

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 664**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**G01N 33/576** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2016 E 16179299 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3121268**

54 Título: **Procedimientos de purificación de un virus producido in vitro y ensayo de eliminación del virus**

30 Prioridad:

**23.07.2015 US 201562196004 P**

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

**14.05.2019**

73 Titular/es:

**GRIFOLS, S.A. (100.0%)  
C/Jesús y María, 6  
08022 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BUNO, BRETT;  
JOURNIGAN, TERRI;  
HOTTA, JOANN y  
BURDICK, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**ES 2 712 664 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**

Procedimientos de purificación de un virus producido *in vitro* y ensayo de eliminación del virus

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**Sector de la invención

10 La presente invención se refiere al campo de la virología, de manera más precisa a procedimientos de purificación de virus no envueltos o pseudoenvueltos, tales como el virus de la hepatitis E (VHE) el virus de la hepatitis A (VHA) y el parvovirus porcino (PVP) propagado en un cultivo celular y para utilizar en estudios de eliminación de virus.

Descripción de la técnica relacionada

15 El uso clínico de todos los productos derivados de la sangre y el plasma conlleva el riesgo potencial de transmisión de patógenos infecciosos transmitidos por la sangre. La mitigación del riesgo se puede lograr mediante la aplicación de etapas de reducción de patógenos en los procedimientos de fabricación de productos derivados de la sangre y el plasma. Para desarrollar y demostrar la eficacia de las etapas de reducción de patógenos, se realizan estudios de eliminación de virus. Durante estos estudios, una cantidad conocida de virus es añadida a un producto intermedio de  
20 sangre o plasma y, a continuación, la muestra a la que se le ha añadido el virus se procesa utilizando un modelo a escala de laboratorio (un modelo a escala reducida) del procedimiento de fabricación que comprende una etapa de reducción de patógenos. La reducción y/o eliminación de virus durante una etapa de reducción de patógenos se determina comparando la cantidad de virus antes y después de la etapa.

25 Para asegurar la validez de los datos de eliminación de virus, el modelo a escala reducida debe representar con precisión una operación unitaria a gran escala y el concentrado de virus debe ser representativo de un potencial contaminante. Por ejemplo, el cultivo de un concentrado de virus *in vitro* puede requerir suero y la presencia de suero en el concentrado de virus podría afectar los estudios de eliminación que implican productos intermedios libres de suero. La presencia de contaminantes no virales, tales como membranas de células huésped, proteínas y ácidos  
30 nucleicos extraños, también podrían interferir en la evaluación precisa de la eliminación del virus durante una etapa aguas abajo, en la que los productos intermedios están presumiblemente altamente purificados. Por lo tanto, es importante eliminar los contaminantes del concentrado de virus que podrían afectar el rendimiento y la relevancia de los modelos a escala reducida.

**35 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN**

La presente invención comprende un procedimiento de purificación de un virus no envuelto o pseudoenvuelto propagado en un cultivo celular, basado en un procedimiento de tratamiento de una muestra que comprende el virus  
40 no envuelto o pseudoenvuelto con un detergente, en el que el detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus propagado en el cultivo celular es el virus de la Hepatitis A (VHA). En algunas realizaciones del procedimiento, el virus propagado en el cultivo celular es el parvovirus porcino (PVP). En algunas realizaciones preferentes del procedimiento, el virus propagado es el cultivo celular es el virus de la Hepatitis E (VHE). En algunas realizaciones del procedimiento, el virus se produce en un cultivo celular *in vitro*. En  
45 algunas realizaciones del procedimiento, el cultivo celular *in vitro* comprende una línea celular establecida. En algunas realizaciones del procedimiento, la línea celular establecida se selecciona de un grupo que comprende HepG2 (número ATCC HB-8065) y HepG2/C3A (número ATCC CRL-10741). En algunas realizaciones del procedimiento, la etapa de tratamiento se lleva a cabo durante 1 hora. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra es un sobrenadante obtenido a partir de ultracentrifugación de una suspensión clarificada de lisado  
50 celular infectado con virus. En algunas realizaciones del procedimiento, de manera opcional, la muestra es una fracción retenida derivada de la filtración de flujo tangencial ("trans-flow") de una suspensión clarificada de lisado celular infectado con virus.

Un procedimiento para medir el nivel de un virus no envuelto o un virus pseudoenvuelto en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) proporcionar la muestra a una mezcla que comprende una línea  
55 celular y un medio de cultivo; b) incubar para permitir la propagación del virus no envuelto o el virus pseudoenvuelto, si está presente en la muestra, para obtener una fracción incubada; c) tratar con al menos un detergente para obtener una fracción tratada; en el que el detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%; d) recoger una parte de la fracción tratada para  
60 obtener una fracción recogida; y e) medir el nivel del virus no envuelto o el virus pseudoenvuelto en la fracción recogida. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra se obtiene de un mamífero. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra comprende plasma o sangre. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus no envuelto o el virus pseudoenvuelto es el VHA. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus no envuelto o el virus pseudoenvuelto es el PVP. En algunas realizaciones preferentes del procedimiento, el  
65 virus no envuelto o pseudoenvuelto es el VHE. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus se propaga en

un cultivo celular *in vitro* que comprende una línea celular establecida. En algunas realizaciones del procedimiento, la línea celular se selecciona del grupo que consiste en HepG2 (número ATCC HB-8065) y HepG2/C3A (número ATCC CRL-10741). En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra comprende una primera fracción retenida obtenida mediante la filtración de flujo tangencial de una parte de la fracción incubada a través de una membrana. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra comprende, de manera opcional, un primer sobrenadante obtenido mediante la filtración de flujo tangencial de una parte de la fracción incubada a través de una membrana para obtener una primera fracción retenida y la centrifugación de la primera fracción retenida. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra se trata con al menos un detergente o, de manera opcional, una mezcla de detergentes seleccionados del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1% para obtener una primera solución, comprendiendo el procedimiento además: a) proporcionar un primer precipitado obtenido mediante la centrifugación de la primera solución; b) proporcionar una segunda solución obtenida mediante la resuspensión del primer precipitado en PBS (por sus siglas en inglés, Tampón Fosfato Salino); c) proporcionar una tercera solución obtenida mediante la clarificación de la segunda solución; d) proporcionar un primer filtrado obtenido mediante la filtración de la tercera solución utilizando una membrana; y e) proporcionar una segunda fracción retenida obtenida mediante la ultrafiltración del primer filtrado, en el que la segunda fracción retenida comprende la fracción tratada. En algunas realizaciones del procedimiento, la medición del nivel de virus no envuelto o pseudoenvuelto comprende detectar una sustancia biológica, en el que la sustancia biológica comprende una secuencia de polinucleótido y/o una secuencia de polipéptido de un virus, y en el que la sustancia biológica es un ácido ribonucleico del VHE. En algunas realizaciones del procedimiento, la medición de la sustancia biológica comprende: a) proporcionar una primera mezcla de reacción que comprende el ácido ribonucleico del VHE obtenido mediante la mezcla de una parte de la fracción tratada con una solución de lisis; b) proporcionar una segunda mezcla de reacción obtenida mediante la adición de un primer reactivo a la primera mezcla de reacción, en el que la segunda mezcla de reacción comprende un ácido desoxirribonucleico que es complementario al ácido ribonucleico del VHE; c) añadir, a la segunda mezcla de reacción, un segundo reactivo que es, como mínimo, parcialmente complementario a una secuencia dentro del ácido desoxirribonucleico; d) añadir, a la segunda mezcla de reacción, un tercer reactivo que es, como mínimo, parcialmente complementario a una secuencia dentro del ácido desoxirribonucleico; e) amplificar la secuencia comprendida por el segundo y el tercer reactivos dentro del ácido desoxirribonucleico; y f) medir la concentración de la secuencia amplificada. En algunas realizaciones del procedimiento, el segundo reactivo y el tercer reactivo comprenden una secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) 5'-CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID NO:1);
- b) 5'-CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO:2) y
- c) 5'-FAM-TTTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO:3).

En algunas realizaciones, la presente invención comprende un procedimiento de purificación de un virus no envuelto o pseudoenvuelto propagado en un cultivo celular, basado en un procedimiento de tratamiento de una muestra que comprende el virus no envuelto o pseudoenvuelto con un detergente o una mezcla de detergentes seleccionados del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%, lo que permite obtener un virus cuyo comportamiento en los estudios de eliminación es presumiblemente el mismo o casi el mismo que los que potencialmente podrían estar presente en las corrientes de procedimiento altamente purificadas. En algunas realizaciones, el virus generado mediante algunas realizaciones del procedimiento descrito anteriormente sería un añadido adecuado para probar la capacidad de reducción y/o eliminación del virus de las etapas aguas abajo en los procedimientos de fabricación de proteínas derivadas de la sangre y/o el plasma.

