

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 337**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00	(2006.01)	B01D 15/18	(2006.01)
C12Q 1/04	(2006.01)	B01D 15/34	(2006.01)
G01N 21/49	(2006.01)		
G01N 30/46	(2006.01)		
G01N 15/02	(2006.01)		
C12Q 1/06	(2006.01)		
G01N 30/74	(2006.01)		
G01N 30/78	(2006.01)		
G01N 30/84	(2006.01)		
G01N 15/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2015 PCT/IB2015/054280**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15186113**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2015 E 15729243 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3152302**

54 Título: **Cuantificación y caracterización de alto rendimiento de virus y sus productos**

30 Prioridad:

06.06.2014 US 201462009126 P

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

15.11.2019

73 Titular/es:

**BIOGÉNESIS BAGÓ URUGUAY S.A. (100.0%)
Francisco Acuña de Figueroa 2119
Montevideo, UY**

72 Inventor/es:

**RÉGULIER, EMMANUEL GÉRARD ETIENNE;
BELLINZONI, RODOLFO CESAR;
MAGI, NICOLÁS;
ROMO, ANA y
SPITTELER, MARCELO ARNOLFO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 731 337 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

Cuantificación y caracterización de alto rendimiento de virus y sus productos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la cuantificación y caracterización de virus, partículas virales, partículas similares a virus (VLPs) y vectores virales recombinantes. Además, la presente invención se refiere al desarrollo de productos para prevenir enfermedades infecciosas causadas por virus con envoltura y sin envoltura y la evaluación de productos que contienen virus con envoltura y sin envoltura o partículas similares a virus. La presente invención además se refiere al desarrollo de productos para aplicaciones de terapia génica y la evaluación de productos que contienen vectores virales recombinantes usados en terapia génica.

10 Antecedentes de la invención

15 Los virus son entidades auto-replicantes que requieren ya sean células procariotas o eucariotas con el fin de replicarse y propagarse. Cuando un virus entra en contacto con una célula susceptible al principio se adhiere a la célula y luego entra en ella. Una vez dentro de la célula, el virus secuestra la maquinaria de síntesis proteica de la célula y le ordena que fabrique los componentes necesarios para ensamblar más copias de sí mismo. Después de un cierto periodo de tiempo, las copias del virus salen de la célula ya sea abriendo la célula o brotando a través de la membrana celular. Los virus se clasifican según varios criterios taxonómicos, uno de los más relevantes es si tienen o carecen de una envoltura de bicapa fosfolipídica.

20 Tanto los virus con envoltura como los sin envoltura se encuentran entre los patógenos de seres humanos y veterinarios. Una de las enfermedades veterinarias más importantes causada por un virus sin envoltura es la Fiebre Aftosa (FMD) causada por el virus de la fiebre aftosa (FMDV). Otro ejemplo de un virus sin envoltura que causa grandes impactos en la productividad del ganado es el Rotavirus Bovino, el agente causante de la diarrea neonatal en los terneros. Algunos ejemplos de virus con envoltura que causan enfermedades veterinarias incluyen los Herpesvirus Bovinos 1 y 5 (BoHV-1 o BHV-1 y BoHV-5 o BHV-5) que son los agentes etiológicos de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y la Encefalitis Herpética Bovina respectivamente; el Virus de la Parainfluenza Bovina 3 (PI3 o BPIV-3) asociado con el complejo de la enfermedad respiratoria bovina (BRD); y el Virus de la Rabia que es el patógeno causante de la encefalitis letal tanto en animales como en seres humanos.

25 La FMD es una enfermedad grave y altamente contagiosa que afecta a los animales biungulados, que incluyen ganado bovino, porcino, ovino, caprino y venado. Los síntomas de la fiebre aftosa incluyen fiebre, ampollas en la boca y en los pies y ubres, disminución de la producción de leche, pérdida de apetito y peso y cojera.

30 La enfermedad es endémica en muchas partes del mundo, pero no se reconoce como una zoonosis. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) publica periódicamente mapas de brotes y distribución de la enfermedad. El estado sanitario subvencionado por la OIE tiene un profundo impacto económico en países con economías dependientes del comercio de carne debido a las restricciones del mercado que impone la OIE, especialmente en los países afectados por la FMD.

35 El virus de la FMD (FMDV) es un virus de ARN monocatenario sin envoltura lipídica que presenta una simetría icosaédrica y un tamaño descrito (diámetro) que oscila de 28 a 40 nm. El virus pertenece al género de Aphotivirus, dentro de la familia de Picornaviridae. Toda la partícula del virus es extremadamente lábil *in vitro*, se disocia en monómeros a temperaturas superiores a 56°C y pH inferior a 6. Se han informado siete serotipos de FMDV, designados como O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1.

40 Las vacunas eficaces y los estrictos programas de control han erradicado la FMD en la mayoría de los países desarrollados, pero, independientemente de las estrictas políticas de comercio internacional, se han producido brotes importantes relativamente recientes en Europa (2000, 2001) y en Japón (2000, 2010). Las vacunas contra la FMD se fabrican en plantas con nivel de seguridad biológica 4 NBS (OIE). Se estima que anualmente se producen entre 2,5 y 3 mil millones de dosis en todo el mundo.

45 Los rotavirus son la causa más común de diarrea neonatal en los terneros. La diarrea por rotavirus generalmente afecta a los terneros entre los cuatro días y las tres semanas de vida. Los terneros suelen estar apagados y reacios a beber. En el transcurso de la enfermedad, que puede durar entre 4 y 8 días, existe un riesgo significativo de depresión, deshidratación e infecciones secundarias del ternero. Los terneros tendrán un apetito disminuido y pueden babear. La tasa de mortalidad puede ser tal alta como el 50% sin intervención.

50 El impacto económico de la diarrea del ternero en la industria ganadera es muy importante y de gran alcance: además de los costes asociados con la mano de obra adicional, el gasto en medicamentos y la muerte de los terneros existe el impacto económico potencial asociado con el bajo rendimiento a largo plazo de los terneros afectados. Se ha encontrado que el 80% de la morbilidad de los terneros desde el nacimiento hasta el día 21 es debida a la diarrea.

55 El rotavirus bovino es un virus de ARN de doble cadena sin envuelta que pertenece a la familia Reoviridae. El virión tiene una forma icosaédrica y presenta unas estructuras de la cápside de triple proteína. El diámetro del virión se ha

descrito que es de 80 nanómetros.

La vacunación de las madres contra el rotavirus representa una forma eficaz de combatir la enfermedad y de prevenir la diarrea en los terneros neonatos. Los terneros se deben alimentar con calostro de madres vacunadas contra la infección por rotavirus 1-3 meses antes del parto.

5 La infección del ganado por Herpesvirus Bovino puede dar lugar a enfermedades graves. La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) es una enfermedad respiratoria infecciosa altamente contagiosa causada por el Herpesvirus Bovino 1 (BHV-1 o BoHV-1). El Herpesvirus Bovino 5 (BHV-5 o BoHV-5) difiere de BoHV-1 en su tropismo: BoHV-5 es el agente causal de la meningoencefalitis en el ganado joven. BoHV-1 y BoHV-5 son virus de ADN de doble cadena con envuelta que pertenecen al género de Varicellovirus y a la familia de Herpesviridae. Tienen una forma esférica y pleomórfica y un diámetro descrito de 150-200 nm. La cápside de proteína interna consiste en 162 capsómeros y está rodeada por un tegumento amorfo.

15 La IBR puede afectar al ganado joven y mayor. Además de causar enfermedades respiratorias, este virus puede causar conjuntivitis, abortos, encefalitis e infecciones sistémicas generalizadas. La IBR se caracteriza por la inflamación aguda del tracto respiratorio superior. Después de la primera infección, el virus nunca se elimina por completo. Se queda oculto detrás de las células nerviosas en el cerebro como una infección latente (oculta) de por vida. Sin embargo, en momentos de estrés, el virus puede comenzar a multiplicarse nuevamente y se puede volver a excretar, generalmente de la nariz y los ojos. Por lo tanto, un animal que se ha infectado nunca se puede considerar seguro. La compra de animales infectados es la principal fuente de nuevas infecciones. Las enfermedades causadas por el virus pueden ser graves; por lo tanto, es una barrera para el comercio internacional.

20 Dado que el BHV-1 es un virus ubicuo y altamente contagioso, se recomienda la vacunación tan pronto como desaparezca la inmunidad pasiva en los terneros, generalmente entre los cuatro y los seis meses de edad. Las vacunas actualmente disponibles para la IBR incluyen vacunas de virus vivos modificados (MLV) y vacunas de virus inactivados o muertos (KV).

25 La Parainfluenza Bovina-3 (PI3) es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa que prevalece en la población bovina. La enfermedad se asocia con el complejo de enfermedad respiratoria bovina (BRD).

30 La infección por el virus PI3 (PIV-3) en solitario causa solamente enfermedades leves. Los signos clínicos incluyen fiebre, tos, secreciones nasales y lacrimales acuosas, así como un aumento de la frecuencia respiratoria y un aumento de los sonidos respiratorios. La infección puede aumentar la morbilidad de otras enfermedades virales como la diarrea viral bovina y la rinotraqueítis infecciosa bovina. El impacto de la infección PI3 es más significativa cuando se combina con neumonía bacteriana secundaria.

El virus de la parainfluenza-3 es un virus de ARN con envuelta de cadena negativa que pertenece al género Respirovirus dentro de la familia Paramyxoviridae. El virus tiene una forma esférica y un diámetro descrito de aproximadamente 150 nm.

35 La prevención a través de la vacunación es la mejor manera de prevenir cualquier gran impacto de la Parainfluenza-3. La mayoría de vacunas PI3 se combinan con otros virus respiratorios como por ejemplo el herpesvirus-1 bovino (BHV-1). La vacuna está disponible en forma viva modificada o inactivada.

40 La rabia es una enfermedad zoonótica transmitida de animales a seres humanos y causada por el virus de la rabia, del género Lyssavirus dentro de la familia Rhabdoviridae. El virus de la rabia es un virus de ARN con envuelta de cadena negativa con forma de tipo bala de aproximadamente 180 nm de longitud y un diámetro de sección transversal de aproximadamente 75 nm.

Se cree que todos los mamíferos son susceptibles al virus de la rabia. Los perros domésticos son el reservorio más común del virus, con más del 95% de las muertes en seres humanos causadas por la rabia mediada por perros.

45 La manifestación clínica de parálisis de la rabia es la forma más común en ganado, cerdos y caballos. Una mordedura de un animal salvaje infectado, como un zorro o un mapache, es un método común de infección en el ganado, aunque la enfermedad también se transmite por murciélagos hematófagos, como los murciélagos "vampiro" en áreas tropicales y subtropicales. Es una grave amenaza para la producción animal con pérdidas de varios miles de cabezas de ganado cada año y una preocupación para la salud humana debido al contacto entre seres humanos y ganado rabioso durante las operaciones normales de crianza.

50 Con la excepción de la Antártida, la rabia es endémica en todos los continentes. De las decenas de miles de muertes que se producen anualmente debido a la rabia, el 95% de los casos se registran en Asia y África.

La rabia es una enfermedad prevenible al 100% con vacunas: hay disponibles vacunas seguras y eficaces de virus inactivados para perros, ganado y seres humanos. Las vacunas profilácticas posteriores a la exposición son necesarias para tratar a las personas que no han recibido inmunización previa.

Durante las últimas décadas, las industrias de la salud humana y veterinaria han sido testigos de regulaciones

gubernamentales cada vez más estrictas relacionadas con las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) para la producción de productos farmacéuticos y biofarmacéuticos. Han surgido nuevos conceptos de calidad, como la Tecnología Analítica de Procesos (PAT), que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) define como un mecanismo para diseñar, analizar y controlar los procesos de fabricación farmacéutica a través de la medida de Parámetros Críticos de Proceso (CPP) que afectan a los Atributos Críticos de Calidad (CQA). La PAT enfatiza en la importancia de controlar el proceso de producción como un medio para lograr el estándar de calidad más alto del producto final. La PAT representa una herramienta especialmente útil para el control de calidad de productos intermedios y finales en la industria de las vacunas. De hecho, la eficacia de las vacunas de virus inactivados, que se usan rutinariamente como parte de los programas de erradicación y en contextos de emergencia, es altamente dependiente de la carga útil antigénica formulada en cada dosis y de la integridad del virus.

