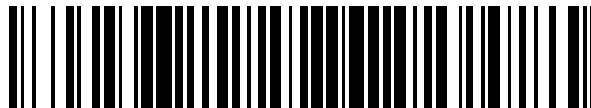


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 535**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2015 PCT/EP2015/079534**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16096688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2015 E 15816413 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3234113**

54 Título: **Procedimiento de purificación de virus a gran escala**

30 Prioridad:

16.12.2014 US 201462092413 P

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

01.08.2019

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)

Rue de l'Institut, 89

1330 Rixensart, BE y

KM BIOLOGICS CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

GERKENS, PASCAL, CHARLES, LOUIS y

LERUSE, JEAN-FRANCOIS, JOSE, ALAIN,

MARIE, GHISLAIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 721 535 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de virus a gran escala

5 Declaración sobre la investigación federalmente patrocinada

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo el Contrato # HHSO100200600011C otorgado por el Departamento de Salud y Servicios Humanos; el gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

10

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la purificación de virus.

15 **Antecedentes**

El desarrollo de tecnologías basadas en cultivos celulares como alternativa a los sistemas tradicionales de producción basados en huevos para la fabricación de vacunas virales probablemente aparezca como la solución más rápida y más prometedora para superar los inconvenientes y limitaciones asociados con los sistemas tradicionales basados en huevos. Las producciones comerciales de vacunas virales generalmente requieren grandes cantidades de virus como fuente de antígeno. Sin embargo, el proceso basado en huevos es vulnerable debido a la calidad biológica variable de los huevos y carece de flexibilidad debido a los problemas logísticos relacionados con la falta de disponibilidad de grandes cantidades de huevos adecuados.

20

25 Sin embargo, después de la producción, ya sea producida en huevos o en cultivo celular, el virus producido debe recuperarse del cultivo celular y, cuando sea apropiado, purificarse. Los procedimientos para purificar virus son conocidos en la técnica. Un procedimiento típico emplea la centrifugación en gradiente de sacarosa. Por ejemplo, los documentos WO 2009/007608, WO 2008/135229 y WO 2010/089339 describen la purificación de virus mediante centrifugaciones en gradiente de sacarosa utilizando un gradiente autogenerado.

30

La producción eficaz de vacunas requiere el crecimiento de cantidades a gran escala de virus producidos con altos rendimientos a partir de un sistema huésped. Las condiciones de cultivo bajo las cuales se cultiva un virus son de gran importancia con respecto al logro de un alto rendimiento aceptable del virus. Por lo tanto, para maximizar el rendimiento del virus deseado, tanto el sistema como las condiciones de cultivo deben adaptarse específicamente para proporcionar un entorno ventajoso para la producción del virus deseado que sea adecuado para la producción a gran escala. Una forma es mejorar la productividad específica de la célula, por ejemplo, mejorando el medio de cultivo, o aumentando la densidad celular y/o reduciendo la pérdida de material del virus que se produce a lo largo de las diferentes etapas de purificación. Se introduce un nivel adicional de complejidad en el nivel de fabricación, cuando es necesario procesar grandes volúmenes o cantidades. Al aumentar la escala, el riesgo de pérdida en la calidad del producto (por ejemplo, la pureza del producto) y/o el rendimiento del producto es significativo. Tal ocurrencia requiere una optimización adicional de un proceso desarrollado de manera satisfactoria a pequeña escala. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar procedimientos para producir y purificar virus con un nivel de pureza adecuado y un buen rendimiento a gran escala.

35

40

45

Sumario de la invención

50 En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para purificar un virus que comprende al menos las siguientes etapas:

- a) obtener un fluido que contiene virus,
- b) proporcionar un gradiente de densidad lineal preformado de un intervalo dado X% -Y% (v/p) (siendo X el límite inferior y Y el límite superior) en un rotor de centrífuga con una capacidad de al menos 8 L,
- 55 c) agregar el fluido al gradiente de densidad lineal preformado,
- d) centrifugar para separar el virus de las impurezas contaminantes, y
- e) recolectar las fracciones que comprenden el virus purificado,

60

en las que la parte lineal del gradiente abarca el porcentaje de densidad correspondiente al porcentaje al que migrará el virus a purificar.

65

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de una vacuna que comprende al menos la etapa de purificar el virus que va a ser usado como un antígeno en la vacuna de acuerdo con el procedimiento de la invención y formular dicho virus purificado en una vacuna.

65

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar una vacuna que comprende al menos las siguientes etapas:

- 5 A) obtención de un fluido que contiene virus,
- B) proporcionar un gradiente de densidad lineal preformado de un intervalo dado X% -Y% (v/p) (siendo X el límite inferior y Y el límite superior) en un rotor de centrifuga con una capacidad de al menos 4 L, de al menos 6 L, de al menos 8 L, o de al menos 10 L, en el que la parte lineal del gradiente abarca el porcentaje de densidad correspondiente al porcentaje al que migrará el virus,
- 10 C) agregar el fluido al gradiente de densidad lineal preformado,
- D) centrifugar para separar el virus de las impurezas contaminantes, y
- E) recoger las fracciones que comprenden el virus purificado,
- F) formular el virus purificado en una vacuna.

15 Descripción de los dibujos

Figura 1: Forma de un gradiente de sacarosa autogenerado obtenido en un rotor de 3,2 L. Se recogieron fracciones sucesivas de 100 mL del gradiente formado y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría.

Figura 2: Forma de un gradiente de sacarosa autogenerado obtenido en un rotor de 8 L. Se recogieron fracciones sucesivas de 250 mL del gradiente formado y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría.

Figura 3: Forma de un gradiente de sacarosa preformado obtenido en un rotor de 8 L. La **Figura 3A** muestra un diagrama que representa el procedimiento de formación del gradiente lineal preformado: 3 recipientes que comprenden 4 L de 55% de sacarosa (Recipiente 1) y 1 L de PBS/Citrato (Recipientes 2 y 3) se conectan sucesivamente entre sí, el tercer recipiente se conecta a un rotor de 8 L. La **Figura 3B** muestra la forma de la sacarosa preformada obtenida siguiendo el procedimiento proporcionado en la Figura 3A. Se recogieron fracciones sucesivas de 250 mL del gradiente formado y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría.

Figura 4: Forma de un gradiente de sacarosa preformado obtenido en un rotor de 8 L. La **Figura 4A** muestra un diagrama que representa el procedimiento de formación del gradiente lineal preformado: 2 recipientes que comprenden 4 L de 55% de sacarosa (Recipiente 1) y 1 L de PBS/Citrato (Recipiente 2) se conectan sucesivamente entre sí, el segundo recipiente está conectado a un rotor de 8 L. La **Figura 3B** muestra la forma de la sacarosa preformada obtenida siguiendo el procedimiento proporcionado en la Figura 3A. Se recogieron fracciones sucesivas de 250 mL del gradiente formado y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría.

40 Descripción detallada

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para purificar virus, ya sea producido en huevos o en cultivo celular, que es particularmente útil para la producción a gran escala. Una etapa típica utilizada durante la purificación del virus es la etapa de ultracentrifugación en gradiente de densidad, tal como el gradiente de sacarosa, por ejemplo.

La ultracentrifugación en gradiente de densidad es una técnica comúnmente utilizada para purificar virus, en particular virus en su envoltura. Se utiliza especialmente en el campo de fabricación de vacunas. Típicamente, la separación de partículas, tal como un virus y posibles impurezas contaminantes, mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad puede ser de rata zonal, es decir, depende de las diferencias de tamaño de partícula, o puede ser isopícnico, es decir, depende de las diferencias de densidad de partículas, o puede depender de una combinación de ambos. Para lograr una separación de rata zonal, la densidad de las partículas a separar debe ser más alta que la densidad del gradiente en cualquier posición del gradiente. En los procedimientos isopícnicos, el gradiente de densidad abarca toda la gama de densidades de las partículas a separar. Dependiendo de su densidad y del intervalo del gradiente de densidad, después de la centrifugación, las partículas migran a una posición en el gradiente donde la densidad es igual a la densidad de las partículas (las partículas flotan en esa posición y permanecen allí), o las partículas se sedimentan a la parte inferior del gradiente. Después de la centrifugación, solo se recogerán las fracciones de gradiente que contienen el virus. El gradiente lineal preformado de la invención se puede usar adecuadamente para una separación de rata zonal o para una separación isopícnica. En una realización, la separación del virus de las impurezas contaminantes en el procedimiento de purificación de un virus de acuerdo con la invención es isopícnica.