En algunas realizaciones, el procedimiento de purificación de un virus producido en un cultivo celular, basado en un procedimiento de tratamiento, comprende: clarificación de un material infectado por virus; filtración de flujo tangencial, como mínimo, de parte de la mezcla a través de una membrana para obtener una primera fracción retenida; y centrifugar la primera fracción retenida para obtener un primer sobrenadante. El procedimiento de tratamiento comprende: tratar el primer sobrenadante con al menos un detergente para obtener una primera solución; en el que el procedimiento comprende además: después de dicho tratamiento, centrifugar la primera solución para obtener un primer precipitado; resuspender el primer precipitado para obtener una segunda solución; clarificar la segunda solución para obtener una tercera solución; filtrar la tercera solución utilizando una membrana para obtener un primer filtrado; y ultrafiltrar el primer filtrado para obtener una segunda fracción retenida que proporciona, como mínimo, parte de la fracción tratada a recoger; en el que dicho al menos un detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%; en el que dicho tratamiento del primer sobrenadante con dicho al menos un detergente se lleva a cabo durante 1 hora.

En algunas realizaciones, el procedimiento de purificación de un virus producido en un cultivo celular, basado en un procedimiento de tratamiento, comprende: clarificación del material infectado por virus; filtración de flujo tangencial, como mínimo, de parte de la mezcla a través de una membrana para obtener una primera fracción retenida. El procedimiento de tratamiento comprende: tratar la primera fracción retenida con al menos un detergente para obtener una primera solución; en el que el procedimiento comprende además: después de dicho tratamiento, centrifugar la primera solución para obtener un primer precipitado; resuspender el primer precipitado para obtener una segunda solución; clarificar la segunda solución para obtener una tercera solución; filtrar la tercera solución

utilizando una membrana para obtener un primer filtrado; y ultrafiltrar el primer filtrado para obtener una segunda fracción retenida que proporciona, como mínimo, parte de la fracción tratada a recoger; en el que dicho al menos un detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%; en el que dicho tratamiento de la primera fracción retenida con dicho al menos un detergente se lleva a cabo durante 1 hora.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra la preparación de los concentrados de virus VHE por filtración de flujo tangencial (VHE por TFF) y VHE sobrenadante (Supe) por TFF según algunas realizaciones descritas en el presente documento.

La **figura 2** muestra la pureza relativa de los concentrados de VHE por TFF y VHE Supe por TFF que se prepararon según algunas realizaciones descritas en el presente documento.

La **figura 3** muestra la preparación de los concentrados de virus VHE por TFF, VHE por TFF con Tritón y VHE por TFF con Tritón/LDS según algunas realizaciones descritas en el presente documento.

La **figura 4** muestra la secuencia de nucleótidos de cebadores y sondas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los sistemas de cultivo celular eficaces para producir el virus no envuelto de VHE se han establecido recientemente y los datos indican que el VHE derivado de un cultivo celular VHE es similar al VHE que se encuentra en la sangre, en el hecho de que ambos están asociados con lípidos. Por lo tanto, se podrían utilizar lisados de cultivos celulares clarificados sin procesar o sobrenadantes de cultivos como concentrados de virus en estudios de eliminación relativos a etapas aguas arriba con intermedios de productos relativamente brutos. Sin embargo, la utilización de concentrados de virus sin procesar puede no ser apropiado para la evaluación de la eliminación del VHE durante las etapas aguas abajo, en las que las corrientes del procedimiento son de pureza relativamente elevada.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de concentrados de VHE de pureza relativamente elevada y título elevado que son adecuados para utilizar en estudios de purificación de virus para las etapas aguas debajo de un procedimiento de fabricación.

Debido a las dificultades en el cultivo del VHE *in vitro*, los ensayos de infectividad del VHE basadas en cultivos celulares no estaban fácilmente disponibles previamente. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la propagación de VHE de título elevado en un cultivo celular es posible mediante la utilización de medios suplementados con polibreno.

A pesar de que el VHE se considera técnicamente un virus no envuelto, el VHE propagado en cultivo celular a menudo comprende fragmentos lípidos de membrana, ya que se libera de las células. Estos componentes membranosos pueden proteger al virus de tratamientos viricidas, tales como el calentamiento en líquido o calentamiento en seco de tortas liofilizadas. El VHE se puede tratar con detergentes, tales como Tween, para eliminar los residuos membranosos, pero el virus tratado a menudo sigue siendo resistente a la inactivación por calentamiento.

En algunas realizaciones, los lípidos asociados con el VHE del cultivo celular se pueden eliminar mediante tratamiento con Tritón X-100 al 0,5%. En algunas realizaciones, los lípidos asociados con el VHE del cultivo celular se pueden eliminar mediante tratamiento con dodecil sulfato de litio (LDS, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, los lípidos asociados con el VHE del cultivo celular se pueden eliminar mediante tratamiento con una combinación de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio (LDS, por sus siglas en inglés) al 0,1%. En algunas realizaciones, la preparación de virus resultante es todavía infecciosa. En algunas realizaciones, las concentraciones de los contaminantes no víricos extraños se reducen en la preparación del virus. En algunas realizaciones, el virus también es más susceptible a la inactivación mediante tratamientos viricidas, tales como el calentamiento.

El VHE no produce efectos citopáticos (CPE) en el cultivo celular. Por lo tanto, la detección del VHE se basa en un ensayo de PCR (por sus siglas en inglés, Reacción en Cadena de la Polimerasa) desarrollado originalmente por el Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, el ensayo de PCR se modificó para aumentar la sensibilidad. En algunas realizaciones, se alteró uno de los cebadores utilizados en el ensayo de PCR. En algunas realizaciones, se alteró el cebador inverso utilizado en el ensayo de PCR. En algunas realizaciones, se rediseñó una sonda utilizada en el ensayo de PCR. Se diseñó una sonda totalmente nueva para el ensayo de PCR. En algunas realizaciones, el ensayo de PCR se utilizó para marcar muestras como positivas o negativas para la determinación de los títulos de virus.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento que implica: propagación de VHE de título elevado en un cultivo celular mediante la utilización de medios suplementados con polibreno; tratamiento de VHE de un cultivo celular con Tritón X-100/LDS para eliminar los lípidos/restos membranosos; y detección de VHE

mediante un ensayo de PCR sensible.

En algunas realizaciones, el procedimiento puede ser específico de VHE. En algunas realizaciones, los procedimientos para la propagación del virus y la purificación se pueden aplicar a otros virus no envueltos. En algunas realizaciones, los procedimientos para la propagación del virus y la purificación se pueden aplicar a otros virus pseudoenvueltos. En algunas realizaciones, los procedimientos para la propagación y purificación del virus se pueden aplicar al VHA. En algunas realizaciones, los procedimientos para la propagación y purificación del virus se pueden aplicar al PVP. En algunas realizaciones preferentes los procedimientos para la propagación y purificación del virus se pueden aplicar al VHE.

En algunas realizaciones, la presente invención se puede utilizar para llevar a cabo estudios para evaluar la capacidad de eliminación/inactivación del VHE de varias etapas de fabricación y de productos intermedios y finales. En algunas realizaciones, la presente invención se puede utilizar para llevar a cabo estudios para evaluar la capacidad de eliminación/ inactivación de varias etapas de fabricación y de productos intermedios y finales para otros virus. En algunas realizaciones, los otros virus son virus no envueltos. En algunas realizaciones, los otros virus son virus pseudoenvueltos. En algunas realizaciones, los otros virus son el VHA y el PVP.

En algunas realizaciones, la presente invención puede proporcionar una garantía de seguridad de diversos productos médicos o clínicos, tales como sangre y/o plasma, frente al VHE. En algunas realizaciones, la presente invención puede proporcionar una garantía de seguridad de diversos productos médicos o clínicos, tales como sangre y/o plasma frente a otros virus. En algunas realizaciones, los otros virus son el VHA y el PVP.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de virus no envueltos o pseudoenvueltos producidos *in vitro*. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación del VHE producido *in vitro*. En algunas realizaciones, la purificación comprende una etapa de tratamiento con detergente con una composición que comprende al menos un detergente aniónico y/o un detergente no iónico, en el que el detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%.

En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición que comprende uno o más detergentes se lleva a cabo durante una duración de tiempo según sea necesario y se determine por un experto en la materia. En algunas realizaciones, el tratamiento se lleva a cabo durante 5 minutos hasta 1 día. En algunas realizaciones preferentes, el tratamiento se lleva a cabo durante 10 minutos hasta 3 horas. En algunas realizaciones preferentes, el tratamiento se lleva a cabo durante 1 hora.

En la realización más preferente, se utiliza una composición que comprende Tritón X-100 al 0,5% y LDS al 0,1% y se lleva a cabo una etapa de tratamiento con la composición durante 1 hora. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo a 37°C durante 1 hora.

En algunas realizaciones, como material de partida para llevar a cabo un procedimiento de purificación de la presente invención, se utiliza un sobrenadante obtenido a partir de la ultracentrifugación de un medio de cultivo celular infectado por virus o una suspensión de lisado celular infectado por virus clarificado, ambos derivados de cultivos celulares infectados por virus. En una realización preferente, se utiliza el sobrenadante obtenido a partir de la ultracentrifugación de una suspensión de lisado celular infectado por virus clarificado.