A partir de hoy, los controles de calidad del proceso de antígenos virales completos en los flujos de procesos intermedios se basan principalmente en la realización de ensayos de titulación cuando el virus aún está vivo (antes de la etapa de inactivación) o en métodos inmunoquímicos como el ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima) o pruebas de inmunodifusión radial simple (SRID) y, en algunos casos, PCR cuantitativa a tiempo real cuando el virus ya se ha inactivado.

Los kits de detección de ELISA se usan comúnmente para la detección de agentes causantes de enfermedades en los fluidos corporales, tanto para seres humanos como para animales. Los kits de ELISA están generalmente diseñados para detectar la respuesta de anticuerpos a los agentes infecciosos, pero no a los agentes infecciosos en sí mismos. Aunque los ensayos de detección de ELISA se usan en algunos casos para la monitorización y control de calidad de antígenos virales durante el proceso de fabricación, estos ensayos se deben desarrollar caso por caso y no se pueden estandarizar para diferentes tipos de virus ya que las condiciones de ensayo se basan en gran medida en los reactivos de detección usados en los kits, como los anticuerpos monoclonales o policlonales. Lo mismo es cierto para los ensayos SRID.

Además, los métodos de ELISA pueden producir solamente una cuantificación aproximada de las partículas de virus en función de la valoración colorimétrica de una reacción anticuerpo-antígeno. Los resultados están muy influenciados por el factor de dilución de la muestra y de la matriz de muestra. Por consiguiente, el ensayo de ELISA se tiene que adaptar a los diferentes tipos de muestras de las diferentes etapas de fabricación y no se puede considerar como una herramienta útil para la Tecnología Analítica de Procesos (PAT).

Además, los ensayos de ELISA o los métodos de PCR cuantitativa no proporcionan ninguna información sobre el tamaño ni la integridad estructural de las partículas de virus, ya que ambos métodos no pueden discriminar entre antígenos virales completos o rotos. Es importante conocer el tamaño y la integridad estructural de las partículas de virus para garantizar la eficacia de inmunización de las vacunas.

Para el virus FMD, el análisis de gradiente de densidad de sacarosa cuantitativo 140S (146S), desarrollado por Barteling y Meloen (Barteling SJ, Meloen RH. *A simple method for the quantification of 140S particles of foot-and-mouth disease virus (FMDV)*. Arch Gesamte Virusforsch, 1974, 45 (4): 362-4), es el método recomendado para cuantificar el antígeno del virus y, sobre esa base, formular vacunas. El principio del método 146S es separar las partículas virales de FMD en función de su coeficiente de sedimentación en el gradiente de sacarosa. Por lo tanto, la técnica proporciona solo una medida indirecta de la integridad de las partículas virales.

Se han realizado varios esfuerzos internacionales con el fin de estandarizar el método, pero aún no existe un protocolo armonizado ni un estándar internacional de FMDV. Las complejidades técnicas del método y el requerimiento de artículos de equipos especializados probablemente contribuyeron a esta situación (Barteling SJ. *Need for further standardization of the 146-S test as the basis for final- Foot-and-Mouth Disease (FMD) Vaccine formulation*. Reunión del Grupo de Investigación EUFMD 1999- Apéndice 17).

La falta de un método estandarizado para medir el ingrediente activo presente en las vacunas virales es un factor importante para explicar por qué los ensayos clínicos costosos y engorrosos que generalmente implican animales grandes (la especie objetivo) o animales de laboratorio todavía son necesarios para el registro de vacunas virales y lanzamiento de lotes.

Por ejemplo, en el caso de la vacuna contra la rabia, se ha usado durante varias décadas la prueba de la potencia de los NIH como el ensayo de referencia para la prueba de potencia de lotes de vacunas. Este ensayo cruel y altamente complicado *in vivo* requiere el uso de 150 ratones por lote e incluye el desafío intracraneal de los ratones con una cepa de rabia patógena.

Los esfuerzos internacionales actuales que trabajan en la armonización de los métodos para los controles de la potencia de vacunas y moléculas biofarmacéuticas se centran en el principio 3R: Reducción del número de animales usados; Reemplazamiento de animales con una técnica alternativa y Refinamiento de las formas en que se realizan los experimentos para asegurar que los animales sufran lo menos posible.

Para la industria de las vacunas y especialmente para vacunas basadas en antígenos de tamaño completo (como las vacunas virales inactivadas o las vacunas virales vivas atenuadas), los métodos y equipos capaces de cuantificar y determinar de manera fiable el tamaño de las partículas en el intervalo de nanómetros (nm) representarían

herramientas importantes para la implementación de controles en proceso destinados a garantizar la calidad de los antígenos virales producidos en cada etapa del proceso. Sin embargo, el análisis de flujos de procesos complejos que contienen partículas de virus es una tarea mucho más difícil que el análisis de proteínas recombinantes comunes como los anticuerpos monoclonales (mAb). Un desafío es que las prácticas de fabricación para muchas vacunas actuales se desarrollaron hace décadas, antes del surgimiento de la tecnología de cultivo de medios sin suero. El medio que contiene suero usado en muchos procesos de fabricación contiene un contenido muy alto de proteínas. También, el rendimiento de las partículas virales obtenidas de la infección del cultivo celular generalmente es del orden de miligramos por litro que es varios órdenes de magnitud menor en comparación con la expresión de proteínas recombinantes como los mAbs. También de gran importancia es el hecho de que algunos virus tienen un ciclo de replicación lítica que desencadena la destrucción de la célula. La liberación en el medio de cultivo celular de todos los materiales contenidos en el citoplasma y en el núcleo de las células, incluyendo todo el material genómico y residuos lipídicos de la membrana celular, harán el análisis más difícil.

Dado que la cromatografía de exclusión por tamaño separa diferentes moléculas en base a sus volúmenes hidrodinámicos, las moléculas de diferentes pesos moleculares pero volúmenes hidrodinámicos similares tienden a mostrar comportamiento de movilidad muy similar durante la consecución de la cromatografía. En las condiciones de flujos de procesos muy complejos, la cromatografía de exclusión por tamaño usualmente es incapaz de proporcionar una buena resolución suficiente para separar el pico de partículas de virus de interés de otros contaminantes del proceso de volumen hidrodinámico similar como grandes moléculas de ADN y grandes residuos lipídicos.

Las vacunas basadas en virus son modelos de vacuna empleados normalmente para distribuir antígenos a un sujeto para su inmunización. Es extremadamente crucial que el antígeno a distribuir esté en su conformación correcta o nativa, de modo que se pueden presentar los epítopos apropiados para inducir respuestas inmunes específicas y eficaces. Por lo tanto, el antígeno mal plegado, degradado o agregado puede tener una eficacia reducida en, e incluso no ser capaz de, desencadenar respuestas inmunes específicas. La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) ayuda a evaluar la eficacia de las vacunas basadas en proteínas o en virus en términos de sus integridad y estabilidad. Analizando el perfil DLS, se puede ser capaz de comprobar si los antígenos se han degradado o agregado a lo largo del tiempo o tras el almacenamiento en un tampón o temperatura particular y, de este modo, asegurar la eficacia de las vacunas.

Las metodologías de separación como la cromatografía de exclusión por tamaño, cuando se usa en solitario, por lo general da estimaciones aproximadas de tamaño de partícula mediante el escrutinio ajustado del comportamiento de la movilidad, aunque estas valoraciones no son suficientemente sensibles para detectar modificaciones sutiles de dimensión del antígeno. Por el contrario, la DLS detecta con sensibilidad y precisión y estima el tamaño de partículas y, por lo tanto, permite monitorizar diferencias sutiles de tamaño de partículas. Sin embargo, la DLS solamente puede analizar la integridad y estimar el tamaño de partículas con alta pureza.

Debido a la relevancia económica de estas enfermedades del ganado en todo el mundo, existe una necesidad de mejorar las herramientas de prevención, en particular con respecto a las vacunas mejoradas y/o métodos de preparación de estas. La presente invención proporciona métodos para la cuantificación y caracterización de virus, que incluyen los virus con envuelta y sin envuelta y los virus basados en ARN y en ADN y los productos relacionados de manera precisa y de alto rendimiento. Con la creciente demanda tanto de cantidad como de calidad de las vacunas veterinarias, la presente invención es una herramienta muy útil y rentable para el control de calidad de las vacunas virales.

Como un ejemplo y en el caso de la Fiebre Aftosa, el mercado de vacunas más grande del mundo, el mercado chino, requiere 1.700 miles de millones de dosis (de 2 mililitros cada una) por año. Teniendo en cuenta que un lote industrial promedio de vacuna representa 5 millones de dosis (es decir, un lote de 10.000 litros), esto significa que se producen alrededor de 340 lotes de vacunas FMD cada año en China por diferentes fabricantes. A partir de hoy y debido a esta gran cantidad de lotes producidos, la Autoridad Reguladora Veterinaria China ha renunciado a la responsabilidad de controlar la calidad de los lotes de vacunas FMD y tiene que confiar en el desempeño de las pruebas de control de calidad por parte de cada fabricante de vacunas. El control de calidad de las vacunas FMD se monitoriza generalmente usando pruebas de potencia *in vivo* que permiten evaluar la calidad de las vacunas en grandes cantidades, pero requieren procedimientos complejos y engorrosos. Actualmente, no hay otras técnicas *in vitro* disponibles que permitan el control de calidad de una cantidad tan grande de lotes de vacuna de una manera oportuna.

La presente invención, por primera vez, introduce un sistema *in vitro* que es capaz de cuantificar la carga útil del antígeno por dosis y caracterizar el tamaño y la integridad del antígeno viral en cada lote de vacuna, de una manera de alto rendimiento, sin importar si el antígeno es un virus vivo atenuado o inactivado. La presente invención implementa un sistema mucho más simplificado que el sistema de prueba de potencia *in vivo* para el control de calidad de vacunas virales y, por lo tanto, mejora la calidad de los productos. Se estima que la presente invención puede monitorizar la calidad de 340 lotes de vacunas en solo unos días.

Por lo tanto, la presente invención finalmente garantizaría una mejor calidad de las vacunas y conferiría una mejor protección frente a enfermedades veterinarias a la población animal y humana.

Breve exposición de la invención

5 Con el fin de mejorar los métodos y productos actuales para la prevención de enfermedades virales (que incluyen, pero no se limitan a, fiebre aftosa, diarrea por rotavirus, rinotraqueítis infecciosa bovina, encefalitis herpética bovina, complejo de enfermedad respiratoria bovina (BRD) y rabia), la presente invención introduce un método para la cuantificación y caracterización de virus mediante el uso combinado de una cromatografía de exclusión por tamaño y una detección de dispersión dinámica de la luz (DLS) en línea para el análisis del perfil cromatográfico. El método descrito en esta memoria puede cuantificar y caracterizar todos los virus con un alto rendimiento y precisión.

10 En una realización, la presente invención proporciona un método para cuantificar y caracterizar el tamaño y la integridad de virus con envuelta y sin envuelta lipídica. En otra realización, la presente invención proporciona un método para cuantificar y caracterizar el tamaño y la integridad de virus que tienen ácidos ribonucleicos como los materiales genéticos (virus de ARN) o ácidos desoxirribonucleicos como los materiales genéticos (virus de ADN).

En una realización, la presente invención proporciona un método para cuantificar partículas virales y caracterizar su tamaño e integridad en un flujo de procesos complejo en el que no se pueden separar algunos contaminantes del proceso de las partículas virales solamente mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

15 En una realización, el presente método comprende además una o más etapas de preparación de la muestra que incluye una posible etapa de extracción con disolvente usando un disolvente como cloroformo y una etapa de digestión con endonucleasa que usa endonucleasas como Benzonase® o Turbo™ DNase antes del método de la cromatografía de exclusión por tamaño y del análisis de dispersión dinámica de la luz.

20 En una realización, la presente invención proporciona un método para aislar y purificar partículas virales de productos que contienen las partículas.

En una realización, la presente invención proporciona un método para diseñar y preparar la formulación de productos para prevenir enfermedades virales o veterinarias como la fiebre aftosa, diarrea por rotavirus, rinotraqueítis infecciosa bovina, encefalitis herpética bovina, complejo de enfermedad respiratoria bovina (BRD) y rabia.

25 En una realización, la presente invención proporciona un método para la evaluación de productos que contienen partículas víricas, como la cantidad y estabilidad de antígenos. Estos productos incluyen, pero no se limitan a, bancos de antígenos y vacunas que contienen esos virus.

En una realización, la presente invención proporciona un método que sirve como herramienta de control de calidad en el proceso para determinar la cantidad y caracterizar la integridad y tamaño de antígenos virales en productos intermedios sintetizados durante todo el proceso de producción de la vacuna.