Típicamente, un gradiente de densidad puede ser lineal o discontinuo. Un gradiente lineal ofrece en particular las ventajas de permitir una mejor separación entre las partículas víricas y las impurezas contaminantes residuales que se originan en el huésped utilizado para producir las partículas víricas, y obtener un virus purificado que se concentra en un pequeño volumen. Al escalar el proceso para producir un virus, y en particular cuando se contempla el uso de un rotor con una alta capacidad para ahorrar la cantidad de centrifugadoras necesarias para procesar grandes volúmenes, los inventores observaron que el

- 5 procedimiento conocido que utilizaban para rotores pequeños, que consiste en crear un gradiente autogenerado a partir de una solución madre única no pudo proporcionar un gradiente lineal. Con el fin de obtener un gradiente lineal en rotores que tienen una alta capacidad, los inventores observaron que el gradiente tenía que formarse previamente como lineal, es decir, formado antes de comenzar la centrifugación.
- 10 Por "preformado", se quiere decir en el sentido de la presente invención que el gradiente se crea, y por lo tanto se forma en el rotor, antes de comenzar la centrifugación, en oposición al gradiente autogenerado.
- 15 Por "autogeneración", se quiere decir en el sentido de la presente invención que el gradiente se crea, y por lo tanto se forma, durante la centrifugación.
- Por "lineal", se quiere decir en el sentido de la presente invención un gradiente de densidad en el que un gráfico de la concentración frente al volumen del gradiente produce una línea sustancialmente recta, en oposición a un gradiente "discontinuo" o escalonado que es compuesto de capas, con cambios bruscos de concentración de una capa a la siguiente.
- 20 Por "meseta", se quiere decir en el sentido de la presente invención una zona de gradiente significativa, es decir, una parte significativa del volumen de gradiente, sobre la cual el valor de concentración, o porcentaje, permanece aproximadamente constante. Por ejemplo, una meseta puede representar el 5%, 10%, 15% o 20% o más del volumen total del gradiente. La meseta puede estar presente, en particular, en los extremos del gradiente.
- 25 Por "un valor aproximadamente constante", se quiere decir en el sentido de la presente invención en relación con un valor dado, valores que presentan una variación de 5% o menor.
- 30 Para fines de claridad y simplicidad, el gradiente lineal preformado implementado en el procedimiento de la invención se describirá a continuación en relación con un gradiente de azúcar. Sin embargo, dicho gradiente lineal preformado no se limita a los gradientes de azúcar. Toda la divulgación detallada a continuación es aplicable a otros tipos de gradiente.
- 35 Los inventores observaron que si se cargan en el rotor hasta 4, y hasta 7, diferentes capas de azúcar con una densidad creciente, podrían obtener un gradiente con una linealidad aceptable después de la centrifugación. Alternativamente, para evitar cambiar manualmente el matraz de azúcar por cada nueva capa de azúcar que se va a cargar, los inventores desarrollaron un procedimiento automático para formar un gradiente lineal preformado a gran escala basado en una dilución progresiva.
- 40 Por "dilución", se quiere decir que una solución madre formadora de gradiente a un porcentaje apropiado (p/v) se diluye en una solución de dilución simple, o en soluciones de dilución sucesivas, antes de inyectarse en el rotor. Como se describe con más detalle a continuación, la extensión de la dilución, el porcentaje de la solución madre, el volumen de la solución madre y el volumen de la solución o soluciones de dilución pueden variar dependiendo, por ejemplo, del intervalo objetivo y/o la pendiente objetivo del gradiente lineal a preformarse.
- 45 Por "dilución progresiva", se quiere decir un sistema de goteo en el que cada gota de una solución concentrada se diluye en una solución de dilución. Por ejemplo, la solución concentrada puede ser la solución madre, o la solución madre diluida que va a ser diluida adicionalmente, cuando se contempla más de una dilución como se describe a continuación.
- 50 Por "rotor de alta capacidad", se quiere decir un rotor que tiene una capacidad de al menos 4 L, adecuadamente al menos 6 L, adecuadamente al menos 8 L, más adecuadamente al menos 10 L, o más.
- Por "capacidad del rotor", se quiere decir el volumen máximo de líquido que puede contener un rotor.
- 55 Por "capacidad de carga", se quiere decir la cantidad de litros de líquido que contienen virus que se cargan por litro del rotor.
- 60 El procedimiento de acuerdo con la presente invención es particularmente ventajoso cuando es necesario purificar un virus producido a gran escala. Por ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa adecuadamente cuando es necesario procesar y purificar volúmenes de 1 L, 50 L, 100 L, 200 L, 500 L, 1.000 L o volúmenes más altos de fluidos que contienen virus.
- 65 El procedimiento de acuerdo con la presente invención es aplicable a la purificación de cualquier tipo de virus y es independiente de los tipos de sustrato huésped usados para producir virus. Por ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la invención es aplicable a virus producidos en cultivos celulares o en huevos.

El procedimiento de la invención es susceptible a una amplia gama de virus, cualquier virus que típicamente se purifica por ultracentrifugación en gradiente de densidad. A modo de ejemplos, el procedimiento de la invención contempla la purificación de virus en su envoltura, en particular, Hepadnavirus, virus del herpes, ortomixovirus, tales como por ejemplo virus de la gripe, paramixovirus, tales como virus del sarampión, 5 Togavirus, tales como por ejemplo virus de la rubéola, rabdovirus, tales como por ejemplo, el virus de la rabia, virus de la viruela y retrovirus. En una realización, los virus purificados y producidos por el procedimiento de la invención pertenecen a la familia de los ortomixovirus, en particular, el virus de la gripe.

La presente invención no se basa en el uso de un tipo de gradiente de densidad específico y, por lo tanto, 10 puede aplicarse a cualquier gradiente del tipo de densidad. La elección del medio de gradiente de densidad depende del virus que se va a purificar y de la aplicación destinada al virus purificado resultante. Por ejemplo, los virus en su envoltura son menos densos que los virus sin envoltura. Esto se conoce en la técnica. Específicamente, dependiendo del propósito para el cual se prepara el virus producido de acuerdo con el procedimiento, se utilizará un medio que no afecta la integridad del virus o su actividad biológica. Por 15 ejemplo, cuando el virus preparado según el procedimiento de la invención está destinado a la vacunación, el medio se elige para mantener la inmunogenicidad del virus, o del antígeno viral del mismo. Se pueden usar soluciones de azúcar, en particular sacarosa, para generar gradientes de densidad para usar en el procedimiento de acuerdo con la invención. La sacarosa se usa particularmente para purificar virus en su envoltura, tales como, pero no limitados a, virus de la gripe. También es un azúcar de uso frecuente en el 20 campo de la fabricación de vacunas.

En una realización, el azúcar utilizado para crear un gradiente de densidad lineal preformado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es sacarosa. Esto es ventajoso para la purificación de productos para uso humano cuando se deben tener en cuenta las consideraciones de seguridad. Sin embargo, la 25 invención también contempla el uso de otros azúcares, incluidos los azúcares de alcohol, tales como, por ejemplo, sorbitol o azúcares hidrogenados, azúcares lineales y azúcares modificados o cualquier otro azúcar, siempre que el azúcar tenga una solubilidad en agua suficiente para producir soluciones con densidades especificadas según el tipo de virus a purificar.

Los gradientes de densidad lineal preformados utilizados en el procedimiento de la presente invención no 30 están limitados a los gradientes de azúcar. La presente invención también contempla, como otros ejemplos ilustrativos, el uso de gradientes de sales, tales como, por ejemplo, cloruro de cesio, que es adecuado para la purificación tanto de virus en su envoltura como de virus sin envoltura. Alternativamente, el gradiente también se puede preparar con tartrato de potasio, que presenta la ventaja de alcanzar un gradiente con una densidad 35 más alta, en comparación con el gradiente de sacarosa. Por consiguiente, los gradientes de tartrato de potasio, en particular, se emplean adecuadamente para purificar virus sin envoltura.

El gradiente lineal preformado que se proporciona en un rotor con una alta capacidad de acuerdo con el procedimiento de la invención se puede formar por dilución progresiva de una solución madre en una o más 40 soluciones de dilución antes de la inyección en el rotor.

Linealidad

La linealidad del gradiente preformado utilizado en el procedimiento de la invención puede variar de dos 45 maneras. Por un lado, la pendiente que define la inclinación del gradiente puede variar. La inclinación apropiada se puede elegir, por ejemplo, dependiendo del nivel deseado de purificación del virus y del número deseado de fracciones de gradiente de las que se recupera el virus purificado, es decir, de qué concentrado debe estar el líquido del virus después de la purificación en un gradiente de densidad ultracentrifugado. Normalmente, cuanto más empinado sea el gradiente lineal, más concentrado estará el virus purificado, ya 50 que estará presente en varias fracciones de gradiente correspondientes a un volumen más pequeño. Por el contrario, cuanto más gradual sea un gradiente lineal, menos concentrado estará el virus purificado, ya que estará presente en el número de fracciones de gradiente correspondientes a un volumen mayor. Además, la pendiente del gradiente lineal afectará la capacidad de separar el virus de las impurezas contaminantes residuales. Está dentro de las capacidades de la persona experta determinar la pendiente apropiada del 55 gradiente lineal, según sea necesario, teniendo en cuenta los dos elementos anteriores, es decir, la concentración del virus y la calidad de la separación del virus de las impurezas contaminantes residuales.

Por otra parte, el grado de linealidad, es decir, el volumen del gradiente sobre el cual dicho gradiente es 60 lineal, puede variar. El requisito mínimo es que el gradiente lineal preformado utilizado en el procedimiento de la invención sea lineal en el intervalo de densidad del gradiente que abarca el porcentaje de densidad correspondiente al porcentaje al que migrará el virus que se purificará. Adecuadamente, el gradiente lineal preformado usado en el procedimiento de la invención es lineal sobre al menos el 30%, adecuadamente al menos el 50%, adecuadamente al menos el 60%, adecuadamente al menos el 70%, adecuadamente al menos el 80%, adecuadamente al menos el 90% de su volumen total o el gradiente es adecuadamente lineal 65 sobre la totalidad de su volumen. En realizaciones particulares, el gradiente de densidad lineal preformado utilizado en el procedimiento de la invención es lineal desde más del 50% hasta más del 90%, desde más del

60% hasta más del 80% de su volumen total. En realizaciones particulares adicionales, el gradiente de densidad lineal preformado usado en el procedimiento de la invención es lineal en al menos el 70%. Por consiguiente, el gradiente lineal preformado que se usará en el procedimiento de la invención puede mostrar las mesetas en los extremos del gradiente, ya sea en un solo extremo o en ambos extremos. Sin embargo, el volumen agregado correspondiente a las mesetas, si está presente más de una meseta, no excede adecuadamente el 70%, adecuadamente el 50%, adecuadamente el 40%, adecuadamente el 30%, adecuadamente el 20%, adecuadamente el 10% o el 5% del volumen total del gradiente.