En algunas realizaciones, como material de partida para llevar a cabo un procedimiento de purificación de la presente invención, se utiliza una fracción retenida obtenida después de la filtración de flujo tangencial de un medio de cultivo celular infectado por virus o una suspensión de lisado celular infectado por virus clarificado, ambos derivados de cultivos celulares infectados por virus. En una realización preferente, se utiliza la fracción retenida obtenida después de la filtración de flujo tangencial de una suspensión de lisado celular infectado por virus clarificado.

En una primera realización, el procedimiento de purificación puede comprender las siguientes etapas:

- a) clarificar el material de partida;
- b) filtrar por flujo tangencial la solución de la etapa a) a través de una membrana apropiada para obtener la fracción retenida correspondiente;
- c) ultracentrifugar la fracción retenida de la etapa b) para obtener el sobrenadante correspondiente;
- d) tratar dicho sobrenadante de la etapa c) con un detergente o una mezcla de detergentes para obtener la solución correspondiente;
- e) colocar la solución de la etapa d) sobre una almohadilla de sacarosa al 30% y llevar a cabo la ultracentrifugación a la velocidad y el tiempo apropiados para obtener el precipitado correspondiente;
- f) resuspender el precipitado de la etapa e) en el volumen apropiado de PBS para obtener la solución correspondiente;
- g) clarificar la solución de la etapa f) para obtener la solución correspondiente;
- h) ultrafiltrar la solución obtenida en la etapa g) utilizando una membrana apropiada para obtener la fracción

## ES 2 712 664 T3

retenida correspondiente; y  
i) filtrar la fracción retenida de la etapa h).

- 5 En una primera realización preferente, en la etapa a), el material de partida se clarifica a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- En una primera realización preferente, en la etapa b), la membrana utilizada para realizar la filtración de flujo tangencial es una membrana de 300 kDa.
- 10 En una primera realización preferente, en la etapa c), la ultracentrifugación se lleva a cabo a 85.000 xg durante 1,5 horas.
- En una primera realización preferente, en la etapa d), cuando se utiliza una mezcla de detergentes, la mezcla de detergentes comprende Tritón X-100 al 0,5% y LDS al 0,1%.
- 15 En una primera realización preferente, en la etapa e) la ultracentrifugación se lleva a cabo a 100.000 xg durante 8 horas.
- En una primera realización preferente, se contempla que, en la etapa f), el precipitado se resuspende en PBS.
- 20 En una primera realización preferente, en la etapa g), la solución de la etapa f) se clarifica a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ .
- En una primera realización preferente, en la etapa h), la membrana utilizada en la ultrafiltración es una membrana de 100 kDa.
- 25 En una primera realización preferente, en la etapa i), la filtración se realiza a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ .
- 30 En una segunda realización, un procedimiento de purificación puede comprender las siguientes etapas:
- a) clarificar el material de partida;
  - b) filtrar por flujo tangencial la solución de la etapa a) a través de una membrana apropiada para obtener la fracción retenida correspondiente;
  - 35 c) tratar dicha fracción retenida de la etapa b) con un detergente o una mezcla de detergentes para obtener la solución correspondiente;
  - d) ultracentrifugar la solución tratada con detergente a una velocidad y durante un tiempo apropiados para obtener el precipitado correspondiente;
  - 40 e) resuspender el precipitado de la etapa d) en el volumen apropiado de PBS para obtener la solución correspondiente;
  - f) clarificar la solución de la etapa e) para obtener la solución correspondiente;
  - g) ultrafiltrar la solución obtenida en la etapa f) utilizando una membrana apropiada para obtener la fracción retenida correspondiente; y
  - 45 h) filtrar la fracción retenida de la etapa g).
- En una segunda realización preferente, en la etapa a), el material de partida se clarifica a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 50 En una segunda realización preferente, en la etapa b), la membrana utilizada para realizar la filtración de flujo tangencial es una membrana de 300 kDa.
- En una segunda realización preferente, en la etapa c), cuando se utiliza una mezcla de detergentes, dicha mezcla de detergentes es Tritón X-100 al 0,5% y LDS al 0,1%.
- 55 En una segunda realización preferente, en la etapa d), la ultracentrifugación se lleva a cabo a 85.000 xg durante 1,5 horas.
- En una segunda realización preferente, en la etapa e), el precipitado se resuspende en PBS.
- 60 En una segunda realización preferente, en la etapa f), la solución de la etapa e) se clarifica a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ .
- En una segunda realización preferente, en la etapa g), la membrana utilizada en la ultrafiltración es una membrana de 100 kDa.
- 65

En una segunda realización preferente, en la etapa h), la filtración se realiza a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 µm.

5 La presente invención se refiere a la utilización de LDS y/o Tritón X-100 en un procedimiento para la purificación de un virus no envuelto o pseudoenvuelto producido *in vitro*. En algunas realizaciones, el virus es no envuelto. En algunas realizaciones, el virus es pseudoenvuelto.

10 En una realización preferente, el virus producido *in vitro* es el VHE. En algunas realizaciones, el virus producido *in vitro* puede ser un virus distinto del VHE. En algunas realizaciones, el virus producido *in vitro* es el VHA. En algunas realizaciones, el virus producido *in vitro* es el PVP. En la realización más preferente, el virus producido *in vitro* es el virus de la hepatitis E.

15 En algunas realizaciones, la producción *in vitro* descrita anteriormente se lleva a cabo en un cultivo *in vitro*. En algunas realizaciones, el cultivo *in vitro* es un cultivo de órganos, tejidos o células *in vitro*. En una realización preferente, la producción *in vitro* se lleva a cabo en un cultivo de células *in vitro*.

20 En algunas realizaciones, se utiliza un cultivo celular primario. En algunas realizaciones, se utiliza una línea de cultivo celular. Las células primarias y las líneas de cultivo celular pueden derivar de cualquier organismo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla la utilización de células de insecto. En algunas realizaciones, se contempla la utilización de células de mamífero. En una realización preferente, se utiliza una línea de cultivo celular humana.

25 En una realización preferente, se utiliza una línea celular de hígado para la producción y purificación del VHE. En otra realización preferente, se utiliza una línea celular de riñón para la producción y purificación de VHE. En algunas realizaciones, la línea celular de hígado puede derivar de un hígado sano o enfermo. En algunas realizaciones, la línea celular de hígado puede ser una línea de células malignas o benignas. En algunas realizaciones, la línea celular de riñón puede derivar de un riñón sano o enfermo. En algunas realizaciones, la línea celular de riñón puede ser una línea de células malignas o benignas. En una realización preferente, se utiliza una línea celular establecida. En algunas realizaciones, la célula es HepG2 (número ATCC HB-8065). En algunas realizaciones, la célula es HepG2/C3A (número ATCC CRL-10741).

30 En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de infectividad del VHE. En algunas realizaciones, se pueden preparar concentrado del virus con títulos de infectividad de ~ 8 log<sub>10</sub>. El ensayo tiene una duración relativamente corta (ensayo de 3-7 días). Se observó poco o ningún ruido de fondo de la PCR y se puede demostrar una reducción de más de 4 log<sub>10</sub>. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de detección del virus basado en PCR. En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de detección del VHE basado en PCR.

#### Realizaciones preferentes adicionales - 1

40 En algunas realizaciones, un procedimiento de preparación de un virus no envuelto o pseudoenvuelto propagado en un cultivo celular comprende: una etapa de tratamiento de una muestra que comprende el virus no envuelto o pseudoenvuelto con una composición que comprende uno o más detergentes seleccionados del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%.

45 En algunas realizaciones del procedimiento, el virus propagado en el cultivo celular es el VHA. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus propagado en el cultivo celular es el PVP. En algunas realizaciones preferentes del procedimiento, el virus propagado en el cultivo celular es el VHE. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus se produce en un cultivo celular *in vitro*. En algunas realizaciones del procedimiento, el cultivo celular *in vitro* comprende una línea celular establecida. En algunas realizaciones del procedimiento, la línea celular establecida se selecciona de un grupo que consiste en HepG2 (número ATCC HB-8065) y HepG2/C3A (número ATCC CRL-10741). En algunas realizaciones del procedimiento, el tratamiento con detergente es con dodecil sulfato de litio y/o Tritón X-100. En algunas realizaciones del procedimiento, la concentración de Tritón X-100 es del 0,5% y la concentración de LDS es del 0,1%. En algunas realizaciones del procedimiento, la etapa de tratamiento se lleva a cabo durante 1 hora. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra es un sobrenadante obtenido a partir de la ultracentrifugación de una suspensión de lisado celular infectado con virus clarificado. En algunas realizaciones del procedimiento, de manera opcional, la muestra es una fracción retenida derivada de la filtración de flujo tangencial de una suspensión de lisado celular infectado con virus clarificado.

#### Realizaciones preferentes adicionales - 2

60 En algunas realizaciones, un procedimiento para medir el nivel de un virus no envuelto o pseudoenvuelto en una muestra comprende las etapas de:

- 65 a) proporcionar la muestra a una mezcla que comprende una célula y un medio de cultivo;  
b) incubar para permitir la propagación del virus no envuelto o el virus pseudoenvuelto, si está presente en la muestra, para obtener una fracción incubada;

## ES 2 712 664 T3

c) tratar con al menos un detergente para obtener una fracción tratada; en el que el detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%

d) recoger una parte de la fracción tratada para obtener una fracción recogida; y

5 e) medir el nivel del virus no envuelto o el virus pseudoenvuelto en la fracción recogida.