Breve descripción de los dibujos

30 Las Figuras 1A-1B muestran una realización de los perfiles cromatográficos de FMDV Campos O1 purificado. La Figura 1A es el perfil cromatográfico registrado a 254 nm y la Figura 1B es el perfil cromatográfico registrado usando Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).

35 Las Figuras 2A-2B muestran una realización de los perfiles cromatográficos de FMDV Campos O1 purificado después de la incubación a 56°C durante 1 hora y posterior digestión con Benzonase®. La Figura 2A es el perfil cromatográfico registrado a 254 nm y la Figura 2B es el perfil cromatográfico registrado usando Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).

40 Las Figuras 3A-3C muestran una realización del efecto de la extracción con cloroformo y de la digestión con Benzonase® en la cuantificación de partículas de FMDV Campos O1 en un concentrado viral preparado por precipitación con PEG. La Figura 3A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de 2 muestras: una muestra tratada con extracción de cloroformo y digestión con Benzonase® y una muestra sin ningún tratamiento. La Figura 3B muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de 2 muestras, ambas ya tratadas con extracción con cloroformo: una muestra tratada además con digestión con Benzonase® y la otra muestra sin digestión con Benzonase®. La Figura 3C muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de 2 muestras, ambas ya tratadas con digestión con Benzonase®: una muestra tratada además con extracción con cloroformo y la otra muestra sin extracción con cloroformo.

45 Las Figuras 4A-4D muestran una realización de la cuantificación de una dilución en serie de antígenos de la cepa Campos O1 de FMDV que se prepararon a partir de un concentrado de antígeno obtenido por una concentración por ultrafiltración (UF). La Figura 4A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígenos de la cepa Campos O1 de FMDV obtenida por ultrafiltración (UF). La Figura 4B muestra la superposición de perfiles cromatográficos de U.V. obtenidos de las cinco muestras analizadas de FMDV Campos O1. La Figura 4C muestra la superposición de dos perfiles cromatográficos de una muestra de FMDV Campos O1: un perfil registrado a 254 nm U.V. y el otro perfil que usa la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). La Figura 4D muestra las gráficas de la concentración viral ($\mu\text{g/ml}$) de FMDV Campos O1 y el tamaño de partícula viral (nm) frente al porcentaje de dilución con la línea de regresión.

5 Las Figuras 5A-5D muestran una realización de la cuantificación de una dilución en serie de antígenos del Rotavirus Bovino serotipo G6 que se prepararon a partir de un concentrado de antígeno obtenido mediante una concentración por ultrafiltración (UF). La Figura 5A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno del Rotavirus Bovino G6 obtenido mediante ultrafiltración (UF). La Figura 5B muestra la superposición de los perfiles cromatográficos de U.V. obtenidos a partir de cinco muestras analizadas de Rotavirus bovino G6. La Figura 5C muestra la superposición de los dos perfiles cromatográficos de una muestra de Rotavirus Bovino G6: un perfil registrado a 254 nm de U.V. y el otro perfil usando la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). La Figura 5D muestra las gráficas del área de pico viral (mAU.ml) del Rotavirus G6 y el tamaño de partícula viral (nm) frente al porcentaje de dilución con la línea de regresión.

10 Las Figuras 6A-6D muestran una realización de la cuantificación de una dilución en serie de antígenos del BoHV-5 que se prepararon a partir de un concentrado de antígeno obtenido mediante una concentración por ultrafiltración (UF). La Figura 6A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno del BoHV-5 obtenido mediante ultrafiltración (UF). La Figura 6B muestra la superposición de los perfiles cromatográficos de U.V. obtenidos a partir de cinco muestras analizadas de BoHV-5. La Figura 6C muestra la superposición de los dos perfiles cromatográficos de una muestra de BoHV-5: un perfil registrado a 254 nm de U.V. y el otro perfil usando la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). La Figura 6D muestra las gráficas del área de pico viral (mAU.ml) de BoHV-5 y el tamaño de partícula viral (nm) frente al porcentaje de dilución con la línea de regresión.

20 Las Figuras 7A-7D muestran una realización de la cuantificación de una dilución en serie de antígenos de PIV-3 que se prepararon a partir de un concentrado de antígeno obtenido mediante una concentración por ultrafiltración (UF). La Figura 7A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno de PIV-3 obtenido mediante ultrafiltración (UF). La Figura 7B muestra la superposición de los perfiles cromatográficos de U.V. obtenidos a partir de cinco muestras analizadas de PIV-3. La Figura 7C muestra la superposición de los dos perfiles cromatográficos de una muestra de PIV-3: un perfil registrado a 254 nm de U.V. y el otro perfil usando la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). La Figura 7D muestra las gráficas del área de pico viral (mAU.ml) de PIV-3 y el tamaño de partícula viral (nm) frente al porcentaje de dilución con la línea de regresión.

30 Las Figuras 8A-8D muestran una realización de la cuantificación de una dilución en serie de antígenos del virus de la Rabia que se prepararon a partir de un concentrado de antígeno obtenido mediante una concentración por ultrafiltración (UF). La Figura 8A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno del virus de la rabia obtenido mediante ultrafiltración (UF). La Figura 8B muestra la superposición de los perfiles cromatográficos de U.V. obtenidos a partir de cinco muestras analizadas del virus de la rabia. La Figura 8C muestra la superposición de los dos perfiles cromatográficos de una muestra del virus de la Rabia: un perfil registrado a 254 nm de U.V. y el otro perfil usando la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). La Figura 8D muestra las gráficas del área de pico viral (mAU.ml) de la Rabia y el tamaño de partícula viral (nm) frente al porcentaje de dilución con la línea de regresión.

35 La Figura 9 muestra una gráfica a lo largo del tiempo de una infección viral de FMD Campos O1 en un biorreactor de cultivo celular de 2000 litros. Muestra los cambios en la concentración viral ($\mu\text{g/ml}$), recuento de células (10^6 células/ml) y el tamaño de partículas virales (nm) durante las ocho primeras horas después de la infección.

40 La Figura 10 muestra una realización de los esquemas de un sistema de conmutación de columnas que ejecuta un detector de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) y dos columnas cromatográficas de exclusión por tamaño (SEC) en paralelo. Las configuraciones de los paneles izquierdo y derecho se pueden cambiar de un lado a otro.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para la cuantificación y caracterización de virus con alto rendimiento y alta precisión.

45 En una realización, el presente método se usa para cuantificar y caracterizar el tamaño y la integridad de los virus con y sin envoltura lipídica. En otra realización, el presente método se usa para cuantificar y caracterizar el tamaño y la integridad de virus que tienen ácidos ribonucleicos como los materiales genéticos (virus de ARN) o ácidos desoxirribonucleicos como los materiales genéticos (virus de ADN).

50 En una realización, el presente método se usa para cuantificar y caracterizar virus que incluyen, pero no se limitan a, el virus de la Fiebre Aftosa (FMDV) (todos los serotipos: O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1), Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1), virus de la Parainfluenza 3 (PIV-3), Rotavirus Bovino como los serotipos G6 y G10, virus de la Rabia, Virus de la Diarrea Viral Bovina 1 y 2 (BVDV-1 y BVDV-2), Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV), Circovirus Porcino 2 (PCV-2), Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Bovino (PRRSV), Parvovirus Porcino (PPV) y virus de la Lengua Azul (BTV).

55 En una realización, el presente método es aplicable a cualquier virus enumerado en las publicaciones, de dominio público o de los sitios web, como el informe o "Taxonomía de Virus" publicado por el Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (ICTV).

Con el uso combinado de dos etapas de preparación de muestras de una extracción con disolvente opcional y una

digestión con endonucleasa con cromatografía de exclusión molecular, y un análisis de perfil cromatográfico llevado a cabo por medio de detectores de absorción en U.V. a 250-280 nm y de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), el método de la presente invención proporciona un método inesperadamente mejorado para la cuantificación y caracterización de la integridad y el tamaño de partículas virales tanto para virus con envuelta como sin envuelta, en cada etapa del proceso de fabricación de una vacuna.

La elección de las etapas de preparación de la muestra depende del tipo de virus. En una realización como para virus sin envuelta como el virus FMDV y el Rotavirus Bovino, la etapa de extracción con disolvente es muy útil para eliminar los residuos lipídicos grandes contaminantes. En otra realización como para virus con envuelta lipídica, como BoHV-5, PIV-3 y el virus de la Rabia, la etapa de extracción con disolvente no se puede realizar ya que destruirá la envuelta lipídica de estos virus y, por consiguiente, destruirá las partículas virales.

Las dos etapas de preparación de muestra facilitan la separación de moléculas y permiten una cuantificación y caracterización de alto rendimiento de las partículas virales de todas las fuentes que incluyen los flujos de procesos muy complejos. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) por sí sola no sería capaz de separar las partículas virales de contaminantes como moléculas grandes de ADN o residuos lipídicos grandes que aparecen en estos procesos complejos ya que estos contaminantes tienen generalmente volúmenes hidrodinámicos similares a los de las partículas virales. También, el presente método es ventajoso en comparación con el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) por sí sola para la caracterización de los antígenos virales ya que esta última solo puede proporcionar una estimación indirecta y aproximada del tamaño en función del volumen de elución de la columna cromatográfica.

El método de la presente invención permite una evaluación rápida y precisa tanto de la concentración como de la calidad de los antígenos víricos, en donde se define la calidad en función de la integridad estructural y del tamaño de las partículas virales. Con la medición precisa y exacta mediante Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), el método descrito en esta memoria permite una estimación más precisa y un control directo de la integridad y el tamaño de los antígenos virales.

Se pueden usar columnas SEC empaquetadas calibradas con medios cromatográficos de un tamaño de poro que permite el acceso parcial de moléculas de proteínas, fragmentos y agregados de proteína al volumen interno de los medios con el fin de evaluar la polimerización y la fragmentación molecular de proteínas o péptidos altamente purificados en preparaciones y productos biofarmacéuticos. Sin embargo, la DLS solo se puede usar para analizar la integridad y tamaño de partículas con alta pureza. Estas técnicas no son fácilmente aplicables en un formato de alto rendimiento para soluciones de proteínas más complejas o en intermedios de procesos crudos que contienen otros tipos de contaminantes como ADN o moléculas lipídicas. Esto se debe a que la limitada resolución de la SEC en un corto análisis cromatográfico no permitiría una suficiente separación de picos de diferentes especies en la solución y, por lo tanto, no permitiría una buena caracterización de los tamaños de moléculas diferentes. La presente invención se puede aplicar satisfactoriamente a todo tipo de muestras durante todo el proceso de fabricación de partículas virales o vacunas, y muestras de otras fuentes o procesos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: a) durante la infección de las células cultivadas en un biorreactor (véase Ejemplo 7) donde la concentración del virus es muy baja y el nivel de contaminantes en el proceso es muy alto (p. ej., proteínas del suero bovino, proteínas de células lisadas, ADN celular y residuos lipídicos liberados debido a la destrucción de la membrana celular); b) después de la concentración de antígenos en la que el factor de concentración puede ser tan alto como 150X o superior (véase ejemplos 5-6); c) antes de la formulación de la vacuna final con el fin de determinar la carga útil adecuada de cada dosis de vacuna, y d) sobre el producto formulado final incluso en los casos de vacunas formuladas como una emulsión de agua en aceite (W/O) o una doble emulsión de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W). La técnica de cuantificación y caracterización descrita en la presente invención se puede aplicar a muestras intermedias tomadas de procesos muy complejos y crudos, así como a estándares de virus de referencia altamente purificados con la misma eficacia, precisión y alto rendimiento.

En una realización, el método de la presente invención permite el análisis tanto de la cantidad como de la calidad (p. ej., integridad y tamaño) de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 muestras de partículas virales por día, un rendimiento significativamente mayor que es imposible de obtener en el caso de emplear otra técnica como Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC) debido a las limitaciones de tiempo debidas a la larga duración de una ejecución de una muestra (p. ej., 3 horas) en el equipo de FPLC. Por lo tanto, el uso de equipos FPLC permite un procesamiento de un máximo de 4 muestras por día de trabajo. Por otro lado, la técnica tradicional 146S para el virus FMD por ejemplo solo permite el análisis de un máximo de 12 muestras por día de trabajo.

El método de la presente invención es muy significativamente diferente de las técnicas anteriores ya que se puede aplicar con éxito a muestras preparadas a partir de todo tipo de procesos, incluyendo intermedios crudos y muestras virales purificadas ya que incluye un detector de DLS en línea que proporciona una estimación directa de la integridad y el tamaño de la partícula viral en cuestión y se puede ejecutar en un formato de alto rendimiento.