La linealidad, así como la extensión de la linealidad, de un gradiente de densidad pueden verificarse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica que permita graficar el porcentaje del gradiente frente al volumen del gradiente. La linealidad, como se definió anteriormente, se establece cuando dicho gráfico produce una línea sustancialmente recta. Además, a partir de un gráfico de este tipo se puede calcular la pendiente, es decir, la pendiente se puede monitorizar y adaptar, si es apropiado. Por ejemplo, cuando azúcar es el medio utilizado para el gradiente de densidad, se puede usar un análisis de refractometría, tal como un análisis del Brix, que es bien conocido en la técnica para medir el porcentaje de azúcar (expresado en gramos por 100 mL) en fracciones sucesivas de un volumen dado del gradiente.

Intervalo de concentración del gradiente

La presente invención no está limitada a un intervalo de porcentaje particular de gradientes de densidad. Dicho intervalo debe determinarse en función del virus que se va a purificar, en particular, dependiendo de la densidad del virus, de las densidades de las impurezas contaminantes residuales esperadas y del tipo de separación a utilizar, ya sea isopícnica o zonal. El experto sabrá cómo asociar con un virus dado (con una densidad determinada) el intervalo de porcentaje apropiado de un gradiente de densidad, asegurando que la parte lineal del gradiente preformado abarque el porcentaje de densidad correspondiente al porcentaje en el que el virus que va a ser purificado migrará. La presencia de un virus específico, o un antígeno viral del mismo, en un cierto intervalo dentro de un gradiente se puede monitorizar mediante técnicas estándar de detección de proteínas, tal como un análisis de transferencia Western que usa un anticuerpo específico para el antígeno viral. En el caso particular del virus de la gripe, el contenido de uno de sus antígenos de superficie, el antígeno de HA (hemaglutinina), puede controlarse mediante el ensayo SRID (inmunodifusión radial simple), que es una técnica familiar para un experto en la técnica (JM Wood et al.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood et al.: International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). Para un intervalo de porcentaje deseado dado, el experto en la técnica determinará la dilución apropiada de una solución madre de un porcentaje apropiado (p/v) necesaria para crear un gradiente lineal preformado con una linealidad apropiada para ser utilizado en el procedimiento de la presente invención. Un intervalo de gradiente típico para purificar virus es 0-55% (p/v). En una realización, el gradiente de densidad lineal preformado que se usará en el procedimiento de acuerdo con la invención, tal como un gradiente de sacarosa, tiene un intervalo de porcentaje de 0-55% (p/v).

Las soluciones madre y la solución o soluciones de dilución se pueden preparar en agua o se pueden agregar con sal en concentraciones fisiológicas (por ejemplo, NaCl) y con un tampón (por ejemplo, Tris o fosfato de sodio). Las soluciones madre y las soluciones de dilución pueden prepararse adecuadamente en una solución tamponada que comprende sal en una concentración fisiológica, tal como TBS o PBS. En una realización de la invención, las soluciones madre, tales como, por ejemplo, las soluciones madre de azúcar, en particular la sacarosa, y las soluciones de dilución se preparan en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene citrato, ya que este tipo de solución previene ventajosamente la agregación de virus durante la centrifugación.

Solución madre

Por "solución madre", se quiere decir la solución formadora de gradiente que se diluirá para proporcionar un gradiente de densidad lineal preformado en un rotor de alta capacidad de acuerdo con el procedimiento de la invención. La solución madre formadora de gradiente que se utilizará para preparar un gradiente lineal preformado de un intervalo dado X% -Y% (p/v) (siendo X el límite inferior y Y el límite superior), tal como gradiente de azúcar, es adecuadamente de un porcentaje que es igual a Y, o es mayor. Un intervalo de gradiente de azúcar típico no limitante para la purificación de virus es de 0 a 55% (p/v). Por ejemplo, si se selecciona un gradiente de azúcar de 0-55% (p/v), la solución madre de azúcar puede ser adecuadamente una solución de azúcar de 55% (p/v), o superior.

El volumen de la solución madre se selecciona para obtener un gradiente lineal preformado que alcanza el límite superior del intervalo esperado. Para un intervalo dado de X%-Y% (siendo X el límite inferior y Y el límite superior) (p/v), el volumen de la solución madre se selecciona para obtener un gradiente lineal preformado que alcance el límite superior Y% del intervalo. Los inventores observaron que la relación

"volumen de la solución madre/volumen de la solución de dilución" es un factor a tener en cuenta. La solución madre tiene adecuadamente un volumen mayor que la solución de dilución. Por ejemplo, tal relación es adecuadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 o 6:1.

- 5 El volumen de la solución madre también se selecciona de acuerdo con la capacidad del rotor. Adecuadamente, el volumen de la solución madre no excede la capacidad del rotor. En realizaciones, en las que la centrifugación se realiza por lotes, el volumen de la solución madre coincide con la capacidad del rotor. Cuando la centrifugación se realiza en un modo continuo, el volumen de la solución madre puede tener un volumen del 90% de la capacidad del rotor, o menos, adecuadamente el 80% o menos. En realizaciones, en donde la centrifugación se realiza en un modo continuo, el volumen de la solución madre formadora de gradiente varía de 40% a 80% de la capacidad del rotor, de 50% a 60% de la capacidad del rotor o es 50% de la capacidad del rotor. En realizaciones particulares, en las que el rotor es un rotor de 8 L, la solución madre formadora de gradiente tiene un volumen que varía de 3,2 L a 6,4 L, o de 4 L a 4,8 L. En una realización particular adicional, en la que el rotor es un rotor de 8 L, la solución madre formadora de gradiente tiene un volumen de 4 L.

Soluciones de dilución

- 20 La solución de dilución puede comprender sin contenido de azúcar en absoluto. Alternativamente, también puede incluir algo de azúcar, generalmente en un porcentaje inferior al porcentaje de la solución madre. Típicamente, una solución madre de un porcentaje dado se diluye en solución o soluciones de dilución antes de inyectarse en un rotor de una capacidad dada. La pendiente del gradiente lineal preformado que se utilizará en el procedimiento de acuerdo con la invención se puede ajustar adaptando la velocidad de dilución. Por lo general, cuanto más pronunciado es un gradiente, más probable es que se observe la presencia de mesetas al final o finales del gradiente.

- 30 La disminución de la tasa de dilución ayuda a reducir las mesetas al final o finales del gradiente, aumenta la extensión de la linealidad, es decir, aumenta el volumen del gradiente sobre el cual el gradiente es lineal, y hace que el gradiente lineal sea más gradual, es decir, con una pendiente más suave. La disminución de la tasa de dilución se puede lograr, por ejemplo, agregando azúcar o aumentando su porcentaje en la solución de dilución. Una opción alternativa para disminuir la tasa de dilución es proceder a una dilución múltiple.

- 35 Por "dilución múltiple", se quiere decir diluciones sucesivas. Por ejemplo, la solución madre formadora de gradiente se puede diluir progresivamente dos veces o más, es decir, diluirse en una primera solución de dilución, cuya solución madre diluida se diluye progresivamente en una segunda solución de dilución, y así sucesivamente antes de ser inyectada en el rotor. En una realización, el gradiente lineal preformado se forma diluyendo progresivamente una solución madre dada dos veces, es decir, se diluye en una primera solución de dilución dada, la solución madre diluida se diluye progresivamente en una segunda solución de dilución dada antes de ser inyectada en el rotor. En realizaciones particulares donde se realiza tal dilución múltiple, las soluciones de dilución no comprenden nada de azúcar y posiblemente tengan el mismo volumen.

- 45 El volumen de las soluciones de dilución usadas para crear un gradiente lineal preformado para usarse en el procedimiento de acuerdo con la invención puede variar. En particular, el volumen depende del volumen de la solución madre formadora de gradiente y de la tasa de dilución objetivo, es decir, de la pendiente esperada del gradiente lineal preformado. Por ejemplo, una solución de dilución dada puede tener adecuadamente un volumen de al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30% o al menos el 50% de la solución madre.

- 50 En una realización, para un gradiente esperado de un intervalo X% -Y% (p/v) (siendo X el límite inferior y siendo Y el límite superior), primero se diluye progresivamente una solución madre que tiene un porcentaje Y% en una solución de dilución que tiene un volumen del 25% del volumen de la solución madre, la solución madre diluida se diluye progresivamente en una segunda solución de dilución que tiene un volumen del 25% del volumen de la solución madre.

- 55 Típicamente, los diferentes recipientes, cada uno de los cuales comprende la solución madre formadora de gradiente y la solución o soluciones de dilución, y el rotor que acomodará el gradiente lineal preformado se conectan sucesivamente entre sí, estando el último recipiente conectado al rotor por medio de una bomba. Dicha bomba, una vez encendida, crea un vacío que resulta en la aspiración de la solución madre en la primera solución de dilución, que a su vez se aspira y, por lo tanto, se diluye progresivamente, en la siguiente solución de dilución, y así sucesivamente, dependiendo de cuántas soluciones de dilución se utilizan, antes de que la solución diluida final se inyecte en el rotor. La carga de la bomba se elige en un intervalo apropiado para no perturbar el gradiente obtenido y formado por dilución progresiva. Un ejemplo no limitativo de carga de la bomba para ser utilizado adecuadamente en el procedimiento de acuerdo con la invención varía de 100 a 200 mL/min, adecuadamente es de 160 mL/min.