En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra se obtiene de un mamífero. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra comprende plasma o sangre. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus no envuelto o pseudoenvuelto es el VHA. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus no envuelto o pseudoenvuelto es el PVP. En algunas realizaciones preferentes del procedimiento, el virus no envuelto o pseudoenvuelto es el VHE. En algunas realizaciones del procedimiento, el virus se produce en un cultivo celular. En algunas realizaciones del procedimiento, la célula se selecciona del grupo que consiste en HepG2 (número ATCC HB-8065) y HepG2/C3A (número ATCC CRL-10741). En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra comprende una primera fracción retenida obtenida mediante la filtración de flujo tangencial de una parte de la fracción incubada a través de una membrana. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra comprende, de manera opcional, un primer sobrenadante obtenido mediante la filtración de flujo tangencial de una parte de la fracción incubada a través de una membrana para obtener una primera fracción retenida y la centrifugación de la primera fracción retenida. En algunas realizaciones del procedimiento, la muestra se trata con al menos el primer detergente o, de manera opcional, una mezcla de detergentes seleccionados del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1% para obtener una primera solución. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además:

a) proporcionar un primer precipitado obtenido mediante la centrifugación de la primera solución;

b) proporcionar una segunda solución obtenida mediante la resuspensión del primer precipitado en PBS;

c) proporcionar una tercera solución obtenida mediante la clarificación de la segunda solución;

d) proporcionar un primer filtrado obtenido mediante la filtración de la tercera solución utilizando una membrana; y

e) proporcionar una segunda fracción retenida obtenida mediante la ultrafiltración del primer filtrado, en el que la segunda fracción retenida comprende la fracción tratada.

En algunas realizaciones del procedimiento, la medición del nivel de virus no envuelto o pseudoenvuelto comprende detectar una sustancia biológica. En algunas realizaciones del procedimiento, la sustancia biológica comprende una secuencia de polinucleótido y/o una secuencia de polipéptido de un virus. En algunas realizaciones del procedimiento, la sustancia biológica es un ácido ribonucleico del VHE. En algunas realizaciones del procedimiento, la medición de la sustancia biológica comprende:

a) proporcionar una primera mezcla de reacción que comprende el ácido ribonucleico viral obtenido mediante la mezcla de una parte de la fracción tratada con una solución de lisis;

b) proporcionar una segunda mezcla de reacción obtenida mediante la adición de un primer reactivo a la primera mezcla de reacción, en el que la segunda mezcla de reacción comprende un ácido desoxirribonucleico que es complementario al ARN viral;

c) añadir, a la segunda mezcla de reacción, un segundo reactivo que es complementario a una secuencia dentro del ácido desoxirribonucleico;

d) añadir, a la segunda mezcla de reacción, un tercer reactivo que es complementario a una secuencia dentro del ácido desoxirribonucleico;

e) amplificar la secuencia comprendida por el segundo y el tercer reactivos dentro del ácido desoxirribonucleico; y

f) medir la concentración de la secuencia amplificada.

En algunas realizaciones del procedimiento, el segundo reactivo y el tercer reactivo comprenden una secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) 5'-CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID NO:1);

b) 5'-CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO:2) y

c) 5'-FAM-TTTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO:3).

### Realizaciones preferentes adicionales - 3

En algunas realizaciones, para la clarificación del virus, se utiliza un concentrado de virus en crudo congelado. En algunas realizaciones, cuando se prepara un concentrado de virus no envuelto concentrado y purificado, se añaden Tritón X-100 al 0,5% y LDS al 0,1% al concentrado de virus en crudo descongelado y se incuban a 37°C durante 1 hora.

En algunas realizaciones, la clarificación del concentrado de virus en crudo descongelado se lleva a cabo mediante centrifugación a una velocidad de 3.000 a 8.000 xg durante 15 a 30 minutos a entre 2°C y 8°C. En algunas realizaciones, se retira y conserva el sobrenadante y el precipitado se descarta. En algunas realizaciones, el



sobrenadante se filtra a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , antes de la filtración de flujo tangencial a través de una membrana de 300 kDa y se recoge una fracción retenida TFF.

5 En algunas realizaciones, para la ultracentrifugación, la fracción retenida TFF se ultracentrifuga en tubos de ultracentrifuga en un robot basculante a entre 2°C y 8°C durante 1,5 horas a aproximadamente 85.000 xg. En algunas realizaciones, el sobrenadante de la ultracongelación se decanta y descarta como deshecho líquido.

10 En algunas realizaciones, para la ultracongelación, el precipitado de la ultracongelación se resuspende en no menos de 5 ml de tampón, tal como PBS. En algunas realizaciones, la suspensión de precipitado se clarifica a entre 3.000 y 4.200 xg durante 15 minutos a entre 2°C y 8°C. En algunas realizaciones, el sobrenadante se retira y coloca en el dispositivo de Filtrado Amicon® UF para concentrar. En algunas realizaciones, si es necesario, se añade tampón, tal como PBS, para llevar el volumen final a aproximadamente 15 ml (la capacidad del filtro es de 15 ml).

15 En algunas realizaciones, el dispositivo de filtrado se centrifuga a aproximadamente 5.000 xg a entre 2°C y 8°C hasta que el volumen final de la muestra retenida (concentrado de virus concentrado y purificado) no es superior a 1 ml. En algunas realizaciones, el tiempo aproximado de centrifugación es de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 minutos.

20 En algunas realizaciones, el concentrado de virus concentrado y purificado se alícuota y se congela a no más de -65°C.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. Preparación de concentrados de VHE por TFF.

25 La filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) es un procedimiento bien conocido para la separación y concentración de biomoléculas. Existe información adicional relativa a TFF fácilmente disponible, por ejemplo, en "Introduction to Tangential Flow Filtration for Laboratory and Process Development Applications" ("Introducción a la filtración de flujo tangencial para laboratorio y aplicaciones en el desarrollo de procedimientos"), de Larry Schwartz y otros ([pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=34212](http://pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=34212)).

30 Se congelaron y descongelaron dos veces células HepG2 o HepG2/C3A infectadas con VHE y se clarificaron mediante centrifugación a baja velocidad y el paso a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . La solución clarificada (~ 1 l) se concentró diez veces mediante TFF a través de dos membranas de 300 kDa y la fracción retenida por TFF resultante (~ 100 ml) se centrifugó a aproximadamente 85.000xg, 90 minutos, 4°C para precipitar el virus. Se recogió el sobrenadante de la ultracentrifuga (~ 100 ml) y se guardó para el procesamiento Supe TFF del VHE (ejemplo 2), mientras que el precipitado se resuspendió en PBS. A continuación, el precipitado resuspendido se filtró a través de un filtro con un poro de 0,2  $\mu\text{m}$  y se ultrafiltró a través de una membrana de 100 kDa hasta un volumen final de aproximadamente 2 ml. La solución se esterilizó por filtración a través de filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,1  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 5°C hasta su utilización como preparación de concentrado de VHE por TFF.

### Ejemplo 2. Preparación de concentrados de VHE de sobrenadante TFF (VHE de Supe TFF).

45 Los lípidos asociados con los VHE derivados de cultivo celular aumentan la flotación del virus y, de este modo, disminuyen la eficacia de la precipitación del virus mediante ultracentrifugación. De este modo, en algunas realizaciones de la presente invención, se añade una mezcla de detergentes que comprende Tritón X-100 y dodecil sulfato de litio (LDS, por sus siglas en inglés) a fluidos que comprenden VHE para eliminar los lípidos asociados y para aumentar la recuperación de los virus.

50 Se trataron aproximadamente 100 ml del sobrenadante de la ultracentrifuga, que resultó de la TFF y la ultracentrifugación de los lisados celulares infectados con VHE clarificados (~ 1 l) del ejemplo 1, con Tritón X-100 al 0,5% y LDS al 0,1% durante no menos de 30 minutos, 37°C, antes de la ultracentrifugación a través de una almohadilla de sacarosa al 30% a 100.000xg, durante 8 horas, 5°C. El precipitado resultante se resuspendió en PBS, se filtró a través de un filtro con un poro de 0,2  $\mu\text{m}$  y se ultrafiltró a través de una membrana de 100 kDa hasta un volumen final de aproximadamente 1 ml. La solución se pasó entonces a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,1  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 5°C hasta su utilización como preparación de concentrado de VHE de Supe TFF.

### Ejemplo 3. Comparación de la pureza de los concentrados de virus generados según los procedimientos de los ejemplos 1 y 2.