En una realización, la presente invención proporciona un mecanismo de conmutación de múltiple columna que se puede usar en combinación con los presentes métodos u otros métodos aplicables para lograr además un alto rendimiento de muestras (véase el Ejemplo 8). En una realización, la presente invención proporciona un sistema de conmutación de columnas que es capaz de ejecutar múltiples columnas y detectores de DLS al mismo tiempo para un

análisis de alto rendimiento. Por el contrario, no es factible implementar la misma técnica en el caso de la FPLC porque la FPLC normalmente implica una larga duración de la ejecución, p. ej., 3 horas por ejecución.

5 Cualquier cambio en la estructura tridimensional, especialmente en relación con los epítomos importantes del antígeno, puede disminuir la inmunogenicidad del antígeno. El método de la presente invención también permite una caracterización del antígeno con alta sensibilidad ya que permite la detección de pequeños cambios en el diámetro de las partículas de antígenos virales que se cuantifican, mientras que esos pequeños cambios serían totalmente imposibles de detectar con otras técnicas como ELISA o SRID, técnica de gradiente de sacarosa 146S, PCR cuantitativa o cromatografía sola. Por lo tanto, la presente invención es capaz de detectar pequeñas alteraciones en el tamaño de antígenos y proporciona una gran mejora para la caracterización de la calidad de un antígeno.

10 En una realización, la presente invención proporciona un método para la cuantificación y caracterización de virus completos que incluyen, pero no se limitan a, virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), virus de la Parainfluenza 3 (PIV-3), Rotavirus Bovino y virus de la Rabia mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En una realización, el método comprende inyectar una muestra que contiene un virus como virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), virus de la Parainfluenza 3 (PIV-3), Rotavirus Bovino o virus de la Rabia en una columna cromatográfica, eluir la muestra, analizar el perfil cromatográfico a un intervalo de tiempo de elución predeterminado y determinar la cantidad, integridad y tamaño de las partículas de virus.

En una realización, la columna cromatográfica es una columna cromatográfica de exclusión molecular.

En una realización, la columna cromatográfica se diseña para separar partículas con tamaños en el intervalo de 10-200 nm o más y pesos moleculares en el intervalo de 10^5 - 10^9 Dalton o más.

20 En una realización, el intervalo de tiempo predeterminado para el virus objetivo se resuelve mediante la ejecución cromatográfica de muestras de referencia o estándares de partículas de virus purificadas.

En una realización, el método descrito en esta memoria puede cuantificar antígenos o partículas virales en un intervalo de concentración que es mucho más amplio que el alcanzado por las tecnologías actuales, es decir, 5 a 70 $\mu\text{g/ml}$ o 3 a 300 $\mu\text{g/ml}$. En otra realización, el presente método puede cuantificar antígenos o partículas virales dentro de la concentración de 1,2 a 750 $\mu\text{g/ml}$. En otra realización, el presente método puede cuantificar antígenos o partículas virales superiores a 750 $\mu\text{g/ml}$.

30 En una realización, el método descrito en esta memoria puede caracterizar con gran precisión el tamaño e integridad de antígenos o partículas virales independientemente de la concentración de las partículas de virus. En una realización con un DLS en línea, el presente método puede medir con precisión el tamaño de las muestras de FMDV que tienen una concentración que oscila entre 1,2 y 750 $\mu\text{g/ml}$ y la medición es independiente de la concentración de los antígenos de FMDV (véanse los Ejemplos 5 y 7). Los estudios representan el primer informe de una caracterización precisa del tamaño y la integridad del virus FMD mediante un DLS en línea en un intervalo tan amplio de concentraciones.

35 Como se ilustra en los ejemplos a continuación, el presente método se validó exhaustivamente para el virus FMD sin envuelta (véanse los Ejemplos 5 y 7) con respecto a la reproducibilidad, especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. Representa la primera técnica validada *in vitro* disponible para la cuantificación de partículas virales que también caracteriza en línea la integridad y el tamaño de las partículas cuantificadas. Dado que el virus tiene un tamaño grande en comparación con la mayoría de componentes en una muestra purificada o crudamente purificada, el virus se puede aislar de los componentes de bajo peso molecular en la muestra usando técnicas de SEC convencionales y eluir en el volumen de exclusión (o el volumen de vacío) de la columna o muy cerca de él, dependiendo del tipo de columna de exclusión de tamaño usada. Sin embargo, algunos componentes de alto peso molecular como moléculas de ADN grandes o residuos lipídicos no se pueden separar solo con la SEC ya que estas moléculas tienen un volumen hidrodinámico muy similar en comparación con las partículas virales. Además, la SEC o tecnologías similares no pueden diferenciar los virus que tienen tamaños ligeramente diferentes. Es porque la mayoría de los virus están casi excluidos de los poros de la SEC y pasan directamente a través de la columna. Los volúmenes de elución de virus de diferentes tamaños pueden ser muy similares. La DLS fuera de línea es de valor limitado para determinar el tamaño de las partículas virales ya que sus resultados están fuertemente influenciados por la polidispersidad. La presencia de partículas más grandes y más pequeñas en la muestra puede afectar en gran medida a los resultados. Por otro lado, el uso combinado de DLS y SEC-HPLC se basa en la alta pureza del pico cromatográfico para producir una medición directa del tamaño de partícula no comprometida por otros componentes de la muestra; de tal modo que la medida de tamaño no se puede inferir de la movilidad cromatográfica.

45 En una realización, el análisis del perfil cromatográfico se lleva a cabo por medio de detectores de absorción en UV a 250-280 nm y de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). En otra realización, el análisis del perfil cromatográfico se lleva a cabo por medio de detectores de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) en línea. El presente método presenta un detector de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) en línea que permite el análisis en tiempo real de todos los perfiles cromatográficos de exclusión por tamaño y, por lo tanto, permite una evaluación rápida y precisa tanto de la concentración como de la calidad de los antígenos virales.

En una realización, el análisis del perfil cromatográfico de una muestra viral se lleva a cabo mediante una comparación

con una distribución de tamaño predeterminada de partículas virales integrales. Las muestras de referencia o estándar que contienen virus purificados se analizan mediante cromatografía y análisis DLS en línea, lo que resuelve, por lo tanto, los tamaños de cada cepa viral y lo que genera una distribución de tamaño predeterminada de partículas virales.

5 En una realización, el análisis del perfil cromatográfico de una muestra purificada permite la diferenciación de todas las partículas virales integrales de fragmentos virales desintegrados. Por ejemplo, en el caso de FMDV, el presente método permite la diferenciación de todas las partículas de FMDV de los fragmentos desintegrados, como partículas 12S o capsómeros.

10 En otra realización, el análisis del perfil cromatográfico permite la detección de la desviación de tamaño de partículas virales como el virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), Herepesvirus Bovino 5 (BoHV-5), virus de Parainfluenza 3 (PIV-3), Rotavirus Bovino o virus de la Rabia en una muestra en comparación con la(s) muestra(s) de referencia del mismo virus y cepa.

15 En una realización, el análisis del perfil cromatográfico permite la cuantificación y caracterización del tamaño y la integridad de virus como el virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), el Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), el virus de Parainfluenza 3 (PIV-3), el Rotavirus Bovino y el virus de la Rabia de hasta 57 muestras por día de trabajo. En una realización, el análisis del perfil cromatográfico permite la cuantificación y caracterización del tamaño y la integridad de virus como el virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), el Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), el virus de Parainfluenza 3 (PIV-3), el Rotavirus Bovino y el virus de la Rabia de hasta 72 muestras por día de trabajo.

20 En una realización, la muestra de FMDV incluye, pero no se limita a, un sobrenadante de un cultivo celular infectado con FMDV, un producto intermedio del proceso de fabricación de la vacuna, un lote o banco de antígeno, una vacuna, un lote de vacuna monovalente o un lote de vacuna multivalente.

En una realización, la muestra de Rotavirus Bovino incluye, pero no se limita a, un sobrenadante de un cultivo celular infectado con Rotavirus, un producto intermedio del proceso de fabricación de la vacuna, un lote o banco de antígeno, una vacuna, un lote de vacuna monovalente o un lote de vacuna multivalente.

25 En una realización, la muestra de BoHV-5 incluye, pero no se limita a, un sobrenadante de un cultivo celular infectado con BoHV-5, un producto intermedio del proceso de fabricación de la vacuna, un lote o banco de antígeno, una vacuna, un lote de vacuna monovalente o un lote de vacuna multivalente.

En una realización, la muestra de PIV-3 incluye, pero no se limita a, un sobrenadante de un cultivo celular infectado con PIV-3, un producto intermedio del proceso de fabricación de la vacuna, un lote o banco de antígeno, una vacuna, un lote de vacuna monovalente o un lote de vacuna multivalente.

30 En una realización, la muestra de virus de la Rabia incluye, pero no se limita a, un sobrenadante de un cultivo celular infectado con Rabia, un producto intermedio del proceso de fabricación de la vacuna, un lote o banco de antígeno, una vacuna, un lote de vacuna monovalente o un lote de vacuna multivalente.

35 En una realización, las muestras de virus sin envuelta, como FMDV o Rotavirus Bovino, se tratan previamente de manera opcional con un disolvente antes de la inyección en la columna cromatográfica. En una realización, el disolvente usado en esta memoria es un disolvente no polar o soluble en lípidos que incluye, pero no se limita a, cloroformo, benceno, tolueno, hexano, pentano y octano. En una realización, el disolvente usado en esta memoria es un disolvente polar orgánico que incluye, pero no se limita a, metanol, etanol, isopropanol, diclorometano, acetona y acetonitrilo. En una realización, se usan uno o más tipos de disolventes juntos para el tratamiento previo de las muestras.

40 En una realización, la muestra de virus con envuelta o sin envuelta se trata previamente con una o más enzimas antes de la inyección en la columna cromatográfica. En una realización, la enzima es una nucleasa que incluye, pero no se limita a, una ADNasa, ARNasa, endonucleasa, exonucleasa y endonucleasa de restricción. En una realización, la enzima es Benzonase®, DNase TURBO™, endonucleasa T7, nucleasa-S1, nucleasa-P1 y Endonucleasa I. La nucleasa corta las moléculas de ADN grandes en moléculas de ADN más pequeñas que se pueden separar posteriormente por la columna cromatográfica.

En otra realización, la vacuna monovalente o la vacuna multivalente se trata previamente para eliminar los adyuvantes antes del tratamiento opcional con una nucleasa.

50 En una realización, se preparan la(s) muestra(s) de referencia o estándar de virus purificado para cada tipo o cepa infectando un cultivo de células de mamífero con el virus, inactivando el virus producido con un agente químico y uno o más de: ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión molecular.

En otra realización, la muestra de referencia o estándar de virus purificado se prepara eliminando el adyuvante de una vacuna de referencia que contiene el mismo virus.

En una realización, la presente invención proporciona un método para aislar y purificar partículas virales de productos

que contienen las partículas virales.

En otra realización, la presente invención proporciona un método de un control de calidad durante el proceso para determinar la cantidad y caracterizar la integridad y tamaño de antígenos virales que incluyen, pero no se limitan a, antígenos del virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), del Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), del virus de Parainfluenza 3 (PIV-3), del Rotavirus Bovino y del virus de la Rabia producidos en cada etapa del proceso de fabricación de una vacuna viral. Con un uso combinado de cromatografía de exclusión por tamaño y detección DLS en línea, la presente invención también proporciona una herramienta para monitorizar la cinética de la infección durante el proceso de producción del antígeno viral (véase el Ejemplo 7). Verificando tanto la cantidad como la calidad (p. ej., integridad y tamaño) del virus vivo, la presente invención permite un alto nivel de control en el proceso, de acuerdo con las directrices internacionales de la Tecnología Analítica de Procesos (PAT) que es el más alto estándar de calidad en la producción de vacuna veterinaria.