65

Centrifugación

Las condiciones de centrifugación son condiciones estándar. Está dentro de las capacidades de la persona experta determinar las condiciones apropiadas, tal como por ejemplo, la fuerza centrífuga, el tiempo de operación, la caudal o el tiempo de estratificación, si es apropiado. La determinación de dichas condiciones deberá tener en cuenta el tipo de fluido que contiene el virus a purificar, el tipo de virus, el tipo de impurezas contaminantes, el modo de centrifugación, ya sea por lotes o en forma continua, el tipo de separación, ya sea zonal o isopícnico. En particular, la información proporcionada en las instrucciones del fabricante sobre cómo utilizar rotores y centrifugas puede guiar al experto en la selección de las condiciones de centrifugación apropiadas. Como se describió anteriormente, la persona experta puede usar cualquier técnica estándar de detección de proteínas, tales como un análisis de transferencia Western que usa un anticuerpo específico para un antígeno viral, o en el caso particular del virus de la gripe, el ensayo SRID para detectar la presencia del virus y/o monitorizar si se obtiene un rendimiento aceptable de virus y/o pureza del virus después de la centrifugación en un gradiente de densidad lineal preformado de la invención.

La centrifugación puede realizarse en un modo continuo, en un modo semicontinuo o en lotes sucesivos. En una realización, la centrifugación durante el procedimiento de purificación de un virus de acuerdo con la invención se realiza en un modo continuo. La centrifugación en un modo continuo se usa ventajosamente a gran escala, cuando se necesitan procesar y purificar grandes volúmenes de fluidos que contienen virus.

Dependiendo de si la centrifugación se realiza en un modo por lotes o en un modo continuo, la carga del gradiente lineal preformado puede variar. En el modo por lotes, el gradiente lineal preformado se puede cargar en un rotor vacío en reposo. En tales realizaciones, el volumen cargado puede coincidir con la capacidad del rotor. Alternativamente, cuando la centrifugación se realiza en un modo continuo, el rotor puede precargarse con una solución tampón apropiada en reposo, y mientras se inyecta el gradiente lineal preformado en el rotor aún en reposo, dicha solución tampón se reemplaza progresivamente con el gradiente lineal preformado. Tal relleno previo presenta la ventaja de evitar la formación de burbujas. En algunas realizaciones, en las que la centrifugación se realiza en un modo continuo, el volumen del gradiente lineal preformado que se inyecta en el rotor corresponde al volumen de la solución madre formadora de gradiente, es decir, la inyección se detiene cuando el recipiente que contiene la solución madre está vacío.

Una vez que el gradiente lineal preformado se carga en el rotor, el fluido que contiene el virus se puede cargar en el gradiente en reposo, y la centrifugación se inicia después de que el fluido que contiene el virus se haya cargado en el gradiente. Dichas realizaciones se llevan a cabo adecuadamente cuando la centrifugación se realiza por lotes. Alternativamente, la centrifugación puede iniciarse después de que el gradiente lineal preformado se carga en el rotor, y una vez que se alcanza la fuerza centrífuga apropiada, el fluido que contiene el virus puede cargarse en el gradiente. Dichas realizaciones alternativas se implementan adecuadamente cuando la centrifugación se realiza en un modo continuo.

La fuerza centrífuga apropiada puede ser elegida por el experto en la técnica y puede depender del tipo de rotor y centrifuga utilizados. Como ejemplos no limitativos, se aplica una fuerza centrífuga que varía de al menos 20.000 g a 200.000 g, adecuadamente de 90.000 g a 150.000 g, adecuadamente variando de 100.000 a 120.000 g, en el rotor de la centrifuga. Una vez que se haya procesado todo el fluido que contiene el virus y se haya permitido un tiempo de operación adecuado, se detiene la centrifugación y se recogen las fracciones de gradiente que contienen el virus.

Fluido que contiene virus

El fluido que contiene el virus a purificar en el sentido de la invención no se limita a fluidos crudos, sino que también contempla fluidos que comprenden virus parcialmente purificados. Por ejemplo, la purificación puede incluir un número de diferentes etapas de filtración, concentración y/u otras etapas de separación, tales como ultrafiltración, centrifugación, cromatografía (tal como cromatografía de intercambio iónico) y etapas de adsorción en una variedad de combinaciones. Puede requerirse una etapa de clarificación para separar el virus del material celular contaminante, en particular, las células flotantes o los desechos celulares, o de los contaminantes derivados de los huevos que se originan en los fluidos alantoicos.

El término "crudo" en el sentido de la presente invención significa que no se ha realizado ninguna purificación en el fluido que contiene el virus después de su recolección y, por lo tanto, puede contener cualquier tipo de contaminantes en diferentes grados. Como ejemplo no limitativo, cuando el virus se ha producido mediante la inoculación de células con dicho virus y cuando, después de la infección, se liberan virus recién formados en el medio de cultivo celular o sobrenadante, dicho medio de cultivo, que comprende el virus, designa un ejemplo de un fluido crudo. Otro ejemplo de un fluido crudo que se puede citar es el fluido alantoico recogido después de la inoculación del virus en huevos embrionarios y el cultivo del virus. Por consiguiente, los términos "parcialmente purificado" abarca cualquier estado de purificación intermedio, es decir, un fluido que ha sido objeto de cualquier etapa de purificación, por ejemplo, cualquiera de las etapas mencionadas anteriormente, individualmente o en cualquier combinación.

En una realización, el fluido que contiene virus de acuerdo con la invención es el medio de cultivo recogido después de la infección de las células con el virus de interés, tal como el virus de la gripe, por ejemplo, y su liberación en el medio de cultivo. En otra realización, el fluido que contiene virus según la invención es el fluido alantoico recogido después de la inoculación de huevos con un virus de interés, tal como el virus de la gripe.

En otra realización adecuada, el fluido que contiene virus de acuerdo con la invención se ha clarificado antes de añadirse a un gradiente de densidad lineal preformado de acuerdo con la invención. Esta clarificación se puede realizar por filtración. Alternativamente, la centrifugación y/o la filtración pueden combinarse juntas, en cualquier orden, para lograr el nivel de clarificación deseado de la preparación del virus. Aunque no es necesario, se puede llevar a cabo un proceso de filtración múltiple, tal como un proceso de dos o tres etapas que consiste, por ejemplo, en la eliminación secuencial y progresiva de las impurezas de acuerdo con su tamaño, utilizando filtros con un tamaño de poro nominal apropiado, en particular, filtros con un tamaño de poro nominal decreciente, lo que permite comenzar a eliminar grandes precipitados y residuos celulares. Además, las operaciones de una sola etapa que emplean un filtro relativamente impermeable o una centrifugación también se pueden usar para la clarificación. De manera más general, cualquier enfoque de clarificación que incluya, entre otros, filtración terminal, filtración en profundidad, microfiltración o centrifugación, que proporcione un filtrado de claridad adecuada para no ensuciar la membrana y/o las resinas en etapas posteriores, será aceptable para uso en la etapa de clarificación de la presente invención.

Aunque no es necesario, puede ser adecuado concentrar el fluido que contiene el virus antes de cargarlo en el gradiente de densidad lineal preformado de acuerdo con la invención, con el fin de reducir el volumen de fluido a cargar. Por consiguiente, la presente invención también contempla un fluido que contiene virus que se ha concentrado, antes de cargarlo en el gradiente de densidad. Por lo tanto, el fluido que contiene virus puede ser sometido a ultrafiltración (a veces denominada diafiltración cuando se usa para el intercambio del tampón), por ejemplo, en una membrana de 750 kD, para concentrar el virus y/o el intercambio de tampón. Esta etapa es particularmente ventajosa cuando el virus a purificar se diluye, como es el caso cuando se reúne el virus recogido recolectada por perfusión durante unos pocos días después de la inoculación. El proceso utilizado para concentrar el virus puede incluir cualquier proceso de filtración en el que la concentración del virus aumenta al obligar a que el diluyente pase a través de un filtro de tal manera que el diluyente se elimine de la suspensión del virus, mientras que el virus no puede pasar a través del filtro, y, por lo tanto permanece en forma concentrada en la preparación del virus.

La ultrafiltración puede comprender diafiltración, que es una forma ideal para la eliminación e intercambio de sales, azúcares, disolventes no acuosos, eliminación de material de bajo peso molecular, de cambio rápido de ambientes iónicos y/o de pH. Los microsolutos se eliminan de manera más eficiente agregando solvente a la solución que se está ultrafiltrando a una velocidad igual a la velocidad de ultrafiltración. Esto lava las microespecies de la solución a un volumen constante, aislando el virus retenido. La diafiltración es particularmente ventajosa cuando una etapa posterior requiere que se use un tampón específico para obtener una reacción óptima. La concentración y la diafiltración pueden implementarse en cualquier etapa adecuada del proceso de purificación, cuando se desee eliminar los compuestos no deseados, como la sacarosa, después de una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, o tal como el formaldehído, después de una etapa de inactivación del virus con formaldehído. El sistema se compone de tres corrientes de proceso distintas: la solución de alimentación (que comprende el virus), el permeado y el retenido. Dependiendo de la aplicación, se pueden usar filtros con diferentes tamaños de poro. La composición del filtro puede ser, pero no se limita a, celulosa regenerada, polietersulfona, polisulfona o derivados de los mismos. Las membranas pueden ser hojas planas (también llamadas pantallas planas) o fibras huecas.