60 Se utilizó SDS-PAGE para comparar la pureza relativa de los concentrados de virus generados según los procedimientos de los ejemplos 1 y 2. Tal como se muestra en la figura 2, se extrajeron alícuotas de las siguientes muestras para A280 y PCR cuantitativa: VHE inicial en crudo, fracción retenida por TFF, sobrenadante de la ultracentrifuga, VHE por TFF y VHE de Supe TFF. La fracción retenida por TFF y el sobrenadante de la ultracentrifuga tenían 10 veces más proteína, medida mediante A280, que VHE inicial en crudo y VHE por TFF, y 40

veces más que VHE de Supe TFF (figura 2). Aunque las concentraciones de proteína eran diferentes, las concentraciones de ARN de VHE en todas las muestras, excepto VHE inicial en crudo, eran aproximadamente 9 log<sub>10</sub> copias/ml (figura 2). De este modo, la pureza relativa, indicada por la relación de virus (ARN de VHE) con respecto a proteína (A280) fue mucho mayor en VHE de Supe TFF y VHE por TFF que en el sobrenadante de la ultracentrífuga y la fracción retenida por TFF.

La pureza relativa de las muestras pudo visualizarse mediante SDS-PAGE (figura 2). Las muestras se diluyeron o concentraron hasta aproximadamente 4 UA antes del calentamiento en tampón de muestra que contenía DTT y la carga en geles con un gradiente del 4-20%. También se cargaron medios de cultivo celular como control de fondo. Después del SDS-PAGE, se extrajeron los geles y se tiñeron con Instant Blue. Los resultados fueron consistentes con los datos de A280 y de la PCR, mostrando los niveles de impurezas más altos en la fracción retenida por TFF y el sobrenadante de la ultracentrífuga. La proteína más abundante presentó una banda a aproximadamente 70 kDa. Dado que también estaba presente en los medios de cultivo celular, era probablemente una proteína que se encuentra en el suero bovino fetal, un complemento del medio necesario para la propagación celular y del virus y un contaminante no viral que podría interferir en los estudios de purificación aguas abajo. La mayor parte del contaminante se eliminó durante el procedimiento de purificación descrito en los ejemplos 1 y 2 y sus concentraciones relativas eran las más bajas en VHE de Supe TFF, seguido por VHE por TFF.

Ejemplo 4. Comparación de la estabilidad térmica de los concentrados de virus generados según los procedimientos de los ejemplos 1 y 2.

Se realizaron experimentos para comparar la estabilidad térmica de los concentrados de VHE por TFF y VHE de Supe TFF que habían sido preparadas según los ejemplos 1 ó 2. Ambas preparaciones de virus se añadieron en PBS y se incubaron durante 4 horas a 5°C, 60°C, 70°C u 80°C. Se extrajeron alícuotas de cada solución de prueba y se titularon de la siguiente manera. Se realizaron diluciones en serie de una muestra y se añadieron a pocillos sembrados con células HepG2 o HepG2/C3A. Los virus se dejaron adsorber durante no menos de 1 hora a 37°C y se añadió medio de crecimiento. Las placas se incubaron a 37°C durante no menos de 2 días antes de aspirar el medio de los pocillos y de lavar/aspirar las células no menos de 2 veces con tampón (por ejemplo, PBS). Las placas se extrajeron a continuación para el ARN viral, utilizando el microkit de Dynabeads® mRNA Direct® (Life Technologies), o se almacenaron a no más de -65°C hasta la extracción. Después de la extracción, las fracciones eluidas (poli A ARN) se procesaron inmediatamente para la amplificación por PCR o se almacenaron a no más de -65°C hasta la amplificación por PCR.

Se utilizó una RT-PCR de una etapa para detectar el ARN del VHE en las muestras, utilizando los siguientes cebadores y sondas tal como se han descrito anteriormente. Las condiciones del ensayo para cada reacción fueron las siguientes:

- a) Reactivos: 5.0 µl 4x mezcla maestra TaqMan® Fast Virus 1-Step (Life Technologies), 0,08 µl de cebadores F + R (por sus siglas en inglés, directo + inverso) 100 mM, 0,04 µl de sonda 100 mM, 0,4 µl de SUPERase In (Life Technologies), 4,4 µl de agua y 10 µl de plantilla (en total 20 µl)
- b) Reacción: 52°C durante 10 minutos, 95°C durante 30 segundos y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 45 segundos

Las determinaciones de los valores de la PCR y de los umbrales de ciclo (Ct) se realizaron utilizando un sistema PCR a tiempo real AB 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y con el software que lo acompaña según las instrucciones del fabricante. En base a los datos históricos, el umbral se fijó manualmente a 0,1, por lo que pasó a través de la fase exponencial de todas las curvas estándar, y se aseguró la detección de 1 copia de ARN por reacción. Se registró una señal positiva de PCR, que indica la presencia de ARN del VHE, cada vez que se cruzó el umbral.

Todos los pocillos en una placa de titulación de VHE se puntuaron como positivos o negativos en base a en la presencia o ausencia de una señal PCR positiva. Los títulos de virus se calcularon a continuación como DICT<sub>50</sub>/ml utilizando los procedimientos estadísticos apropiados: Spearman-Kärber, NMP o Poisson.

Tabla 1. Resultados obtenidos a partir de experimentos que comparan la estabilidad térmica de concentrados de virus en PBS

Concentrado de virus	Log <sub>10</sub> de título de VHE				Log <sub>10</sub> de valor de reducción		
	5°C	60°C	70°C	80°C	60°C	70°C	80°C
VHE por TFF	3,8	NP	1,8	1,7	NA	2,0	2,1
VHE de Supe TFF	4,8	≤0,8	≤0,8	≤0,8	≥4,0	≥4,0	≥4,0

\*El log del valor de reducción (LRV, por sus siglas en inglés) se calculó mediante la resta del log<sub>10</sub> del título de VHE a 60°C, 70°C o 80°C del log<sub>10</sub> del título de VHE a 5°C

NT No probado  
NA No aplicable

Tal como se muestra en la Tabla 1, la inactivación de virus era hacia el límite de detección a 60°C, 70°C y 80°C cuando se prepararon concentrados de virus según una realización del procedimiento de la presente invención (ejemplo 2). Por otra parte, cuando se utilizaron concentrados obtenidos según el ejemplo 1 (procedimiento del estado de la técnica, sin tratamiento con detergente), los virus estaban todavía presentes después de calentar durante 4 horas a 70°C o 80°C.

Los datos de los informes publicados sugieren que la estabilidad térmica de los concentrados de virus generados según el ejemplo 1 difiere del comportamiento del VHE que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, los virus entéricos humanos son algunos de los virus conocidos más resistentes al calor y los estudios han demostrado un 90% de inactivación del virus de hepatitis A, virus de la polio y calicivirus felino, añadidos en PBS, después de calentar a 72°C durante 18,35, 5,44, y 7,39 segundos (Suphachai N, Cliver DO. 2002. J Virol Methods 104: 217-225). Además de 1 hora, el calentamiento a 60°C de una suspensión del hígado que contiene VHE de jabalí, que está estrechamente relacionado con el VHE humano, dio lugar a 4,42 log<sub>10</sub> de reducción del virus (Schielke A, y otros 2011. Virol Jol 8: 487-495). De este modo, los concentrados de VHE generados según el procedimiento de ejemplo 1 (procedimiento del estado de la técnica, sin tratamiento con detergente) pueden no evaluar con precisión la reducción de los aislados clínicos de VHE en estudios de eliminación de virus.

Por otra parte, los concentrados de virus generados según el procedimiento de la presente invención (ejemplo 2) se inactivaron completamente mediante tratamiento térmico, de manera similar a lo observado en el VHE que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, el virus preparado, según el procedimiento de la presente invención, puede ser un concentrado más apropiado para utilizar en estudios de eliminación de virus. De este modo, en algunas realizaciones, se prepara un concentrado de virus según el procedimiento del ejemplo 2.

Ejemplo 5. Aplicación de los procedimientos de preparación y ensayos de VHE en experimentos de calentamiento en seco

Como prueba de concepto, se prepararon concentrados de VHE por TFF y VHE de Supe TFF tal como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2 y se probaron en experimentos para evaluar la reducción y/o eliminación del virus durante la etapa de liofilización/calentamiento en seco (FD/DH, por sus siglas en inglés) de un procedimiento de fabricación de concentrado de Factor VIII. La etapa FD/DH es la última etapa del procedimiento de fabricación y aguas abajo de una etapa de tratamiento con disolvente/detergente (S/D, por sus siglas en inglés).

Para los experimentos de FD/DH, se colocaron en viales alícuotas de concentrado de factor VIII al que se le añadió VHE por TFF o VHE de Supe TFF y se liofilizaron en un liofilizador a escala de laboratorio utilizando el mismo ciclo de liofilización que a escala de fabricación. Los viales liofilizados se colocaron a continuación en un horno a 80°C y se calentaron en seco durante hasta 75 horas.