En una realización, el presente método es capaz de detectar si los productos virales específicos están contaminados con otros virus. Algunas veces, las células usadas para la producción de virus con envuelta o sin envuelta pueden estar contaminadas por otros virus o patógenos diferentes que también se pueden propagar en el sustrato del cultivo celular. Es posible que la SEC sola no sea capaz de eliminar o incluso detectar los virus contaminantes, ya que la mayoría de los virus son de gran tamaño y, por lo tanto, tanto los virus específicos de interés como los virus contaminantes se eluirán en el volumen de exclusión de la columna. Por el contrario, la presente invención es capaz de detectar la presencia de virus contaminantes u otros patógenos que tienen un tamaño diferente al virus específico deseado mediante el análisis del perfil DLS. Por ejemplo, los virus que son más grandes que el virus específico de interés darán lugar a un aumento en la intensidad de luz dispersada y/o Z-promedio en el pico. También es posible evaluar rápidamente el grado de contaminación comparando los perfiles DLS de las muestras contaminadas y no contaminadas. Como se ilustra en las Figuras 4-8, los cinco virus probados en la presente solicitud tienen cada uno sus propios perfiles de U.V. y DLS característicos, lo que indica que la presente invención puede diferenciar con sensibilidad diferentes tipos de virus o patógenos. Por lo tanto, la presente invención es capaz de determinar si una muestra se ha contaminado por otras moléculas como otros virus, patógenos u otros contaminantes que dieron como resultado perfiles cromatográficos o lecturas desviadas de las normales.

En una realización, el presente método se usa para evaluar si existen variaciones significativas entre varios lotes de vacunas o productos virales comparando sus perfiles de U.V. y DLS. Un conjunto constante de perfiles de U.V. y DLS indicaría que el flujo del proceso es normal y que se mantiene la calidad de los productos. Cualquier diferencia detectable en los perfiles de U.V. y DLS puede indicar un error o una desviación del flujo normal de proceso o una posible contaminación. Esto en última instancia proporcionaría un mejor control de calidad para garantizar la calidad y eficacia consistentes de los productos.

En otra realización, se proporciona un método para evaluar productos que contienen antígeno viral determinando la estabilidad del antígeno viral. El método de evaluación comprende la cuantificación y caracterización de la integridad y el tamaño de las partículas virales en una muestra en dos puntos temporales diferentes mediante el método de la presente invención y la cuantificación de los cambios ocurridos en la muestra y la desviación en el tamaño y/o integridad de las partículas virales durante los dos puntos de tiempo para medir la estabilidad del antígeno viral. El presente método también se puede usar para caracterizar partículas virales almacenadas a diferentes temperaturas o en diferentes tampones o formuladas con diferentes adyuvantes.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para evaluar y preparar vacunas monovalentes o multivalentes frente a enfermedades como la Fiebre Aftosa causada por FMDV, diarrea neonatal de los terneros causada por el Rotavirus Bovino G6 o G10, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina causada por BoHV-1, Encefalitis Herpética Bovina causada por BoHV-5, enfermedades respiratorias causadas por PIV-3 y la Rabia causada por el virus de la Rabia. Usando el método descrito en esta memoria, se puede realizar la cuantificación de la carga antigénica por dosis y la caracterización de la integridad y el tamaño de los antígenos formulados en la vacuna.

Se debe tener en cuenta que todos los métodos y sistemas descritos en esta memoria se pueden aplicar a todos los tipos, subtipos o cepas de virus, independientemente de que los virus sean conocidos o desconocidos, o que los virus estén purificados o contaminados con otras moléculas. La descripción y ejemplos de los cinco virus proporcionados en esta memoria tienen el propósito ilustrativo de mostrar los efectos técnicos y las ventajas de la presente invención y no pretenden limitar la invención como se reivindica. Un experto en la técnica puede ajustar los métodos y sistemas actuales de acuerdo con la presente descripción para satisfacer la necesidad específica de cuantificación y caracterización.

En una realización, la presente invención proporciona un método para la cuantificación y caracterización de uno o más tipos de virus o partículas virales que comprende las etapas de (a) tratar los especímenes que comprenden dichos virus o partículas virales con una o más enzimas para obtener una pluralidad de muestras virales; (b) aplicar una primera muestra viral a un sistema cromatográfico que comprende una pluralidad de bombas y una pluralidad de columnas cromatográficas, en donde (i) se conecta una primera bomba a una primera columna cromatográfica a través de una primera válvula, dicha primera columna está conectada además a través de una segunda válvula a un sistema de detección que comprende un detector de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) y un detector de UV; y (ii) una segunda bomba está conectada a una segunda columna cromatográfica a través de dicha primera válvula, dicha

- segunda columna está conectada además a través de dicha segunda válvula a un colector de residuos, en donde se ejecuta la primera muestra viral a través de la primera columna mientras se aplica un tampón de lavado a través de la segunda columna; (c) eluir la primera muestra viral de la primera columna y obtener un perfil cromatográfico para la cuantificación y caracterización de la primera muestra viral mediante dicho sistema de detección; (d) cambiar las conexiones para dichas primera y segunda bombas de modo que (i) dicha primera bomba está ahora conectada a dicha segunda columna a través de dicha primera válvula, dicha segunda columna esté además conectada a través de dicha segunda válvula a dicho sistema de detección; y (ii) dicha segunda bomba está ahora conectada a dicha primera columna a través de dicha primera válvula, dicha primera columna está además conectada a través de dicha segunda válvula a un colector de residuos; (e) aplicar una segunda muestra viral a la segunda columna mientras se aplica un tampón de lavado a la primera columna; (f) eluir dicha segunda muestra viral de dicha segunda columna y obtener un perfil cromatográfico para la cuantificación y caracterización de dicha segunda muestra viral mediante dicho sistema de detección y (g) repetir las etapas de (b) a (f) obteniendo, por lo tanto, la cuantificación y caracterización de dicha pluralidad de muestras virales.
- En una realización, dichos virus o partículas virales son virus con envuelta, virus sin envuelta, virus de ADN, virus de ARN, virus vivos, virus vivos atenuados, virus inactivados, virus recombinantes, vectores virales o partículas similares a virus. En una realización, los virus son virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1), virus de Parainfluenza 3 (PIV-3), Rotavirus Bovino, virus de la Rabia, Virus de la Diarrea Viral Bovina, Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV), Circovirus Porcino 2 (PCV-2), Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Bovino (PRRSV), Parvovirus Porcino (PPV) o virus de la lengua azul (BTV).
- En una realización, la primera y la segunda muestra viral comprenden el mismo tipo de virus o partículas virales. En otra realización, la primera muestra viral comprende virus o partículas virales diferentes de la segunda muestra viral.
- En una realización, los especímenes anteriores son sobrenadantes de cultivos celulares infectados por virus, un producto intermedio de un proceso de fabricación de vacuna, un lote o banco de antígeno, una vacuna, un lote de vacuna monovalente o un lote de vacuna multivalente.
- En una realización, las enzimas usadas en el método anterior son endonucleasas, exonucleasas, enzimas de restricción, ADNasas o ARNasas.
- En una realización, el tratamiento con una o más enzimas en la etapa (a) elimina las moléculas que interfieren en la cuantificación y caracterización de dichos virus. En otra realización, las muestras anteriores se tratan en un disolvente antes o después del tratamiento con dichas una o más enzimas en la etapa (a). Por ejemplo, el disolvente es un disolvente no polar como cloroformo, benceno, tolueno, hexano, pentano u octano.
- En una realización, el sistema cromatográfico anterior comprende dos columnas cromatográficas. En otra realización, el sistema cromatográfico comprende tres columnas cromatográficas.
- En una realización, el sistema cromatográfico comprende además un inyector automático para inyectar dichas muestras virales a las columnas cromatográficas. En otra realización, el sistema cromatográfico comprende además uno o más sistemas para integrar y controlar el funcionamiento de la pluralidad de componentes del sistema cromatográfico.
- En una realización, la cuantificación y caracterización anterior de virus comprende determinar el tamaño e integridad de dichos virus o partículas virales. En una realización, el perfil cromatográfico se compara con un perfil cromatográfico derivado de una muestra de referencia de virus purificados o se compara con un perfil cromatográfico derivado de partículas virales integrales completas para permitir la diferenciación de partículas virales integrales completas de fragmentos virales desintegrados.
- En una realización, las columnas cromatográficas anteriores se diseñan para separar partículas en el intervalo de 10-200 nm y pesos moleculares en el intervalo de 10^5 - 10^9 Daltons.
- En una realización, el método anterior es capaz de analizar los perfiles cromatográficos de hasta aproximadamente 60-70 muestras por día.
- En una realización, el método anterior separa grandes moléculas de ADN, moléculas lipídicas y partículas virales que tienen volúmenes de elución similares según se eluyen de la columna cromatográfica. En una realización, la cuantificación de virus es independiente de la concentración de los virus en dichas muestras virales.
- En una realización, la concentración de partículas FMDV presentes en una muestra es de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 750 $\mu\text{g/ml}$.
- La presente invención también proporciona un sistema para la cuantificación y caracterización de alto rendimiento de muestras que contienen partículas de virus, que comprende un inyector automático para inyección de muestras; dos o más columnas cromatográficas para separar las partículas virales, en donde las dos o más columnas cromatográficas son del mismo tipo o de diferentes tipos; dos o más bombas para accionar las dos o más columnas cromatográficas; al menos un detector de ultravioleta para producir un perfil cromatográfico de las partículas virales eluidas y determinar

la cantidad de dichas partículas virales eluidas; al menos un detector de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) para determinar el tamaño e integridad de las partículas virales eluidas; un recolector de residuos para recoger líquidos eluidos de las columnas cromatográficas; y un conjunto de múltiples válvulas que comprende dos o más válvulas para conectar la pluralidad de componentes del sistema.

- 5 En una realización, el sistema anterior analiza los perfiles cromatográficos de partículas virales que incluyen partículas virales con envuelta y sin envuelta, secuencialmente eluidas de cada una de las dos o más columnas cromatográficas, lo que determina así la cantidad, el tamaño y la integridad de las partículas virales de una manera de alto rendimiento y a tiempo real. En otra realización, el sistema además comprende uno o más sistemas de control para integrar y controlar el funcionamiento de la pluralidad de componentes del sistema.
- 10 La invención se entenderá mejor por referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son solo ilustrativos y no pretenden limitar la invención como se describe en esta memoria, que se define por las reivindicaciones que siguen a continuación.

A lo largo de esta solicitud, se citan varias referencias o publicaciones.

- 15 Se debe tener en cuenta que el término “que comprende”, que es sinónimo de “que incluye”, “que contiene” o “caracterizado por” es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas metodológicas adicionales no citadas.

Ejemplo 1

Preparación de muestras de referencia de FMDV

Este ejemplo ilustra el procedimiento para preparar muestras de referencia de partículas de FMDV para generar un volumen (o tiempo) de elución predeterminado y una distribución de tamaño predeterminada de partículas de FMDV.

- 20 Soluciones usadas:

Tampón de acondicionamiento de membranas de diálisis:

Volumen: 1 l.

Composición: NaHCO₃ 10 mM; EDTA 1 mM.

Tampón de diálisis:

- 25 Volumen: 5 l

Composición: NaCl 100 mM; Tris Base 50 mM; pH = 8

Tampón Tris:

Volumen: 5 l

Composición: NaCl 200 mM, Tris Base 20 mM; pH = 8

- 30 Suspensión viral:

Volumen: 200 ml

Composición: Cepa Campos O1 de FMDV

Procedimientos:

Etapas 1: Diálisis

- 35 Esta etapa se realizó para reducir la fuerza iónica de la suspensión del virus para permitir la digestión enzimática posterior sin aumentar el volumen de la muestra.

1. Se hirvieron las bolsas de diálisis en el tampón de acondicionamiento de membranas de diálisis durante al menos 30 minutos en un vaso de precipitado. Se enjuagaron 5 veces con agua y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

2. Se cerró el extremo inferior de las bolsas de diálisis y se rellenaron las muestras.

- 40 3. Se dializaron las muestras de suspensión viral cuatro veces frente a 800 ml del tampón de diálisis a 4°C durante 2 horas cada vez.

4. Se dializaron las muestras de suspensión viral frente a 1.800 ml del tampón de diálisis a 4°C durante toda la noche.

Etapa 2: Digestión enzimática

Esta etapa se realizó para eliminar impurezas sensibles a nucleasa de las muestras.

- 5 1. Preparación de enzima: en el momento de su uso, se diluyeron 25 µl de Benzonase® (250 U/µl) en 10 ml de tampón de diálisis precalentado a 37°C. La concentración final de la dilución de enzima: $25 \mu\text{l} \times 250 \text{ U}/\mu\text{l} = 6250 \text{ U}/10 \text{ ml} = 625 \text{ U/ml}$ de Benzonase®.
2. Digestión: Se fraccionó la suspensión viral dializada en tubos de centrifuga de 50 ml, a 24 ml por tubo. Se añadió a cada tubo 1 ml de la dilución de enzima. Se sellaron los tubos y se colocaron los tubos horizontalmente en un agitador orbital de plataforma precalentado a 37°C.
- 10 3. Se agitaron las muestras lo suficiente durante 2 horas para una buena agitación de la suspensión, pero se evitó la formación de espuma.

