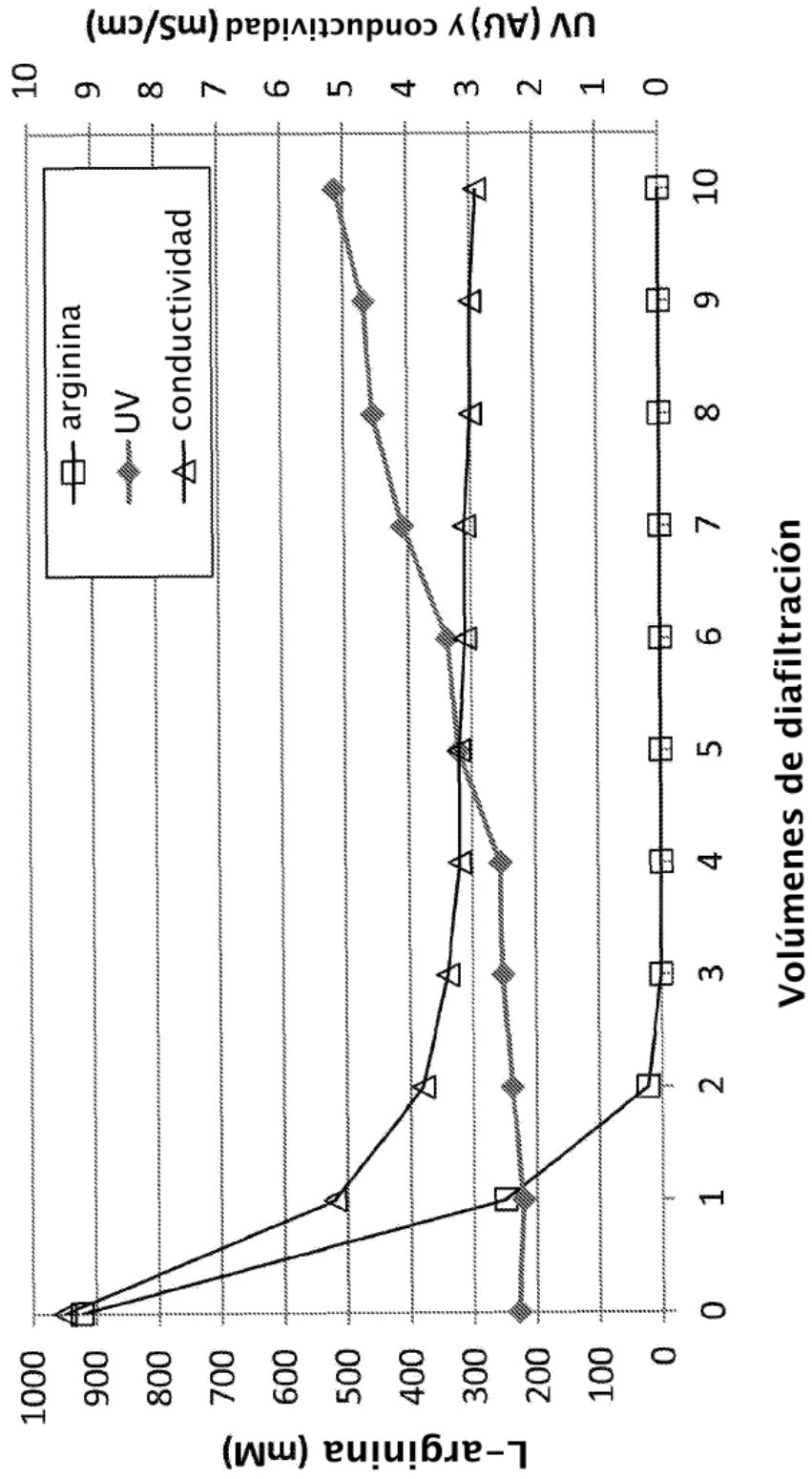


Fig. 5