Los viales de producto al que se le ha añadido el virus para titulación se extrajeron antes (inicial) y después de la liofilización y sin calentamiento en seco (FD/DH 0 h), después de la liofilización, seguida de calentamiento en seco durante 24 horas (FD/DH 24 h), y después de la liofilización, seguida de calentamiento en seco durante 75 horas (FD/DH 75 horas). El producto al que se le ha añadido el virus FD/DH se reconstituyó con agua de pureza elevada hasta su volumen original, se diluyó en serie y se inoculó en células HepG2 o HepG2/C3A que se sembraron en una placa de 96 pocillos. El virus se adsorbió, se añadió un medio de recubrimiento final y las placas se colocaron en una incubadora a 37°C durante no menos de 3 días. A continuación, se extrajeron las placas de titulación, se aspiraron y se extrajo el ARN viral o se almacenaron a -80°C hasta la extracción. El ARN extraído de cada pocillo se analizó para determinar el VHE mediante PCR tal como se ha descrito en el ejemplo 3. Los pocillos de titulación se puntuaron como positivos o negativos para VHE y se determinaron los títulos de virus. Se calculó el log<sub>10</sub> de reducción de VHE durante la etapa mediante la comparación los log<sub>10</sub> de los títulos de virus en los viales iniciales y finales (FD/DH 75 horas).

Tabla 2. Resultados obtenidos a partir de experimentos que comparan la reducción de VHE por TFF y VHE de Supe TFF mediante un tratamiento de calentamiento en seco

Concentrado de virus	Log <sub>10</sub> de título de VHE				LRV
	Inicial	FD/DH 0h	FD/DH 24h	FD/DH 75h	
VHE por TFF	5,6	4,8	2,9	2,2	3,4
VHE de Supe TFF	5,2	4,7	1,4	0,6	4,6
*El log del valor de reducción (LRV, por sus siglas en inglés) se calculó restando el log <sub>10</sub> de título de VHE después del tratamiento con FD/DH de 75 horas del log <sub>10</sub> de título de VHE inicial.					

Tal como se muestra en la tabla 2, los títulos de ambas preparaciones de concentrado fueron similares antes y después de la liofilización y la reducción mediante liofilización no fue significativa (menos de 1 log<sub>10</sub>). Por el contrario, la inactivación de virus mediante tratamiento térmico en seco a 80°C fue significativa (más de 1 log<sub>10</sub>) y superior para VHE de Supe TFF (LRV = 4,6) que VHE por TFF (LRV = 3,4). La presencia probable de niveles elevados de

contaminantes en el concentrado de VHE por TFF preparada según el procedimiento del ejemplo 1 puede haber protegido el virus de la inactivación por calor o puede haber impedido la destrucción eficaz del ARN encapsidado del VHE.

5 Dado que el material de partida para la última etapa del tratamiento con FD/DH es tratado con S/D en la penúltima etapa, cualquier contaminante potencial del virus que podría estar presente en la corriente del procedimiento de fabricación de concentrado de Factor VIII se deslipidaría y presumiblemente sería más similar a VHE de Supe TFF (preparado según el procedimiento del ejemplo 2) que el VHE por TFF (preparado según el procedimiento del ejemplo 1). De este modo, el LRV para el VHE de Supe TFF es más probablemente una evaluación más precisa de la capacidad de reducción de VHE de la etapa de tratamiento con FD/DH.

Ejemplo 6. Preparación de concentrados de VHE por TFF tratados con detergente.

15 El procedimiento para la preparación de VHE de Supe TFF es relativamente largo. Por lo tanto, se desarrollaron procedimientos adicionales para el tratamiento con detergente para la preparación de concentrados de VHE por TFF. Tal como se muestra en la figura 3, se siguió el mismo procedimiento para la preparación de VHE por TFF que en el ejemplo 1, excepto que, según algunas realizaciones de la presente invención, se insertaron etapas para el tratamiento de la fracción retenida por TFF con varios detergentes antes de la ultracentrifugación a 85.000xg, 1,5 horas, 5°C. Se incubaron preparaciones VHE por TFF con Tritón con Tritón X-100 al 0,5% durante 1,5 horas, 37°C, mientras que se utilizó Tritón X-100 al 0,5% + LDS al 0,1% para tratar los concentrados de VHE por TFF con Tritón/LDS. Después de la ultracentrifugación, sólo los precipitados se procesaron posteriormente en los concentrados de virus. Los procedimientos para preparar el VHE por TFF y el VHE por TFF tratado con detergente se compararon mediante la extracción de fracciones intermedias de los procedimientos de purificación y la titulación de virus tal como se ha descrito previamente en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 3.

25

Tabla 3. Comparación de los procedimientos para preparar el VHE por TFF y el VHE por TFF tratado con detergente

Concentrado de virus	Log <sub>10</sub> de VHE total			
	Inicial	Fracción retenida por TFF	Sobrenadante de la ultracentrífuga	Preparación de VHE por TFF final
VHE por TFF	8,6	8,9	8,6	8,3
VHE por TFF con Tritón	8,6	8,9	9,1	6,8
VHE por TFF con Tritón/LDS	8,6	8,9	8,1	8,3

30 Las recuperaciones de los virus fueron comparables para los procedimientos de VHE por TFF y de VHE por TFF con Tritón/LDS, conteniendo las preparaciones finales de los concentrados aproximadamente 8,3 log<sub>10</sub> de VHE. El procedimiento del VHE por TFF con Tritón fue menos eficaz en la precipitación del virus, ya que la mayoría de los virus de entrada se perdieron en la fracción del sobrenadante de la ultracentrífuga, y se produjo un concentrado con menos de 7 log<sub>10</sub> de VHE.

35 Ejemplo 7. Aplicación de los procedimientos de preparación y ensayo de VHE en experimentos de calentamiento en líquido

40 La pasteurización es la última etapa en el procedimiento de fabricación de albúmina e implica calentar viales de producto muy purificado a 60°C durante no menos de 10 horas. El virus se preparó tal como se ha descrito en el ejemplo 6 y se añadió en albúmina al 25% antes de la incubación a 5°C o 60°C durante 7 horas. A continuación, se extrajeron las muestras para la titulación del virus y los resultados se muestran en la tabla 4. Como comparador, también se presentan datos de la pasteurización (10 horas, 60°C) de albúmina al 25% a la que se le ha añadido VHE de Supe TFF (preparado según el procedimiento del ejemplo 2).

Tabla 4. Resultados obtenidos a partir de experimentos para comparar la reducción del VHE por TFF y del VHE por TFF tratado con detergente mediante calentamiento en líquido.

Concentrado de virus	Número de experimento	Log <sub>10</sub> de título de VHE				LRV
		7 horas		10 horas		
		5°C	60°C	5°C	60°C	
VHE por TFF	VM1910	5,6	3,3	ND	ND	2,3
VHE por TFF con Tritón	VM1910	4,8	1,6	ND	ND	3,2
VHE por TFF con Tritón/LDS	VM1910	6,1	2,3	ND	ND	3,8
VHE de Supe TFF	VM1893	ND	ND	5,6	1,4	4,2

El VHE por TFF fue el virus de prueba más resistente al calor y mostró sólo una reducción de 2,3 log<sub>10</sub> en el título después del tratamiento térmico. El LRV para VHE por TFF con Tritón fue de aproximadamente un log<sub>10</sub> superior, aun cuando su título de partida era de aproximadamente un log<sub>10</sub> menor que VHE por TFF. El LRV para VHE por TFF tratado con Tritón/LDS fue el más elevado entre las tres preparaciones de VHE por TFF y ligeramente inferior que la reducción conseguida después de la pasteurización de la albúmina a la que se le había añadido VHE de Supe TFF, una preparación de virus también tratada con Tritón/LDS.

#### Ejemplo 8. Concentración y purificación de virus mediante TFF, ultracentrifugación y ultrafiltración.

Para la clarificación de virus, se descongeló concentrado de virus en crudo congelado. Para preparar un concentrado de virus concentrado y purificado de virus no envueltos se añadió Tritón X-100 al 0,5% y LDS al 0,1% al concentrado de virus en crudo descongelado y se incubó a 37°C durante 1 hora. La clarificación se llevó a cabo por centrifugación a una velocidad entre 3.000 a 8.000 xg durante de 15 a 30 minutos a entre 2°C y 8°C. Se extrajo y se conservó el sobrenadante y el precipitado se descartó. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm.

Para la TFF, el sistema de TFF se limpió y preparó para la filtración. El concentrado de virus filtrado se clarificó.

Para la ultracentrifugación, la fracción retenida de TFF se colocó en tubos de ultracentrífuga. Los tubos se equilibraron hasta que los pesos estuvieron dentro de ±0,05g el uno del otro. Los tubos se cargaron en el rotor basculante y se centrifugaron a entre 2°C y 8°C durante 1,5 horas a aproximadamente 85.000 xg. Al final de la ultracentrifugación, el sobrenadante de cada uno de los tubos de centrífuga se decantó con cuidado y se descartó como deshecho líquido. Los tubos se invirtieron y se dejaron escurrir en una toalla absorbente durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. Tras el escurrido, la toalla se descontaminó y se deshechó.

Para la ultracentrifugación, el precipitado de la ultracentrifugación se resuspendió en no menos de 5 ml de PBS. La suspensión de precipitado se clarificó a entre 3.000 y 4.200 xg durante 15 minutos a entre 2°C y 8°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en un dispositivo de filtración Amicon® UF para concentrar. En caso necesario, se añadió PBS para llevar el volumen final a aproximadamente 15 ml (la capacidad del filtro es de 15 ml). El dispositivo de filtro tapado se colocó en el rotor de la centrífuga y el rotor se equilibró con un contrapeso. La centrifugación se llevó a cabo a aproximadamente 5.000 xg a entre 2°C y 8°C hasta que el volumen final de la muestra retenida (concentrado de virus concentrado y purificado) no fue más de 1 ml (el tiempo aproximado de centrifugación fue de 15 a 60 minutos).