Etapa 3: Desalado mediante cromatografía de permeación en gel

Esta etapa se realizó para cambiar el tampón de las muestras de referencia y eliminar los componentes de bajo peso molecular de las muestras de referencia.

- 15 1. Se equilibró el medio Sephacryl S-300 con dos lavados de 500 ml de tampón Tris y se resuspendió el medio en un volumen final de 230 ml. El volumen total de la resina empaquetada fue de 150 ml y el volumen total de la columna preparativa era de 250 ml.
2. Se empaquetó la columna preparativa de cromatografía con resina Sephacryl S-300 equilibrada:
 - a. Se vertieron 230 ml de la suspensión en la columna.
 - b. Se dejó decantar la resina por gravedad durante toda la noche.
 - 20 c. Se colocó el disco de malla metálica en el gel.
 - d. Se añadieron 25 ml de tampón Tris-Sales sobre la malla metálica.
 - e. Se conectó el reservorio con tampón Tris.
 - f. Se pasaron 200 ml del tampón al reservorio.
 - g. Se desconectó el reservorio del tampón Tris.
 - 25 h. Se abrió el goteo de la columna hasta que el tampón alcanzó el nivel de la malla y luego se cerró el goteo.

Desalado/ Eliminación de componentes de bajo peso molecular:

- a. Se cargaron 43 ml de muestra sobre el gel.
- b. Se abrió el goteo y se dejó que la muestra entrase en el gel.
- 30 c. Se cargó la columna con 60 ml de tampón Tris. Se abrió el goteo y se recogió el eluido que contiene el virus. Se almacenó el eluido a 4°C.
- e. Se repitió hasta que terminasen de pasar todas las muestras. Si el volumen final de muestra a cargar en la columna es inferior a 43 ml, completar el volumen de la muestra a 43 ml con tampón Tris antes de cargarla en la columna.
- f. Se preparó un conjunto de eluidos recogidos.
- g. Se realizó un lavado final de columna con 300 ml de tampón Tris. Se desempaquetó la columna y se lavó la resina dos veces con 500 ml de etanol al 20% cada vez.
- 35

Etapa 4: Evaluación de muestras de referencia

Los eluidos obtenidos en la etapa 3 se sometieron a centrifugación en gradiente de sacarosa, titulación espectrofotométrica en UV y cromatografía de exclusión por tamaño para evaluar si se ha preparado una muestra purificada de partículas FMDV.

40 **Ejemplo 2**

Cuantificación y caracterización de partículas FMDV

Este ejemplo ilustra una realización de la presente invención para cuantificar y caracterizar la integridad y tamaño de partículas FMDV en muestras de procesos intermedios, independientemente de su pureza, y en el producto final, la

vacuna FMD, usando la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). En una realización, la señal U.V. se usa para determinar el área de pico para calcular la concentración viral, mientras que la DLS se usa para caracterizar el tamaño e integridad de las partículas virales.

Equipo y condiciones operativas:

- 5 • Cromatógrafo Infinity Agilent 1260 equipado con bomba, desgasificador en línea, inyector automático, módulo de enfriamiento de muestras, termostato de columna, detector de UV de longitud de onda variable y paquete informático PC Edition OpenlabCDS Chemstation.
- 10 • Columna cromatográfica: TOSOH Bioscience TSKgel G4000PWXL (7,8 mm ID x 30,0 cm l) o equivalente equipada opcionalmente con columna protectora TSKgel PWXL Guardcol (6,0 mm ID x 4,0 cm l) o equivalente y cartucho Phenomenex SecurityGuard GFC AJO-4489-4000.
- Bloque intercambiable Thermomixer de Eppendorf para bloque de 24 x 1,5 ml.
- Fase móvil GPC1 (Tris 30 mM, NaCl 400 mM, pH = 8).
- Benzonase®, Sigma E1014 – 25KU - ≥ 250 unidades/ μ l, $\geq 90\%$ (PAGE-SDS).
- Tampón de dilución de Benzonase® (Tris 50 mM, NaCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM).
- 15 • Dilución de trabajo de Benzonase® (1,25 U/ μ l).
- Tampón de dilución Tris 30 mM, pH 8.
- Analizador de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) Malvern Zetasizer Nano S ZEN1600 con paquete informático Zetasizer v. 7.02.
- Kit de operación en modo de flujo con celda de flujo Hellma Analytics 176.751-QS ZEN0116.

20 Procedimiento de análisis:

a) Pretratamiento de muestras

i. Extracción con cloroformo

(1) Sobrenadantes de infecciones de cultivos celulares, fase acuosa antes de la formulación de la emulsión y concentrados de ultrafiltración.

- 25 Se fraccionaron 5 ml de muestra en tubos de centrifuga de 15 ml y se añadieron 5 ml de cloroformo. Las muestras y el cloroformo se agitaron vigorosamente durante 2 minutos y luego se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C. La capa acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml. La extracción con cloroformo se repitió durante una segunda vez y la capa superior se recuperó nuevamente en otro tubo nuevo. Para los concentrados de virus de ultrafiltración se realizó una dilución adicional agregando 1 ml de una solución Tris 30 mM, pH = 8 a 2 ml de muestra
- 30 extraída con cloroformo con el fin de reducir la fuerza iónica antes de la digestión enzimática.

(2) Concentrados virales preparados por precipitación con PEG.

Se tomaron muestras de 10 ml de concentrado viral con agitación magnética vigorosa constante para evitar que el precipitado se asentara. La muestra se transfirió a un vaso de precipitados de 250 ml y se diluyó hasta un volumen final de 100 ml con Tris 30 mM, NaCl 100 mM, pH = 8 y se agitó magnéticamente durante toda la noche a 4°C. Se sometieron 5 ml del concentrado diluido a extracción con cloroformo como se describió en el párrafo anterior.

35

(3) Emulsión de agua en aceite de vacuna FMD.

Se fraccionaron 20 ml de vacuna comercial a base de aceite en un tubo de centrifuga de 50 ml. Se añadieron 20 ml de cloroformo al tubo; se agitó vigorosamente durante 5 minutos y luego se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de 50 ml. Se añadió una segunda porción de 20 ml de cloroformo al tubo, se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de 50 ml. Esta fase acuosa recuperada es la muestra a analizar para la vacuna FMD de emulsión de agua en aceite.

40

ii. Digestión enzimática

- 45 Las muestras recuperadas se pueden usar directamente o someterse a un tratamiento previo como se describe en la sección anterior, cuando sea apropiado. Se transfirió 1 ml de muestra obtenida en el procedimiento de recuperación (i) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se añadieron 20 μ l de dilución de trabajo de Benzonase® (1,25 U/ μ l) es decir, se añadieron 25 U de Benzonase® al tubo, y se agitó a 37°C a 1400 rpm (alta velocidad) en un Thermomixer Eppendorf durante 60 minutos. El tubo de muestra se retiró del termomezclador y se centrifugó a 16.000 g a 4°C durante 10

minutos. Se recogió el sobrenadante del tubo cuidando de no alterar el sedimento y se cargó en un vial de HPLC que se tapó finalmente. La(s) muestra(s) de referencia o calibración preparadas como se describió anteriormente se usaron directamente o se trataron previamente de la misma manera que las muestras analizadas antes de realizar el análisis cromatográfico. El mezclador orbital de alta velocidad, controlado por microprocesador y temperatura regulada para tubos de microcentrífuga de Eppendorf permite realizar una digestión enzimática de hasta 24 digestiones simultáneamente con los requisitos de volumen de muestra reducido de HPLC.

b) Análisis cromatográfico

Se programó la secuencia de muestras a inyectar con el método apropiado para cada tipo de muestra. Se conectó la línea de elución cromatográfica: las muestras se pasaron a través de la columna de cromatografía, el detector de U.V. y luego la celda de flujo Hellma en el analizador DLS ZEN1600. Se estableció la lista de reproducción adecuada en el programa informático Zetasizer del analizador DLS. El pico de virus con un tiempo de retención de aproximadamente 15 a 16 minutos (o el volumen de elución correspondiente) se integró (el tiempo exacto depende de las condiciones de elución cromatográfica usadas). La concentración de FMDV en las muestras control se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{FMDV } [\mu\text{g/ml}] = (\text{Área} \times 10 \times 1,02) / (F_t \times 72 \times b \times \text{Vol}_{\text{iny}})$$

donde:

Área: es el área bajo la curva. Puede tener unidades de mAU*s, mAU*min o mAU*ml

10: es un factor de conversión unitario.

1,02: es un factor de corrección de dilución para la adición de la solución de Benzonasa, si corresponde.

72: es el coeficiente de absorción de masa publicado $254E^{1\%}$ de FMDV.

F_t : es el factor de tiempo de flujo, igual a 120 para el Área en mAU*s, 2 para el Área en mAU*min y 1 para el Área en mAU*ml para un flujo cromatográfico de 0,5 ml/min.

b: es la longitud del camino óptico de la célula de flujo de U.V. en cm.

Vol_{iny} : es el volumen inyectado en ml.

Para los concentrados de virus de ultrafiltración, el resultado se multiplicó por un factor de 1,5 para tener en cuenta la dilución 2/3 requerida antes de la digestión enzimática.

La gráfica Señal de flujo vs. Volumen/gráfica de Tiempo se generó en el programa informático DLS Zetasizer. La señal de pico FMDV se identificó por su tiempo de elución /volumen y se registró el diámetro Z-promedio (d.nm) del pico.

La validez de todo el procedimiento de análisis se confirmó mediante los siguientes parámetros: a) la pendiente de la curva de calibración, obtenida con las muestras de control fue de 86,4 (mAU*s)/(mg/ml) +/- 8,64; b) el valor absoluto de la intersección x fue inferior al 10% de las concentraciones promedio de las muestras control y c) el diámetro Z-promedio del pico FMDV está entre 28 y 40 nm.

En una realización, el presente método se valida en base a parámetros como selectividad, pureza de pico, precisión, linealidad de respuesta, repetitividad, precisión intermedia y límites de detección y cuantificación determinados a partir de muestras de referencia o estándar de FMDV de la misma cepa viral. En una realización, se incluyeron dos muestras de referencia o estándar cada una de las cuales representa una cantidad alta o baja de FMDV en cada prueba para fines de validación. En una realización, se incluyeron uno o más controles negativos libres de virus como una muestra celular de mamífero que se ha lisado mediante ciclos de congelación/descongelación y tratados previamente de manera similar a las muestras FMDV en la prueba para validar el resultado.

Una vez que se confirmó válida la prueba, se determinó el valor de las muestras analizadas por cálculo directo o por extrapolación del valor del área obtenido en la curva de calibración establecida con las muestras control.

En una realización, la longitud de la columna usada en la presente invención es de 30 cm. En general, una columna más corta proporciona un recorrido más corto pero una resolución más baja especialmente para partículas con volúmenes hidrodinámicos similares. Un experto en la técnica puede ajustar la longitud de la columna de acuerdo con el tipo de muestras de interés.

En una realización, se usa una columna TOSOH Bioscience TSKgel G4000PWXL de exclusión por tamaño para aislar de manera suficiente las partículas FMDV de los contaminantes en una cromatografía corta. Dependiendo de la naturaleza de las muestras, se pueden usar resinas de otros tamaños de poro o en otras formas o materiales para preparar la presente columna de exclusión por tamaño. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tamaño de poro de la resina no solamente afecta a la resolución de la separación, sino que también afecta al tiempo total de ejecución. Por ejemplo, tardaría más tiempo para eluir el FMDV si el tamaño de poro es lo suficientemente grande para que entre

el virus y, por lo tanto, alarga todo el proceso de separación.

Interpretación de resultados

Análisis de la muestra de referencia del virus FMD Campos 01 y evidencia de su desintegración después del tratamiento térmico

- 5 Este ejemplo muestra evidencia directa sobre cómo el método de la presente invención permite la cuantificación y la caracterización de la integridad y tamaño de partículas de virus FMD.

Este ejemplo muestra también cómo el método de la presente invención puede detectar fragmentos (12S o capsómeros) de las partículas desintegradas después del tratamiento térmico y digestión con nucleasa (Benzonase®) de la muestra de referencia FMDV Campos 01 purificada.