En una realización, el fluido que contiene virus se ha concentrado mediante ultrafiltración/diafiltración antes de cargarlo en el gradiente de densidad lineal preformado usado en el procedimiento de la presente invención.

El procedimiento de purificación de acuerdo con la presente invención puede incluir etapas adicionales, además de la etapa de ultracentrifugación en gradiente de densidad como se reivindica en el presente documento. Estas etapas pueden implementarse antes o después de proceder a dicha etapa de ultracentrifugación en gradiente de densidad. Específicamente, la preparación del virus obtenido después de usar la etapa de ultracentrifugación en gradiente de densidad de acuerdo con la presente invención puede purificarse adicionalmente, mediante la implementación de cualquiera de las técnicas de purificación de virus citadas anteriormente, tales como filtración, ultracentrifugación (incluyendo ultracentrifugación en gradiente), cromatografía (tal como cromatografía de intercambio iónico) y etapas de adsorción en una variedad de combinaciones.

En una realización, el procedimiento de la presente invención comprende además al menos una etapa seleccionada del grupo de: filtración, ultrafiltración/diafiltración, ultracentrifugación y cromatografía, o cualquier combinación de las mismas. Dependiendo del nivel de pureza que se desee, las etapas anteriores se pueden combinar de cualquier manera.

Alternativamente, también es posible purificar adicionalmente virus por cromatografía, incluyendo de intercambio iónico, aniónica o catiónica, cromatografía de exclusión por tamaño, tal como filtración en gel o permeación en gel, cromatografía de interacción hidrofóbica, hidroxiapatita o cualquier combinación de las mismas. Como se mencionó anteriormente, las etapas de cromatografía se pueden implementar en combinación con otras etapas de purificación, como la ultracentrifugación en gradiente de densidad.

Huevos

Los fluidos que contienen virus, tales como el virus de la gripe, de acuerdo con la invención, pueden derivarse del procedimiento de huevo embrionario convencional, haciendo crecer el virus de la gripe en huevos y purificando el fluido alantoico recogido.

Células

El virus a purificar de acuerdo con el procedimiento de la invención puede producirse en cultivo celular. El procedimiento de acuerdo con la presente invención es aplicable a cualquier tipo de células, ya sean células adherentes cultivadas en microportadores o células en suspensión.

Las células se pueden cultivar de varias maneras, como por ejemplo, utilizando sistemas de lotes, de lotes alimentados o continuos, como los sistemas de perfusión. La perfusión es particularmente ventajosa cuando se desea una alta densidad celular. La alta densidad celular puede ser particularmente ventajosa para maximizar la cantidad de virus que puede producirse a partir de un tipo de célula dado.

Las células utilizadas para producir un fluido que contiene virus para purificar de acuerdo con el procedimiento de la invención pueden ser, en principio, cualquier tipo deseado de células animales que puedan cultivarse en cultivo celular y que puedan soportar la replicación del virus. Pueden ser células primarias o líneas celulares continuas. Se prefieren líneas celulares genéticamente estables. Las células de mamífero son particularmente adecuadas, por ejemplo, células humanas, de hámster, de ganado, de mono o de perro. Alternativamente, las células de insecto también son adecuadas, tales como, por ejemplo, células SF9 o células Hi-5.

Se conocen en la técnica varias líneas celulares de mamífero e incluyen PER.C6, células HEK, células de riñón embrionario humano (células 293), células HeLa, células CHO, células Vero y células MDCK.

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

Las líneas celulares de mamífero adecuadas para el crecimiento del virus de la gripe incluyen células MDCK, células Vero o células PER.C6. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, a través de la colección de la American Type Cell Culture (ATCC).

Alternativamente, las líneas celulares para uso en la invención pueden derivarse de fuentes aviares, tales como pollo, pato, ganso, codorniz o faisán. Las líneas celulares aviares pueden derivarse a partir de una variedad de etapas de desarrollo que incluyen embriones, pollos y adultos. En particular, las líneas celulares pueden derivarse de células embrionarias, tales como fibroblastos embrionarios, células germinales u órganos individuales, tales como neuronas, cerebro, retina, riñón, hígado, corazón, músculo o tejidos extraembrionarios y membranas que protegen el embrión. Se pueden usar fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Los ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células madre embrionarias aviares (documento WO01/85938) y células de retina de pato (documento WO05/042728). En particular, la línea celular EB66® derivada de células madre embrionarias de pato se contempla en la presente invención. Otras células madre embrionarias aviares adecuadas incluyen la línea celular EBx® derivada de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 (documento WO2006/108846). Esta línea celular EBx presenta la ventaja de ser una línea celular estable cuyo establecimiento se ha producido naturalmente y no requirió ninguna modificación genética, química o viral. Estas células aviares son particularmente adecuadas para el crecimiento de virus de la gripe.

Según una realización particular, el procedimiento de la invención, cuando el virus a purificar se produce en un cultivo celular, utiliza células EB66®.

Las condiciones de cultivo celular (temperatura, densidad celular, valor de pH, etc.) son variables en un intervalo muy amplio debido a la idoneidad de las células empleadas y pueden adaptarse a los requisitos de detalles particulares de condiciones de crecimiento de virus. Está dentro de la capacidad del experto en la técnica determinar las condiciones de cultivo apropiadas, ya que el cultivo celular está ampliamente documentado en la técnica (véase, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores

(1973) y RI Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, cuarta edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

5 Antes de la recolección, la infección celular puede durar de 2 a 10 días. El momento óptimo para cosechar el virus producido por las células generalmente se basa en la determinación del pico de infección. Por ejemplo, el CPE (efecto citopático) se mide al monitorizar los cambios morfológicos que ocurren en las células huésped después de la inoculación del virus, incluido el redondeo celular, la desorientación, la hinchazón o el encogimiento, la muerte y el desprendimiento de la superficie. La detección de un antígeno viral específico también puede monitorizarse mediante técnicas estándar de detección de proteínas, como un análisis de transferencia Western. La cosecha se puede recolectar cuando se alcanza el nivel de detección deseado. En el caso particular del virus de la gripe, el contenido de HA se puede controlar en cualquier momento después de la inoculación de las células con el virus, mediante el ensayo SRD (Wood, JM, et al., (1977). J. Biol. Standard. 5, 237-247), que es una técnica familiar para una persona experta en la técnica. Además, el ensayo SRD también se puede usar para determinar el intervalo óptimo de densidad celular requerido para obtener un rendimiento de virus optimizado.

Composiciones inmunogénicas

20 Al final de la purificación, la preparación de virus obtenida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede someterse adecuadamente a filtración estéril, como es común en los procesos para materiales de calidad farmacéutica, tales como composiciones inmunogénicas o vacunas, y conocidas por el experto en la materia. Dicha filtración estéril se puede realizar, por ejemplo, adecuadamente filtrando la preparación a través de un filtro de 0,22 µm. Después de la preparación estéril, el virus o los antígenos virales están listos para uso clínico, si se desea. El virus purificado de acuerdo con el procedimiento de la invención puede formularse adecuadamente para incluirse en una composición inmunogénica, tal como en una vacuna. Por consiguiente, un procedimiento para la preparación de una vacuna, tal como una vacuna contra el virus de la gripe, que comprende al menos la etapa de purificar un virus para ser utilizado como un antígeno en la vacuna de acuerdo con el procedimiento de la invención y formular dicho virus purificado en una vacuna también se contempla en la presente invención.

30 Las composiciones inmunogénicas, en particular vacunas, pueden formularse generalmente en forma de subvirión, por ejemplo, en la forma de un virus dividido, donde la envoltura lipídica se ha disuelto o se ha roto, o en forma de una o más proteínas virales purificadas (vacuna de una subunidad). Como alternativa, las composiciones inmunogénicas pueden incluir un virus completo, por ejemplo, un virus completo atenuado vivo, o un virus completo inactivado.

40 Los procedimientos para dividir virus, tales como virus de gripe, son bien conocidos en la técnica (documento WO02/28422). La división del virus se lleva a cabo rompiendo o fragmentando el virus completo, ya sea infeccioso (de tipo silvestre o atenuado) o no infeccioso (inactivado) con una concentración perturbadora de un agente de división. Los agentes de división generalmente incluyen agentes capaces de romper y disolver las membranas lipídicas. Tradicionalmente, el virus de la gripe dividido se producía mediante un tratamiento con solvente/detergente, tal como tri-n-butil fosfato o dietiléter en combinación con Tween^{MR} (conocido como división con "Tween-éter") y este proceso todavía se utiliza en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de separación que se emplean ahora incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo desoxicolato de sodio. Los detergentes que se pueden usar como agentes de división incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, laurilsulfato de sodio (SLS), taurodesoxicolato o detergentes no iónicos tales como Tween o Triton X-100, o una combinación de dos o más detergentes.

50 El proceso de división se puede llevar a cabo como un proceso discontinuo, continuo o semicontinuo. Cuando se implementa en lotes, el virus dividido puede requerir una etapa adicional de purificación, tal como una etapa de cromatografía. No es necesario implementar una etapa de división como tal, ya que es posible realizar la división simultáneamente con una etapa de purificación. Por ejemplo, se puede agregar un detergente al gradiente lineal preformado destinado a purificar proteínas virales mediante ultracentrifugación, como se describió anteriormente. En una realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende además una etapa de división realizada en lotes con un detergente, en particular, Triton X-100.

60 Como alternativa, la división puede ocurrir antes o después de la etapa de centrifugación en gradiente de densidad como se reivindica en el presente documento.