#### DEFINICIONES

HepG2: Células de carcinoma hepatocelular obtenidas de la American Type Culture Collection (número ATCC HB-8065)

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

FBS: Suero bovino fetal

Título: Concentración de una sustancia (virus) en solución o la fuerza de dicha sustancia determinada mediante titulación

SK: Spearman-Kärber es un método estadístico para el cálculo de títulos de virus en muestras con concentraciones relativamente elevadas de virus. Este método se utiliza cuando la proporción de pocillos positivos en cualquier dilución es superior al 25% (figura 1).

MPN: Número Más Probable es un método estadístico para el cálculo de títulos de virus en muestras con concentraciones relativamente bajas de virus. MPN se utiliza cuando la proporción de pocillos positivos en todas las diluciones es inferior al 25%.

Poisson: Poisson es un método estadístico para el cálculo de títulos de virus en muestras con concentraciones extremadamente bajas de virus. Este método se utiliza cuando no se observan pocillos positivos.

ATCC: American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipo)

Fracción retenida de VHE por TFF: Es el material que permanece después de que se haya concentrado el lisado de células de VHE clarificado utilizando una membrana de TFF de 300 kDa. La fracción retenida de VHE por TFF se utiliza para preparar concentrados de VHE por TFF.

Sobrenadante de VHE por TFF es el efluente que permanece después de la centrifugación de la fracción retenida de

VHE por TFF a aproximadamente a 84780xg. El sobrenadante de VHE por TFF se utiliza para preparar concentrados de VHE de Supe TFF.

DICT<sub>50</sub> corresponde al 50% de la dosis infectiva de cultivo tisular (prueba de dilución de punto final). Es una medida del título de virus infecciosos que cuantifica la cantidad de virus requerida para matar el 50% de los huéspedes infectados o para producir un efecto citopático en el 50% de las células de cultivo de tejidos inoculadas.

A280: Absorbancia medida a 280 nm que es indicativa de la concentración y/o la cantidad de proteínas.

UA: Unidades de absorbancia.

Concentrado de virus: muestra de virus con contenido viral conocido.

## REFERENCIAS

1. Okamoto H (2011) Hepatitis E virus cell culture models (Modelos de cultivo celular de virus de la hepatitis E). Virus Research 161: 65- 77.

2. Shukla P, y otros (2011) Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant (Infecciones cruzadas entre especies de células cultivadas por parte del virus de la hepatitis E y descubrimiento de un recombinante virus hospedador infeccioso). PNAS. 108 (6): 2438-2443.

3. Shukla P, y otros (2012) Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination (La adaptación de un virus de la hepatitis E del genotipo 3 al crecimiento eficaz en un cultivo celular depende de un segmento de gen humano insertado adquirido mediante recombinación). J Virol 86 (10): 5697-5707

4. Solicitud de patente provisional de Estados Unidos No 61/431,377

5. Solicitud de patente provisional de Estados Unidos No 61/554,323

6. Solicitud de patente de Estados Unidos No. 13/978,839

7. Solicitud internacional de PCT No. PCT/US2012/020830

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GRIFOLS, S.A.

<120> PROCEDIMIENTOS DE PURIFICACIÓN DE UN VIRUS PRODUCIDO IN VITRO Y ENSAYO DE ELIMINACIÓN DEL VIRUS

<130> DURC6.007AUS

<150> US 62/196,004

<151> 2015-07-23

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética; Cebador derivado de VHE

<400> 1

cggtatcgg ccagaagtt 19

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética; Cebador inverso de VHE

<400> 2

ccgtggctat aactgtggtc t 21

<210> 3

# ES 2 712 664 T3

<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Sintética, sonda de VHE

<220>  
<221> misc\_feature  
10 <222> (1)..(1)  
<223> n = Fam

<220>  
15 <221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
<223> n = Zen

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (26)..(26)  
<223> n = 3IABkFQ

25 <400> 3  
etttttacgc naggctgccca aggccn 26

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de purificación de un virus no envuelto o pseudoenvuelto propagado en un cultivo celular, comprendiendo el procedimiento una etapa de tratar una muestra que comprende el virus no envuelto o pseudoenvuelto con un detergente, caracterizado por que el detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que el virus propagado en un cultivo celular es el virus de la hepatitis E (VHE).
- 15 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que el virus propagado en un cultivo celular es, o bien el virus de la hepatitis A (VHA) o bien el parvovirus porcino (PVP).
- 20 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que el virus se produce en un cultivo celular *in vitro*.
- 25 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, caracterizado por que el cultivo celular *in vitro* comprende una línea celular establecida.
- 30 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado por que la línea celular establecida se selecciona de un grupo que consiste en HepG2 (número ATCC HB-8065) y HepG2/C3A (número ATCC CRL-10741).
- 35 7. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa de tratamiento se lleva a cabo durante 1 hora.
- 40 8. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra es un sobrenadante obtenido a partir de la ultracentrifugación de una suspensión de lisado celular infectado con virus clarificado.
- 45 9. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra es una fracción retenida derivada de la filtración de flujo tangencial de una suspensión de lisado celular infectado con virus clarificado.
- 50 10. Procedimiento para medir el nivel de un virus no envuelto o pseudoenvuelto en una muestra, caracterizado por que la muestra comprende plasma o sangre de un mamífero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
  - 55 a) proporcionar la muestra a una mezcla que comprende una línea celular y un medio de cultivo;
  - 60 b) incubar para permitir la propagación del virus no envuelto o el virus pseudoenvuelto, si está presente en la muestra, para obtener una fracción incubada;
  - 65 c) tratar con al menos un detergente para obtener una fracción tratada; en el que el detergente se selecciona del grupo que consiste en Tritón X-100 al 0,5% y una mezcla de Tritón X-100 al 0,5% y dodecil sulfato de litio al 0,1%
  - 70 d) recoger una parte de la fracción tratada para obtener una fracción recogida; y
  - 75 e) medir el nivel del virus no envuelto o pseudoenvuelto en la fracción recogida.
- 80 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que el virus no envuelto o pseudoenvuelto es VHE.
- 85 12. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que el virus no envuelto o pseudoenvuelto es, o bien VHA o bien PVP.
- 90 13. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que el virus se propaga en un cultivo celular *in vitro* que comprende una línea celular establecida.
- 95 14. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que la línea celular se selecciona del grupo que consiste en HepG2 (número ATCC HB-8065) y HepG2/C3A (número ATCC CRL-10741).
- 100 15. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que la muestra comprende una primera fracción retenida obtenida mediante la filtración de flujo tangencial de una parte de la fracción incubada a través de una membrana.
- 105 16. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que la muestra comprende un primer sobrenadante obtenido mediante la filtración de flujo tangencial de una parte de la fracción incubada a través de una membrana para obtener una primera fracción retenida y la centrifugación de la primera fracción retenida.
- 110 17. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que la muestra se trata con al menos un detergente o una mezcla de detergentes para obtener una primera solución.
- 115 18. Procedimiento, según la reivindicación 17, caracterizado por que el procedimiento comprende además:



- 5 a) proporcionar un primer precipitado obtenido mediante la centrifugación de la primera solución;  
b) proporcionar una segunda solución obtenida mediante la resuspensión del primer precipitado en PBS;  
c) proporcionar una tercera solución obtenida mediante la clarificación de la segunda solución;  
d) proporcionar un primer filtrado obtenido mediante la filtración de la tercera solución utilizando una membrana;  
y  
e) proporcionar una segunda fracción retenida obtenida mediante la ultrafiltración del primer filtrado, en el que la segunda fracción retenida comprende la fracción tratada.
- 10 19. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que la medición del nivel de virus no envuelto o pseudoenvuelto comprende detectar una sustancia biológica.
20. Procedimiento, según la reivindicación 19, caracterizado por que la sustancia biológica comprende una secuencia de polinucleótido y/o una secuencia de polipéptido de un virus.
- 15 21. Procedimiento, según la reivindicación 20, caracterizado por que la sustancia biológica es un ácido ribonucleico de VHE.
- 20 22. Procedimiento, según la reivindicación 21, caracterizado por que la medición de la sustancia biológica comprende:  
a) proporcionar una primera mezcla de reacción que comprende el ácido ribonucleico de VHE obtenido mediante la mezcla de una parte de la fracción tratada con una solución de lisis;  
b) proporcionar una segunda mezcla de reacción obtenida mediante la adición de un primer reactivo a la primera mezcla de reacción, en el que la segunda mezcla de reacción comprende un ácido desoxirribonucleico que es  
25 complementario al ácido ribonucleico del VHE;  
c) añadir, a la segunda mezcla de reacción, un segundo reactivo que es, como mínimo, parcialmente complementario a una secuencia dentro del ácido desoxirribonucleico;  
d) añadir, a la segunda mezcla de reacción, un tercer reactivo que es, como mínimo, parcialmente  
30 complementario a una secuencia dentro del ácido desoxirribonucleico;  
e) amplificar la secuencia comprendida por el segundo y el tercer reactivos dentro del ácido desoxirribonucleico;  
y  
f) medir la concentración de la secuencia amplificada.
- 35 23. Procedimiento, según la reivindicación 22, caracterizado por que el segundo reactivo y el tercer reactivo comprenden una secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:  
a) 5'-CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID NO:1);  
b) 5'-CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO:2) y  
40 c) 5'-FAM-TTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO:3).