- 10 La Figura 1A muestra los perfiles cromatográficos en U.V. a 254 nm de FMDV Campos 01 purificado. El perfil cromatográfico muestra un único pico con un volumen de elución de 6,33 ml. El cálculo de la concentración de virus basado en el área bajo la curva produjo una concentración de 421,7 µg/ml, usando la fórmula: $FMDV [\mu g/ml] = (\text{Área [mAU*ml]} \times 10) / (1 \times 72 \times 0,5 [cm] \times 0,1 [ml])$. La Tabla 1 enumera los resultados del análisis cromatográfico en UV del pico de elución.

- 15 Tabla 1. Parámetros cromatográficos de FMDV Campos 01 purificado

Pico	Volumen de elución (ml)	Área (mAU*ml)	Altura (mAU)
1	6,33	147,1057	217,037

La señal de intensidad de dispersión de la luz, como se presenta en la Figura 1B (línea continua) registrada en el detector DLS también muestra un único pico con un ligero sesgo hacia la izquierda en el mismo intervalo de volumen. La señal Z-promedio (puntos) indica que este pico se produce por partículas con un diámetro promedio de 29,28 nm. Esta medida es consistente con el diámetro conocido de tamaño de partícula viral FMDV. La Tabla 2 enumera los resultados del análisis DLS del pico de elución.

- 20

Tabla 2. Análisis DLS de FMDV Campos 01 purificado

Pico	Volumen de partida (ml)	Volumen final (ml)	Tamaño (d.nm)	% Int.	DLS SD (d.nm)	MW estimado (kDa)
1	6,56	7,3	29,28	100,0	2,271	1800

- 25 La Figura 2A muestra los perfiles cromatográficos en UV a 254 nm de FMDV Campos 01 purificado después de incubación a 56°C durante 1 hora y posterior digestión con Benzonase®. Se sabe que el tratamiento térmico a esta temperatura desmonta la partícula viral en partículas 12S y/o capsómeros y expone al ARN viral a digestión con nucleasas. La Tabla 3 enumera los resultados del análisis cromatográfico en UV de los picos de elución.

Tabla 3. Parámetros cromatográficos de FMDV Campos 01 purificado después de tratamiento térmico/enzimático

Pico	Volumen de elución (ml)	Área (mAU*ml)	Altura (mAU)
1	7,54	2,6846	5,946
2	9,83	172,3857	265,774

- 30 El perfil cromatográfico en U.V. a 254 nm de FMDV Campos 01 purificado después de tratamiento térmico/enzimático mostró dos picos, uno pequeño a 7,54 ml y uno grande a 9,83 ml. El pico observado en el perfil cromatográfico de la muestra de referencia Campos 01 antes del tratamiento (volumen de elución 6,33 en la figura 1A) ha desaparecido totalmente en este perfil cromatográfico.

- 35 La señal de intensidad de dispersión de la luz, como se presenta en la Figura 2B (línea continua) en el detector DLS muestra dos señales. La Tabla 4 enumera los resultados del análisis de los picos de elución.

Tabla 4. Análisis DLS de FMDV Campos 01 purificado después de tratamiento térmico/enzimático

Pico	Volumen de partida (ml)	Volumen final (ml)	Tamaño (d.nm)	% Int.	DLS SD (d.nm)	MW estimado (kDa)
1	6,27	6,6	33,42	6,2	2,606	2450
2	7,21	9,48	13,03	93,8	1,371	270

El primero, entre 6,27 ml y 6,6 ml de volumen de elución, representa solo el 6,2% de la luz dispersada y no se correlacionó con una detección U.V. significativa. La señal Z-promedio mostró para este pico un tamaño variable que oscilaba entre 20 y 60 nm con un Z-promedio de 33,42 nm. Según se confirmó con el análisis de transferencia de Western Blot con anticuerpos frente a proteínas virales FMDV, este pico se produjo por partículas virales FMD que no se desintegraron con el tratamiento (datos no mostrados).

El segundo pico de intensidad, con un diámetro Z-promedio de 13,03 nm en el intervalo de volumen de elución de 7,21 a 9,48 ml, se correlacionó con el pico más pequeño de 7,54 ml en el perfil de U.V. a 254 nm. Este pico produjo señales intensas en el análisis por western blot (datos no mostrados). En base al tamaño y la reactividad, se atribuyó este pico a fragmentos degradados de FMDV (partículas 12S y/o capsómeros) que estaban constituidos en un 100% por proteínas y, por lo tanto, mostraban una propiedad de baja absorción a 254 nm (indicado por el pico a 7,54 ml en la Figura 2A).

El pico alto eluido a 9,83 ml observado en el perfil cromatográfico de U.V. (Figura 2A) no se detectó por el detector DLS (Figura 2B). Este resultado era consistente con los ribonucleótidos y/o oligorribonucleótidos producidos después de la digestión con Benzonase® del genoma viral de ARN de FMDV.

Ejemplo 3

Efecto de la extracción con cloroformo y la digestión con benzonasa en la cuantificación de partículas virales sin envuelta en un preparado de concentrado viral por precipitación con PEG

Este ejemplo ilustra la utilidad de los tratamientos combinados de digestión con nucleasas y extracción con disolventes. En una realización, se usó la digestión con Benzonase® para eliminar los ácidos nucleicos celulares contaminantes y se usó la extracción con cloroformo para limpiar los contaminantes lipídicos.

Equipo y condiciones de operación:

El equipo, reactivos y soluciones fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 2 excepto las siguientes diferencias:

- Cromatógrafo: Akta Purifier UPC-10 de General Electric con detectores de conductividad y de longitud de onda UV fija de 254/280 nm con paquete informático control Unicorn.

- Tampón de dilución para virus concentrado con PEG: Tris 30 mM, NaCl 100 mM, pH = 8.

Procedimiento de análisis:

El sobrenadante de cultivo celular de células BHK en suspensión infectadas con FMDV Campos 01 se inactivó químicamente y se concentró 50 veces (50X) por precipitación mediante la adición de una solución concentrada de PEG 6000, para alcanzar una concentración final de PEG de 5,5%. Después de 72 horas de precipitación, se descartó el sobrenadante y se recogió el concentrado de FMDV 50X.

El concentrado de virus recogido se diluyó posteriormente 10 veces con Tampón de Dilución Tris 30 mM, NaCl 100 mM, pH = 8 y se agitó magnéticamente durante toda la noche a 4°C para reducir la concentración de PEG y permitir que las partículas virales vuelvan a una forma soluble.

a) Pretratamiento de muestras

Se trataron cuatro alícuotas diferentes de la muestra de concentrado de FMDV diluido antes de la prueba cromatográfica de la siguiente manera:

i) Se añadieron 5 ml de cloroformo a 5 ml de muestra y se agitó vigorosamente para mezclar completamente. Se centrifugó la mezcla para romper la emulsión formada y se recuperó la capa acuosa superior mediante pipeteo.

ii) Se digirieron enzimáticamente 2 ml de muestra con Benzonase® como se describe en el Ejemplo 2.

iii) Se digirió enzimáticamente una alícuota acuosa de 2 ml recuperada de la alícuota i) con Benzonase® como se describe en el Ejemplo 2.

iv) No se trataron 2 ml de muestra, ni con extracción con cloroformo ni con digestión enzimática.

Las cuatro alícuotas se centrifugaron a 16000 g antes del análisis cromatográfico para eliminar cualquier material insoluble y los sobrenadantes resultantes se transfirieron a tubos nuevos sin alterar el sedimento.

b) Análisis cromatográfico

5 El análisis cromatográfico de las cuatro alícuotas se realizó como se describe en el Ejemplo 2. El volumen de inyección fue de 100 μ l y la absorbancia se monitorizó a 254 nm.

Interpretación de resultados

Los resultados se muestran en la Figura 3. En la Figura 3A, se realizó una comparación entre muestras sin tratar y totalmente tratadas. En la muestra no tratada, el pico del virus no se resolvió de los picos de ácidos nucleicos y eluyó como un "hombro". En este caso, no fue posible lograr una integración precisa del pico de virus debido a los contaminantes de ácido nucleico. Por el contrario, en la muestra tratada, se ajustó el pico del virus a un pico simétrico en forma de "campana de Gauss" que se resolvió hasta la línea de base. La Figura 3B ilustra el efecto de omitir el tratamiento enzimático en muestras extraídas con cloroformo mostrando que las principales diferencias en la forma del pico del virus se debieron a esta etapa de digestión. La Figura 3C destaca el punto de que incluso después de la digestión enzimática, algunos residuos lipídicos de alto peso molecular permanecieron en el volumen excluido. Estos contaminantes lipídicos se podrían eliminar por extracción con cloroformo. No realizar este paso, puede, por lo tanto, llevar a la sobreestimación del contenido del virus en la muestra.

Ejemplo 4

Determinación de la estabilidad de vacunas que contienen virus con envuelta y sin envuelta

20 Este ejemplo ilustra una realización de la presente invención para determinar la estabilidad de una vacuna viral. Las vacunas que contienen partículas virales en un momento inicial y más tarde después del almacenamiento a 4°C se pueden analizar usando el método como se describe en esta memoria. Los perfiles de U.V. y DLS obtenidos se analizan para calcular la cantidad y el tamaño de las partículas virales. El cambio en el número de partículas virales tras el almacenamiento se puede interpretar en términos de porcentaje de las partículas iniciales. La integridad de las partículas virales también se puede evaluar comparando los perfiles obtenidos.

Ejemplo 5

Cuantificación y caracterización de partículas virales sin envuelta en alta concentración

30 Este ejemplo ilustra la aplicación de la presente invención a muestras de virus sin envuelta altamente concentradas obtenidas por ultrafiltración. En una realización, este ejemplo ilustra la aplicación de la presente invención a una muestra de FMDV altamente concentrada. En otra realización, este ejemplo ilustra la aplicación de la presente invención a una muestra concentrada de Rotavirus.

En una realización, este ejemplo también ilustra la cuantificación y la caracterización de diluciones en serie de antígenos de FMDV que se prepararon a partir del concentrado de antígeno obtenido mediante un proceso de ultrafiltración. En otra realización, este ejemplo también ilustra la cuantificación y la caracterización de diluciones en serie de antígenos de Rotavirus que se prepararon a partir del concentrado de antígeno obtenido mediante proceso de ultrafiltración.

I. Análisis de muestras de FMDV altamente concentradas

Equipo y condiciones de operación:

El equipo usado y los procedimientos realizados fueron los mismos que se describen en el Ejemplo 2.

40 Procedimiento de análisis:

La infección de las células BHK por la cepa Campos 01 en cultivo en biorreactores produjo un material de baja concentración que se inactivó inmediatamente por inactivación química con solución de etilenimina. La suspensión viral Campos 01 se concentró luego mediante un proceso de ultrafiltración para alcanzar un factor de concentración alto de 150X. Durante el proceso de concentración, se monitorizó cuidadosamente la concentración y la calidad del virus en la muestra con el fin de evaluar los rendimientos del proceso y la integridad de los antígenos concentrados. Se estimó que la concentración de virus de esta suspensión viral estaba en el intervalo de 700 a 800 μ g/ml según el volumen inicial de la suspensión viral, las relaciones de reducción de volumen y las determinaciones de HPLC a lo largo del proceso de ultrafiltración. Se prepararon tres series de diluciones en serie en tres días diferentes de acuerdo con el esquema de dilución que se muestra en la Tabla 5. Las tres muestras de dilución viral en serie se pretrataron y analizaron con inyección duplicada para cada muestra usando el método descrito en el Ejemplo 2 usando un cromatógrafo Infinity Agilent 1260. También se analizaron muestras tanto de FMDV concentrado puro como de tampón de dilución. El tampón usado para la dilución de la muestra tiene la siguiente composición: NaCl 300 mM; Tris Base

20 mM; pH = 8.

Tabla 5. Esquema de dilución de FMDV concentrado para la preparación de las diferentes muestras de FMDV.

Muestra	0	1	2	3	4	5
% de FMDV concentrado (en volumen)	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Volumen de FMDV concentrado (µl)	0	200	400	600	800	1000
Volumen de tampón de dilución (µl)	1000	800	600	400	200	0

5 Se analizaron las áreas de pico en U.V. resultantes y se dedujo la concentración de partículas de virus FMD para cada muestra. Los resultados de la inyección duplicada se promediaron para cada conjunto de dilución en serie. Las concentraciones virales determinadas se representaron frente al porcentaje de concentración. Se usó el promedio final de las tres series para realizar el análisis de regresión. Se capturaron de manera continua los datos de dispersión dinámica de la luz usando un instrumento DLS Malvern Nano S conectado en línea con el HPLC a una frecuencia de muestreo de una lectura cada 10 segundos. Las lecturas correspondientes al pico de virus se seleccionaron para el análisis del diámetro Z-promedio en el paquete informático Malvern Zetasizer v. 7.02.