65 Para la seguridad de las vacunas, puede ser necesario reducir la capacidad de infección de la suspensión del virus a lo largo de diferentes etapas del proceso de purificación. La infectividad de un virus está determinada por su capacidad para replicarse en una línea celular. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención, opcionalmente, incluye al menos una etapa de inactivación de virus. La inactivación se puede realizar utilizando, por ejemplo, beta-propiolactona (BPL), formaldehído o UV, o cualquier combinación de los mismos, que puede tener lugar antes o después de la etapa de centrifugación en gradiente de

densidad de la invención. En una realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende además una etapa de inactivación, realizada con BPL por ejemplo, etapa que tiene lugar adecuadamente después de la ultracentrifugación en gradiente de densidad de la invención. Las condiciones de inactivación viral pueden variar y se determinarán, en particular, evaluando la infectividad del virus residual midiendo la dosis infecciosa de cultivo tisular (TCID₅₀/mL).

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

En una realización, se contemplan composiciones inmunogénicas, que comprenden un virus o antígeno viral de la presente invención mezclados con un vehículo farmacéutico adecuado. En una realización específica, comprenden un adyuvante.

Virus de la gripe

Los virus o antígenos virales pueden derivarse de un Ortomixovirus, tal como el virus de la gripe. Los antígenos de Ortomixovirus se pueden seleccionar de una o más de las proteínas virales, que incluyen hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), una o más de la transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos particularmente adecuados incluyen HA y NA, las dos glicoproteínas de superficie que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de gripe.

El virus de la gripe puede seleccionarse del grupo de virus de la gripe humana, virus de la gripe aviar, virus de la gripe equina, virus de la gripe porcina, virus de la gripe felina. El virus de la gripe se selecciona más particularmente en las cepas A, B y C, preferiblemente de las cepas A y B.

Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas de gripe interpandémicas (anuales o estacionales). Alternativamente, los antígenos de la influenza pueden derivarse de cepas con el potencial de causar un brote pandémico (es decir, cepas de gripe con hemaglutinina nueva en comparación con la hemaglutinina en cepas actualmente en circulación, o cepas de gripe que son patógenas en sujetos aviarios y tienen el potencial de ser transmitidas horizontalmente en la población humana, o cepas de gripe que son patógenas para los humanos). Dependiendo de la estación en particular y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, los antígenos de la gripe pueden derivarse de uno o más de los siguientes subtipos de hemaglutinina: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Preferiblemente, el virus de la gripe o antígenos del mismo son de los subtipos H1, H2, H3, H5, H7 o H9. En una realización, los virus de la gripe son de los subtipos H2, H5, H6, H7 o H9. En una realización alternativa, los virus de la gripe son de los subtipos H1, H3 o B.

Composiciones inmunogénicas del virus de la gripe

El procedimiento de purificación de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para preparar composiciones inmunogénicas del virus de la gripe, incluidas las vacunas. Varias formas de virus de la gripe están disponibles actualmente. Generalmente se basan en virus vivos o virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden basarse en viriones completos, viriones divididos o antígenos de superficie purificados (incluido el HA). Los antígenos de la gripe también se pueden presentar en forma de virosomas (partículas liposomales similares a virus libres de ácido nucleico).

Los procedimientos de inactivación de virus y los procedimientos de división se han descrito anteriormente y son aplicables al virus de la gripe.

Las cepas del virus de la gripe para uso en vacunas cambian de una estación a otra. En el período interpandémico actual, las vacunas suelen incluir dos cepas de gripe A y una cepa de gripe B. Las vacunas trivalentes son típicas, pero la valencia más alta, como la cuadrivalencia, también se contempla en la presente invención. La invención también puede usar HA de cepas pandémicas (es decir, cepas para las que el receptor de la vacuna y la población humana general no tienen inmunidad), y las vacunas contra la influenza para las cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden basarse en una vacuna trivalente normal complementada con una cepa pandémica.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antígeno o antígenos de una o más cepas del virus de la gripe, incluido el virus de la gripe A y/o el virus de la gripe B. En particular, una vacuna trivalente que incluye antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B está contemplada por la presente invención. Alternativamente, una vacuna cuadrivalente que incluye antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y dos cepas del virus de la gripe B también está dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones de la invención no se limitan a composiciones monovalentes, es decir, que incluyen solo

un tipo de cepa, es decir, solo cepas estacionales o solo cepas pandémicas. La invención también abarca composiciones multivalentes que comprenden una combinación de cepas estacionales y/o de cepas pandémicas. En particular, una composición cuadrivalente, que puede estar adyuvada, que comprende tres cepas estacionales y una cepa pandémica cae dentro del alcance de la invención. Otras composiciones que entran dentro del alcance de la invención son una composición trivalente que comprende dos cepas A y una cepa B, tales como las cepas H1N1, H3N2 y B, y una composición cuadrivalente que comprende dos cepas A y dos cepas B de un linaje diferente, tal como H1N1, H3N2, B/Victoria y B/Yamagata.

La HA es el principal inmunógeno en las vacunas de gripe inactivadas actuales, y las dosis de vacuna se estandarizan por referencia a los niveles de HA, típicamente medidos por SRD. Las vacunas existentes típicamente contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque se pueden usar dosis más bajas, por ejemplo, para niños, o en situaciones de pandemia, o cuando se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionarias como la mitad (es decir, 7,5 µg de HA por cepa) o un cuarto, ya que tienen dosis más altas, en particular, dosis de 3x o 9x. Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, en particular, entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Las dosis particulares incluyen aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5 µg por cepa, aproximadamente 3,8 µg por cepa y aproximadamente 1,9 µg por cepa.

Una vez que se ha purificado un virus de la gripe para una cepa particular, se puede combinar con virus de otras cepas para hacer una vacuna trivalente, por ejemplo, como se describió anteriormente. Es más adecuado tratar cada cepa por separado y mezclar volúmenes monovalentes para obtener una mezcla multivalente final, en lugar de mezclar virus y degradar el ADN y purificarlo a partir de una mezcla multivalente.

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

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

La emulsión de aceite en agua comprende opcionalmente un tocol. Los tocoles son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento EP0382271. Un tocol adecuado es el alfa-tocoferol o un derivado del mismo, como el succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). Dicho tocol está presente adecuadamente en la composición adyuvante en una cantidad del 0,25% al 10% (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica.

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

Ejemplo I: Formación del gradiente para un gradiente autogenerador para rotor de 3,2 L

La ultracentrífuga de flujo continuo era una centrífuga K11 que utiliza un rotor K3 (capacidad de 3,2 L) de Alfa Wasserman. El rotor K3/3,2 L se llenó con una solución tampón de PBS/Citrato 125 mM. Una vez que se llenó, se encendió la centrífuga mientras se mantenía la circulación del tampón en un circuito cerrado para expulsar todo el aire del rotor. Luego se detuvo la centrífuga y la mitad del volumen (1,6 L) de la solución tampón de PBS/Citrato 125 mM se reemplazó por una solución de PBS/Citrato 125 mM que contenía 55% de sacarosa. Después del reemplazo, el rotor fue primero acelerado lentamente a 4.000 rpm y luego a una velocidad final de 35.000 rpm. A medida que el rotor fue acelerado gradualmente a 4.000 rpm, se formó un gradiente lineal de 0% a 55% de sacarosa dentro del rotor. Después de la formación, se recogieron fracciones sucesivas de 100 mL del gradiente y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría (% Brix) para verificar la linealidad del gradiente. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Resultados - Conclusiones

El gradiente obtenido fue sustancialmente lineal, es decir, lineal sobre la mayor parte de su volumen.

Ejemplo II: Formación del gradiente para un gradiente autogenerador para rotor de 8 L

Se aplicó el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo I para la formación de un gradiente en un rotor de 8 L. La ultracentrífuga de flujo continuo era una centrífuga K10 que utiliza un rotor K10 (capacidad de 8 L) de Alfa Wasserman. El rotor K10/8 L se llenó con una solución tampón de PBS/Citrato 125 mM. Una vez que se llenó, se encendió la centrífuga mientras se mantenía la circulación del tampón en un circuito cerrado para expulsar todo el aire del rotor. Luego se detuvo la centrífuga y se reemplazó la mitad del volumen (4 L) de la solución tampón de PBS/Citrato 125 mM por una solución de PBS/Citrato 125 mM que contenía 55% de sacarosa. Después del reemplazo, el rotor fue primero acelerado lentamente a 4.000 rpm y luego a una velocidad final de 35.000 rpm. Después de la formación, se recogieron fracciones sucesivas de 250 mL del gradiente y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría (% Brix) para verificar la linealidad del gradiente. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Resultados - Conclusiones

No se obtuvo un gradiente lineal. El gradiente resultante fue un gradiente escalonado: se observó una primera meseta alrededor del 55% de sacarosa en los primeros 3,5 L del gradiente y se observó una segunda meseta alrededor del 5% de sacarosa durante los últimos 3 L del gradiente. La parte lineal del gradiente solo se extendió de 3,5 L a 5 L, es decir, el gradiente fue lineal sobre 1,5 L, es decir, solo sobre el 20% de su volumen total.