Figura 1

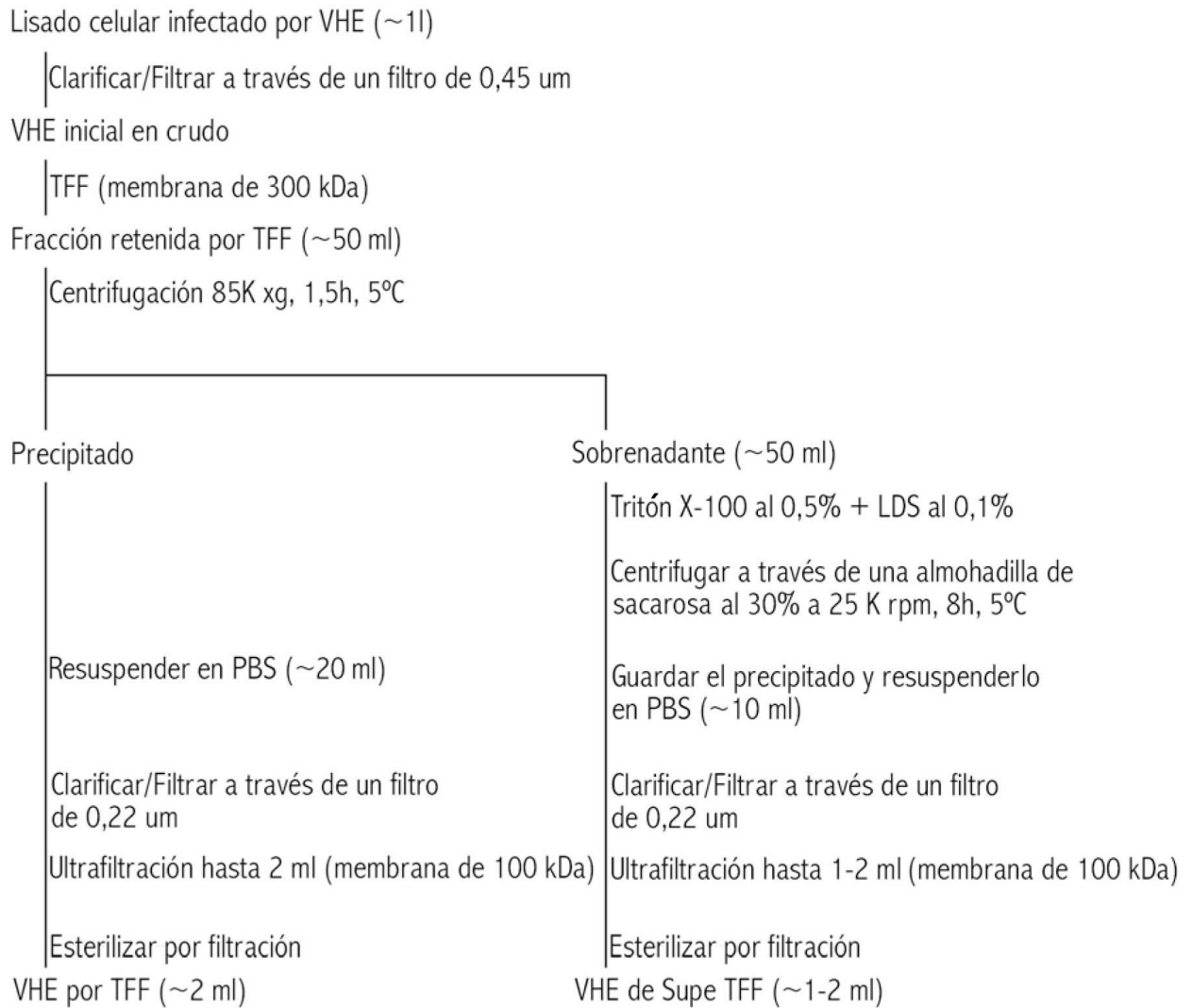
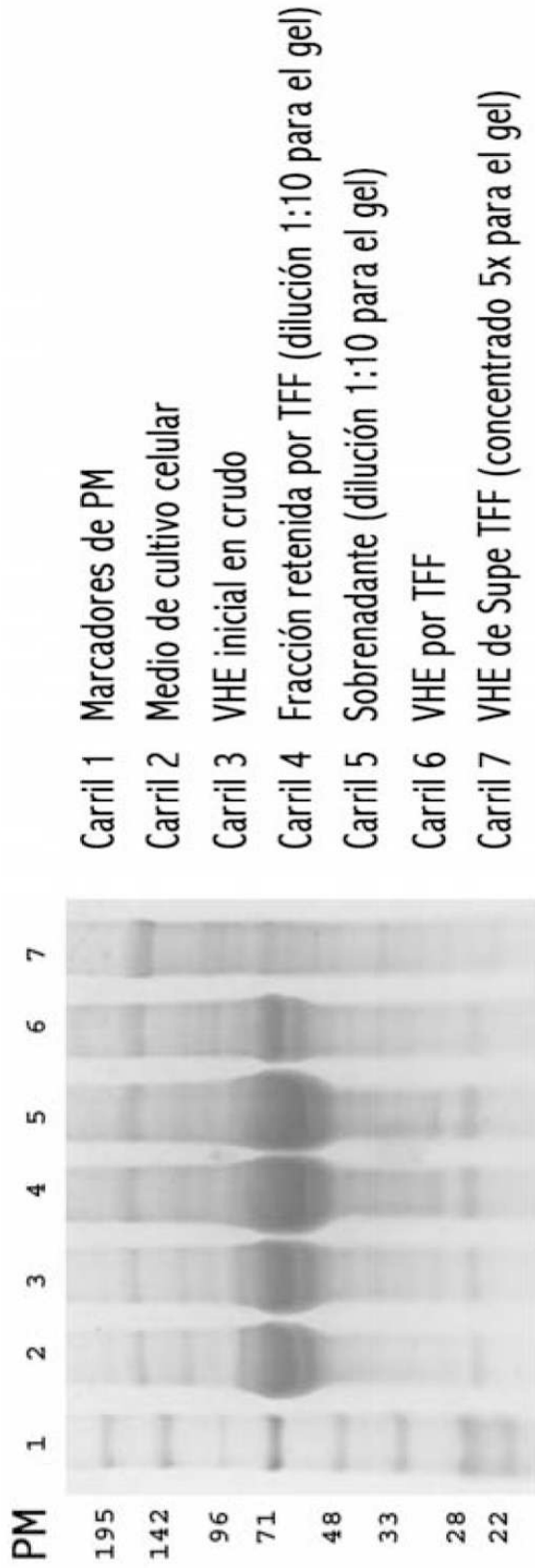


Figura 2



Parámetro	Crudo Inicial	Fracción retenida por TFF	Sobrenadante	VHE por TFF	VHE de Supe TFF
Volumen (ml)	500	50	50	1	1
A280	4	41	41	3,8	0,8
Log <sub>10</sub> de copias de ARN de VHE/ml	7,7	8,9	8,7	9,1	8,9

Figura 3

Lisado infectado por VHE	Lisado infectado por VHE	Lisado celular infectado por VHE
Clarificar/Filtrar a través de un filtro de 0,45 um	Clarificar/Filtrar a través de un filtro de 0,45 um	Clarificar/Filtrar a través de un filtro de 0,45 um
VHE inicial en crudo	VHE inicial en crudo	VHE inicial en crudo
TFF (membrana de 300 kDa)	TFF (membrana de 300 kDa)	TFF (membrana de 300 kDa)
Fracción retenida por TFF	Fracción retenida por TFF	Fracción retenida por TFF
Centrifugación 85 xg, 1,5h, 5°C	Tritón al 0,5%	Tritón al 0,5% + LDS al 0,1%
Precipitado	Precipitado	Precipitado
Resuspender en PBS	Resuspender en PBS	Resuspender en PBS
Clarificar/Filtrar a través de un filtro de 0,22 um	Clarificar/Filtrar a través de un filtro de 0,22 um	Clarificar/Filtrar a través de un filtro de 0,22 um
Ultrafiltrar (membrana de 100 kDa)	Ultrafiltrar (membrana de 100 kDa)	Ultrafiltrar (membrana de 100 kDa)
Esterilizar por filtración	Esterilizar por filtración	Esterilizar por filtración
VHE por TFF	VHE por TFF con Tritón	VHE por TFF con Tritón/LDS

Figura 4

5'-CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID NO: 1)  
5'-CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO: 2)  
5'-FAM-TTTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO: 3)