Ejemplo III: Formación del gradiente para un gradiente preformado para rotor de 8 L

III.1 Se usaron la misma centrífuga y rotor que en el Ejemplo II. Se utilizaron 3 recipientes. El primero (recipiente 1) contenía 4 L de PBS/Citrato 125 mM que contenía 55% de sacarosa. El segundo (recipiente 2) y el tercer (recipiente 3) contenían cada uno 1 L de tampón de PBS/Citrato 125 mM. El recipiente 1 se conectó al recipiente 2 que se conectó al recipiente 3. Los líquidos en los recipientes 2 y 3 se mezclaron con un agitador magnético a una velocidad de 90 rpm. El recipiente 3 se conectó a través de una bomba a la parte inferior del rotor K10/8 L que se llenó con tampón de PBS/Citrato 125 mM. Cuando la bomba se encendió operando a razón de 160 mL/min, se creó un vacío en los recipientes 2 y 3 y la sacarosa del recipiente 1 se diluyó primero en el recipiente 2, cuyo contenido se diluyó aún más en el recipiente 3, cuyo contenido se inyecta en el rotor (Figura 3A). Cuando el recipiente 1 estaba vacío, el gradiente se formó en el rotor y se encendió la centrífuga. La centrifugación se realizó a 35.000 rpm. Después de la formación, se recogieron fracciones sucesivas de 250 mL del gradiente y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría (% Brix) para verificar la linealidad del gradiente. Los resultados se muestran en la Figura 3B.

Resultados - Conclusiones

Utilizando el procedimiento anterior basándose en la dilución progresiva sucesiva de una solución madre única de 55% de sacarosa antes de la inyección en un rotor de 8 L, se obtuvo un gradiente que es sustancialmente lineal, es decir, lineal sobre la mayor parte de su volumen. En particular, no se observó una meseta significativa en cada extremo del gradiente (aproximadamente 55% de sacarosa y 5% de sacarosa), a diferencia de las dos mesetas observadas en la Figura 2 a dichos porcentajes de sacarosa. La parte lineal del gradiente se extendió desde aproximadamente 1 L hasta aproximadamente 7 L, es decir, el gradiente fue lineal sobre 6 L, es decir, más del 75% de su volumen total. Los inventores también verificaron la linealidad del gradiente antes de la centrifugación y observaron una curva similar a la que se presenta en la Figura 3B.

III.2 Se usaron la misma centrífuga y rotor que en el Ejemplo II. Se utilizaron 2 recipientes. El primero (recipiente 1) contenía 4 L de PBS/Citrato 125 mM que contenía 55% de sacarosa. El segundo (recipiente 2) contenía 1 L de tampón de PBS/Citrato 125 mM. El recipiente 1 se conectó al recipiente 2 que se conectó a través de una bomba a la parte inferior del rotor K10/8 L que se llenó con tampón de PBS/Citrato 125 mM. El líquido en el recipiente 2 se mezcló con un agitador magnético a una velocidad de 90 rpm. Cuando la bomba se encendió operando a razón de 160 mL/min, se creó un vacío en el recipiente 2 y la sacarosa del recipiente 1 se diluyó en el recipiente 2, cuyo contenido se inyectó en el rotor (Figura 4A). Cuando el recipiente 1 estaba vacío, el gradiente se formó en el rotor y se encendió la centrífuga. La centrifugación se realizó a 35.000 rpm. Después de la formación, se recogieron fracciones sucesivas de 250 mL del gradiente y se analizó su contenido de sacarosa mediante refractometría (% Brix) para verificar la linealidad del gradiente. Los resultados se muestran en la Figura 4B.

Resultados - Conclusiones

Usando el procedimiento anterior que se basa en la dilución progresiva de una solución madre única de 55% de sacarosa antes de la inyección en un rotor de 8 L, se obtuvo un gradiente que es lineal sobre los primeros 5 L de su volumen, es decir, más del 62% de su volumen total. Se observó una meseta al 5% de sacarosa en los últimos 3 L del gradiente, es decir, que representa aproximadamente el 40% de su volumen total. Los inventores también verificaron la linealidad del gradiente antes de la centrifugación y observaron una curva

similar a la que se presenta en la Figura 4B.

Ejemplo IV: Rendimiento y pureza del virus

5 Se formó un gradiente lineal de sacarosa del 0-55% en un rotor K3/3,2 L como se describe en el Ejemplo I o en un rotor K10/8 L como se describe en el Ejemplo III.1. Una vez que la centrífuga alcanzó un valor de velocidad de 35.000 rpm, se cargó en cada rotor un fluido que contenía virus de la gripe completo derivado de un cultivo celular para la purificación del virus. 17 L de dicho fluido por litro de rotor se cargaron en el rotor de 3,2 L y 35 L del mismo fluido por litro de rotor se cargaron en el rotor de 8 L con un tiempo de estratificación de 1 h. El virus completo purificado se agrupó a partir de las fracciones de gradiente correspondientes a un porcentaje de sacarosa que oscila entre el 23% y el 50% (rotor de 3,2 L) o entre el 11% y el 42% (rotor de 8 L). Estos intervalos se han determinado con base en los perfiles de SDS-PAGE y del análisis de transferencia Western utilizando anticuerpos anti-HA. El contenido de proteína HA (hemaglutinina) se evaluó mediante un ensayo SRD (como se describe en el Ejemplo V) antes y después de la centrifugación, de modo que se pudiera calcular el porcentaje de "recuperación de HA" después de la etapa de centrifugación en gradiente de sacarosa. El porcentaje de "pureza" representa el porcentaje de proteína HA sobre el total de proteínas obtenidas al final de la centrifugación. El porcentaje de "remoción de proteínas" representa la eliminación de proteínas totales más allá de la etapa de centrifugación en gradiente de sacarosa. La concentración total de proteínas se evaluó mediante el procedimiento de Lowry antes y después de la centrifugación, de modo que se pudiera calcular el porcentaje de "pureza" y el porcentaje de "remoción de proteínas" después de la etapa de centrifugación en gradiente de sacarosa. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1 - Rendimiento y pureza del virus después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

	Rotor de 3,2 L	Rotor de 8 L
Recuperación de HA (%)	73	70
Pureza (%)	21	24
Remoción de proteínas (%)	26	30

25 Resultados - Conclusiones

El procedimiento para crear un gradiente de sacarosa lineal preformado en un rotor de alta capacidad de 8 L permite obtener el virus de la gripe (después de la purificación por centrifugación) con un rendimiento similar y un nivel de pureza similar al de utilizar un rotor más pequeño de 3,2 L. Dicho resultado indica que, con dicho procedimiento, la purificación del virus mediante centrifugación en gradiente de densidad puede ampliarse reduciendo el número de equipos/procedimientos requeridos, sin impacto sobre la calidad o cantidad del producto (rendimiento y pureza del virus).

Ejemplo V: procedimiento SRD utilizado para medir el contenido de HA

35 Las placas de vidrio (12,4 - 10 cm) se recubrieron con un gel de agarosa que contenía una concentración de suero de HA contra la gripe recomendado por NIBSC. Después de que el gel se asentó, se perforaron 72 pocillos de muestra (3 mm de diámetro) en la agarosa. Se cargaron 10 µl de diluciones apropiadas de la referencia y la muestra en los pocillos. Las placas se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25°C) en una cámara húmeda. Después de eso, las placas se empaparon durante la noche con solución de NaCl y se lavaron brevemente en agua destilada. El gel se prensó y se secó. Cuando estaban completamente secas, las placas se tiñeron en una solución de Azul Brillante de Coomassie durante 10 minutos y se destiñeron dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que las zonas teñidas claramente definidas se hicieron visibles. Después de secar las placas, se midió el diámetro de las zonas teñidas que rodean los pocillos de antígeno en dos direcciones en ángulos rectos. Alternativamente se puede utilizar equipo para medir la superficie. Se construyeron curvas de dosis-respuesta de las diluciones de antígenos contra la superficie y los resultados se calcularon de acuerdo con los procedimientos de análisis de la relación de pendiente estándar (Finney, DJ (1952). Statistical Methods in Biological Assay. Londres: Griffin, citado en: Wood, JM , et al (1977). J. Biol. Standard. 5, 237-247).

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de un virus que comprende al menos las siguientes etapas:
 - 5 a) obtener un fluido que contiene virus,
 - b) proporcionar un gradiente de densidad lineal preformado de un intervalo dado X% -Y% (v/p) (siendo X el límite inferior y Y el límite superior) en un rotor de centrífuga con una capacidad de al menos 8 L,
 - c) agregar el fluido al gradiente de densidad lineal preformado,
 - d) centrifugar para separar el virus de las impurezas contaminantes, y
 - 10 e) recolectar las fracciones que comprenden el virus purificado,

en el que la parte lineal del gradiente del intervalo dado X%-Y% abarca el porcentaje de densidad correspondiente al porcentaje, en el gradiente, en el que el virus que se purificará migrará.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la separación es isopícnica.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el gradiente de densidad lineal preformado de la etapa b) es lineal en al menos 30%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos el 90% de su volumen total o es lineal sobre la totalidad de su volumen.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el gradiente de densidad lineal preformado de la etapa b) comprende mesetas en sus extremos cuyo volumen agregado no excede del 70%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, o 5% de su volumen total.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el gradiente de densidad lineal preformado de la etapa b) se forma diluyendo una solución madre formadora de gradiente antes de la inyección en el rotor.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la solución madre formadora de gradiente es una solución al Y% (p/v).
7. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, en el que la solución madre formadora de gradiente se diluye al menos una vez en una solución de dilución antes de la inyección en el rotor.
- 35 8. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, en el que la solución madre que forma el gradiente se diluye en una primera solución de dilución, cuya solución madre diluida se diluye en una segunda solución de dilución antes de la inyección en el rotor.
- 40 9. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 7 y 8, en el que la solución o soluciones de dilución no contienen medio de gradiente.
10. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 9, en el que la solución de dilución tiene, o las soluciones de dilución tienen, un volumen de al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, o al menos el 50% de la solución madre formadora de gradientes.
- 45 11. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 9, en el que la relación del volumen de la solución madre formadora de gradiente sobre el volumen de la solución o soluciones de dilución es al menos de 2:1, al menos de 3:1, al menos de 4:1, al menos de 5:1 o al menos de 6:1.
- 50 12. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 11, en el que la solución madre formadora de gradiente y la solución o soluciones de dilución están conectadas entre sí y conectadas al rotor.
13. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 12, en el que la dilución es una dilución progresiva que se basa en un sistema de goteo.
- 55 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el sistema de goteo se logra creando vacío en el recipiente o recipientes que contienen solución o soluciones de dilución.
15. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, en el que el gradiente de densidad lineal preformado de la etapa b) es un gradiente de sacarosa.
- 60 16. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15, en el que el gradiente lineal preformado de la etapa b) varía de 0 a 55%.
- 65 17. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 16, en el que el virus se propaga en un cultivo celular.

18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el fluido que contiene virus de la etapa a) es el medio de cultivo celular recogido después de la infección de las células con el virus y la liberación del virus en el medio de cultivo celular.
- 5
19. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 18, en el que el virus es el virus de la gripe.
20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 a 19, en el que el virus se propaga en células madre embrionarias de pato, tales como células EB66®.
- 10
21. Un procedimiento de preparación de una vacuna que comprende al menos las siguientes etapas:
- A) obtención de un fluido que contiene virus,
- 15 B) proporcionar un gradiente de densidad lineal preformado de un intervalo dado X% -Y% (v/p) (siendo X el límite inferior y Y el límite superior) en un rotor de centrifuga con una capacidad de al menos 8 L, en el que la parte lineal del gradiente del rango dado X%-Y% abarca el porcentaje de densidad correspondiente al porcentaje, en el gradiente, al que migrará el virus,
- C) agregar el fluido al gradiente de densidad lineal preformado,
- D) centrifugar para separar el virus de las impurezas contaminantes, y
- 20 E) recoger las fracciones que comprenden el virus purificado,
- F) formular el virus purificado en una vacuna.

Figura 1

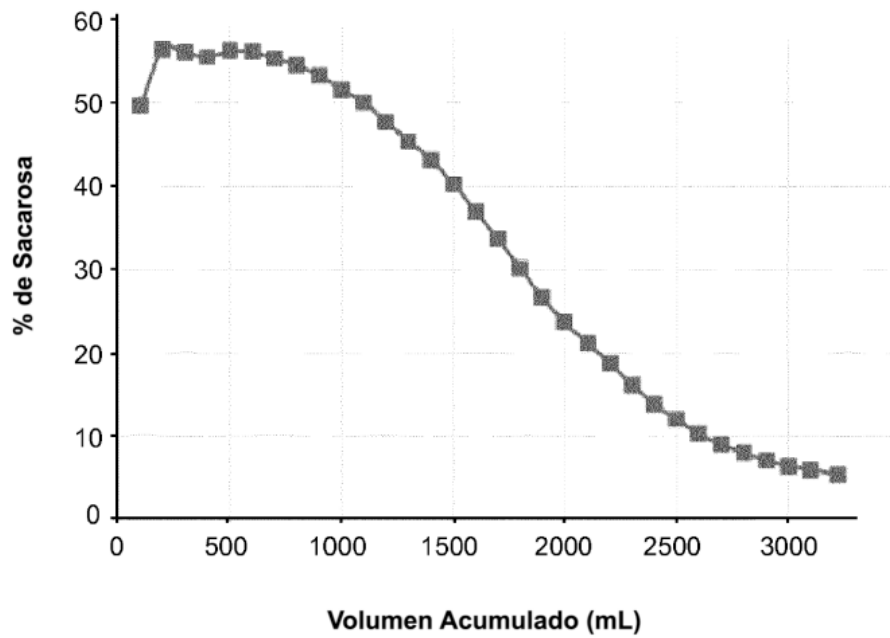


Figura 2

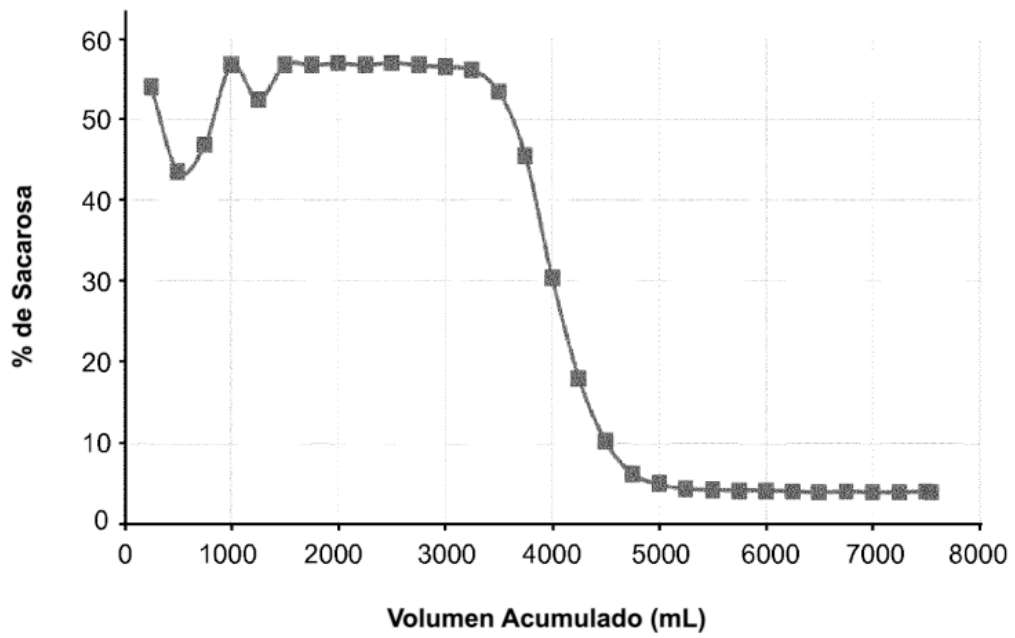


Figura 3A

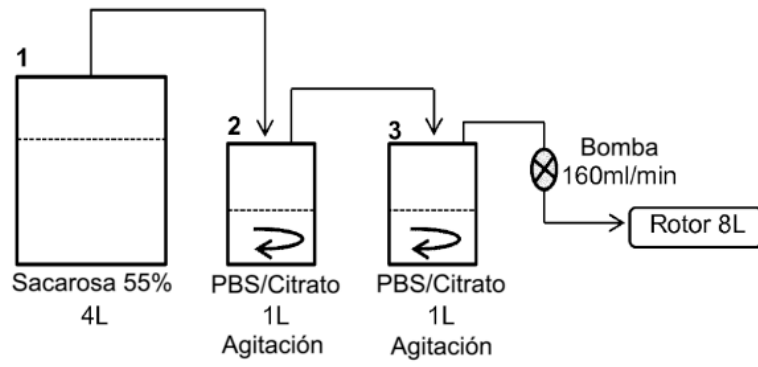


Figura 3B

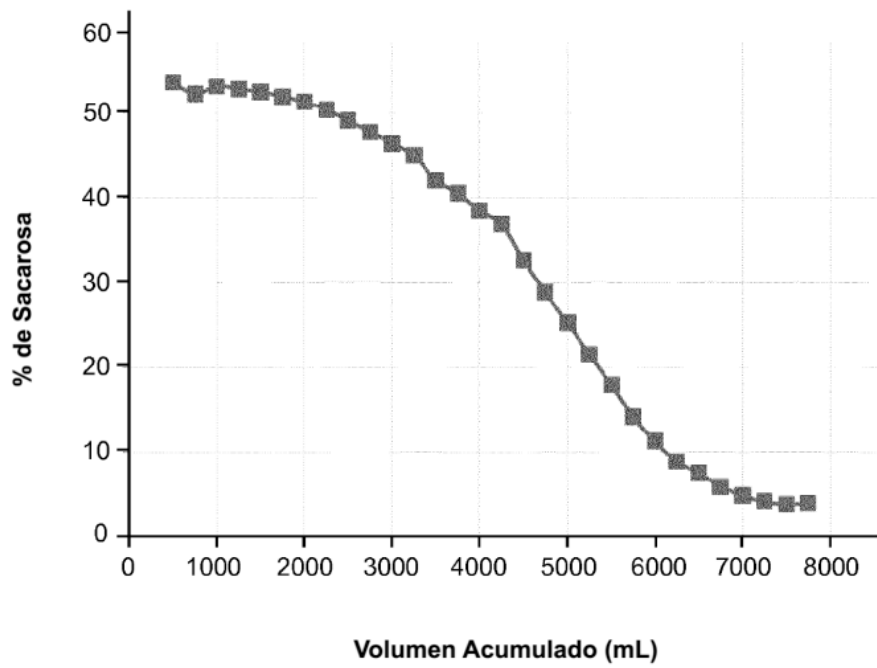


Figura 4A

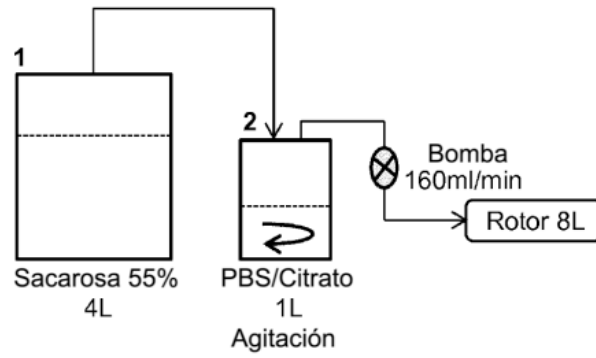


Figura 4B