Resultados:

15 La Figura 4 muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno de FMDV obtenido mediante ultrafiltración. La Figura 4B muestra la superposición de los perfiles cromatográficos obtenidos de las cinco muestras de FMDV analizadas, que van del 20% al 100% del FMDV concentrado. La Figura 4C muestra la superposición del perfil cromatográfico de UV a 254 nm y el perfil cromatográfico DLS para una de las muestras. La superposición de los perfiles de U.V. y de DLS muestra claramente que el pico de virus FMD registrado mediante U.V. es el único pico que genera una intensidad significativa de luz dispersada cuando se registra mediante DLS. Este resultado indica que las partículas virales de FMD en esta muestra son las únicas especies de moléculas lo suficientemente grandes como para dispersar la luz a una intensidad lo suficientemente alta como para ser detectadas por el detector DLS.

20 Como se indica en la Figura 4D, se obtuvo un coeficiente de determinación muy alto R^2 (0,9984) que muestra una asociación constante y robusta entre la concentración viral estimada y la concentración viral real de la muestra, lo que sugiere que la presente invención puede estimar con precisión la concentración viral en una amplia gama de concentraciones virales. Las determinaciones de tamaño de partícula de DLS en línea mostraron lecturas constantes que oscilaron entre 29,9 y 34,2 nm y consistentes con la partícula de FMDV en todo el intervalo de concentración evaluado (véanse la Figura 4D y la Tabla 6). Todos los resultados obtenidos de los registros de U.V. y DLS se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis ultravioleta y de DLS de los tres grupos de muestras de dilución en serie de FMDV concentrado

% de FMDV concentrado en volumen	1ª dilución en serie promedio (µg/ml)	2ª dilución en serie promedio (µg/ml)	3ª dilución en serie promedio (µg/ml)	Promedio final (µg/ml)	Diámetro Z-promedio (nm)
0%	0,0	0,0	0,0	0,0	/
20%	145,3	131,8	133,2	136,8	32,0
40%	283,0	273,6	273,9	276,8	32,7
60%	433,7	432,7	424,9	430,4	34,2
80%	581,0	629,2	600,2	603,5	29,9
100%	730,4	761,3	689,3	727,0	31,6

30 II. Análisis de muestras del serotipo G6 de Rotavirus Bovino concentrado.

El equipo usado y los procedimientos realizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 2 excepto las siguientes diferencias:

Equipo y condiciones de operación:

35 - Equipo cromatográfico: se usó un cromatógrafo Äkta Purifier UPC-10 de General Electric Healthcare equipado con bomba binaria, detector de UV de longitud de onda fija de 254/280 nm, detector de conductividad y paquete informático

Unicorn de control y adquisición de datos.

- Columna cromatográfica: se usó TOSOH Bioscience TSKgel G4000PWXL (7,8 mm ID x 30,0 cm L) o equivalente sin columna protectora o cartucho.

- Bloque intercambiable de Eppendorf Thermomixer adecuado para diferentes tubos de centrifuga.

5 - TURBO™ DNasa (2 U/μl) , catálogo # AM2238; Life Technologies.

- Tampón 10X de TURBO™ DNasa según lo suministra el fabricante; Life Technologies.

- Se controló el analizador ZEN1600 de Dispersión Dinámica de la Luz Malvern Zetasizer Nano S y se analizaron los datos con el paquete informático Zetasizer v. 7.11.

Procedimiento de análisis:

10 Se infectó un cultivo de células MA104 de riñón de mono verde africano (*Cercophitecus aethiops*) con el serotipo G6 de Rotavirus Bovino. Se inactivó el sobrenadante de cultivo con solución de formaldehído y se concentró mediante ultrafiltración hasta alcanzar un factor de concentración de 13,4X. Se preparó una solución de placebo (control negativo) mediante congelación y descongelación repetidas de un cultivo celular.

Dilución de la muestra:

15 Se preparó una dilución en serie de la muestra usando el placebo como diluyente.

Tabla 7. Esquema de dilución de concentrado de Rotavirus Bovino G6 para la preparación de diferentes muestras de Rotavirus.

Muestra	1	2	3	4	5	6
% de concentrado (en volumen)	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Volumen de Rotavirus concentrado (ml)	0	1	2	3	4	5
Volumen de solución de placebo (ml)	5	4	3	2	1	0

Pretratamiento de la muestra:

20 a) Extracción con cloroformo:

Se extrajeron diluciones de las muestras de la etapa anterior con cloroformo como se describe en el Ejemplo 3 a) (i) y se recuperó la capa acuosa superior.

b) Digestión enzimática:

25 i) Se añaden a cada 4,5 ml de cada muestra obtenida en la etapa previa 500 μl de tampón 10X de TURBO™ DNasa y 5 μl de TURBO™ DNasa (2 U/μl).

ii) Se realizó una incubación de 60 minutos a 37°C y 750 rpm usando el Thermomixer Eppendorf con un termobloque adecuado para tubos de 15 ml.

30 iii) Se transfirió 1 ml de cada muestra a un tubo de microcentrifuga Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 16000 g a 4°C durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante pipeteando a un tubo nuevo teniendo cuidado de no distorsionar el sedimento para evitar obstruir la columna cromatográfica.

Carrera cromatográfica:

i) Se inyectaron 100 μl de cada muestra centrifugada y digerida usando un bucle de medición en una válvula de inyección automática.

35 ii) Se llevó a cabo una carrera isocrática en fase móvil GPC1 a un flujo constante de 0,5 ml/min monitorizando a 254 nm en el detector de U.V. para obtener el perfil de U.V. con el detector Malvern Zetasizer en una configuración en serie para adquirir la intensidad de luz dispersada DLS y el Z-promedio.

iii) Se capturó el perfil U.V. y se analizó usando el paquete informático Unicorn y se recogió la intensidad de luz dispersada y el Z-promedio del diámetro de partícula y se analizó con el paquete informático Malvern Zetasizer v. 7.11.

Resultados:

La Figura 5A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno de Rotavirus Bovino obtenido mediante la ultrafiltración. La Figura 5B muestra la superposición de perfiles cromatográficos obtenidos de las cinco muestras de Rotavirus analizadas que van del 20% al 100% del concentrado de Rotavirus.

5 La Figura 5C muestra la superposición del perfil cromatográfico UV a 254 nm y el perfil cromatográfico DLS para una de las muestras. La superposición de los perfiles de U.V. y de DLS muestra claramente que el pico de Rotavirus identificado registrado por U.V. es el único pico que genera una intensidad de luz dispersada cuando se registra mediante DLS. Este resultado indica que las partículas virales de Rotavirus en esta muestra son las únicas especies de moléculas lo suficientemente grandes para dispersar la luz a una intensidad lo suficientemente alta para ser detectada por el detector DLS.

10 Como se indica en la Figura 5D, se obtuvo un coeficiente de determinación muy alto R^2 (0,9997) que muestra una asociación constante y robusta entre la concentración viral estimada y la concentración viral real de la muestra, lo que sugiere que la presente invención puede estimar con precisión la concentración de partículas de Rotavirus en un amplio intervalo de concentración viral.

15 Las determinaciones de DLS en línea de tamaño de partícula mostraron lecturas constantes que oscilan de 63,2 a 72,8 nm y consistente con la partícula de Rotavirus en todo el intervalo de concentración evaluado (véanse la Figura 5D y la Tabla 8). Todos los resultados obtenidos de las señales de ultravioleta y de DLS se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de ultravioleta y de DLS de un concentrado de Rotavirus y sus muestras diluidas en serie.

% de concentrado de virus (en volumen)	Área de pico (mAU.ml)	Área de pico corregida (mAU.ml)	Tamaño de partícula (nm)
0	0,00	0,00	-
20	16,96	16,96	72,8
40	32,55	32,55	71,9
60	49,17	49,17	63,2
80	65,26	65,26	63,4
100	83,26	83,26	67,3

20 III. Interpretación de resultados.

Este ejemplo ilustra que la presente aplicación es capaz de generar mediciones precisas en un amplio intervalo de concentraciones virales para virus sin envuelta.

25 En una realización, este ejemplo muestra que la presente solicitud es capaz de generar mediciones precisas para partículas virales como FMDV y Rotavirus Bovino en un amplio intervalo de concentraciones virales como lo indica la alta linealidad la concentración viral determinada a partir de varias muestras virales diluidas a partir de un alto concentrado viral.

Este ejemplo muestra la capacidad de la presente invención para caracterizar de manera consistente y precisa el tamaño del antígeno FMDV o de Rotavirus Bovino y la integridad independiente de la concentración viral.

30 Este ejemplo demuestra que la presente invención se puede usar con gran precisión para cuantificar la concentración viral a partir de sobrenadante de infección de baja concentración a concentrados altos de partículas de FMDV, hasta 150X y 727 $\mu\text{g/ml}$ como se prueba en este ejemplo. Además, se ha demostrado que la detección de DLS en línea es capaz de caracterizar el tamaño y la integridad de la partícula viral con gran precisión y consistencia a lo largo de todo el intervalo de concentración de las partículas virales. Esta característica es particularmente importante durante este tipo de proceso de concentración ya que ciertas condiciones variables del proceso, como temperatura, pH y la velocidad de ruptura podrían tener un dramático impacto en la integridad de las partículas virales. Por lo tanto, la presente invención representa la última herramienta de la Tecnología Analítica de Procesos (PAT) para asegurar la calidad del antígeno concentrado producido, sin importar lo alta que sea la concentración final.

35 Basándose en consideraciones de error espectrofotométrico se puede razonablemente anticipar que las concentraciones que son dos o tres veces más altas que la medida en este experimento se pueden cuantificar con precisión con el presente método, alcanzando el rango superior a aproximadamente 2250 $\mu\text{g/ml}$ para las partículas FMDV. Esto se basa en el hecho de que los errores fotométricos son bastante bajos en el intervalo de 100 mAU a 1500 mAU. También es posible inyectar un volumen de muestra más pequeño, p. ej., 50 μl en lugar de 100 μl o simplemente diluir la muestra de acuerdo con la concentración anticipada y corregir el resultado obtenido por el factor de dilución. Por consiguiente, el presente método puede funcionar en un intervalo de concentración que va mucho más allá de la necesidad de cualquier proceso de fabricación práctico.

Los detectores de Dispersión Dinámica de la Luz funcionan rutinariamente con muestras de proteína del orden de 2 mg/ml o más. Por lo tanto, no hay duda de que el método de detección DLS en línea descrito en la presente invención funcionaría perfectamente bien con muestras con una mayor concentración como la que se describe en este ejemplo.

5 Las etapas de concentración típicas en procesos de fabricación de vacunas FMD alcanzan concentraciones que oscilan entre 10X y 60X de la concentración del virus obtenida durante la etapa de infección en cultivo celular. Sin embargo, cuando el objetivo es producir un banco de antígeno viral de FMD muy altamente concentrado, la etapa de concentración se puede continuar hasta alcanzar un factor de concentración de 150X e incluso 200X. En este ejemplo, el material de virus altamente concentrado con una concentración medida de 727 $\mu\text{g/ml}$ corresponde a un factor de concentración de 150X. Aunque el límite superior para el factor de concentración se debe determinar caso por caso para cada cepa viral de virus FMDV, se puede estimar razonablemente que se puede alcanzar la concentración de antígenos FMDV de hasta 1250 $\mu\text{g/ml}$ (o 1,25 mg/ml) o mayor sin causar un impacto negativo en la solubilidad de las partículas de FMDV.

10 Como se demuestra en este ejemplo, el método de la presente invención es muy adecuado para cuantificar y caracterizar partículas virales sin envuelta en muestras muy altamente concentradas y, por lo tanto, se puede aplicar a bancos de antígenos de FMDV ultraconcentrados o bancos de antígenos de Rotavirus Bovino.

15 Como referencia, la concentración de virus usual en vacunas varía de acuerdo con las cepas virales, requerimientos de las agencias reguladoras nacionales y las propiedades farmacológicas de la vacuna. Los tipos más comunes de vacunas de FMD son emulsiones de agua en aceite o las emulsiones dobles de agua en aceite en agua. Las fases acuosas usadas para preparar las emulsiones varían en la concentración de virus de aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$ a 60 $\mu\text{g/ml}$.

20 Ejemplo 6

Cuantificación y caracterización de partículas virales con envuelta en alta concentración

Este ejemplo ilustra la aplicación de la presente invención a muestras de virus con envuelta concentradas obtenidas por ultrafiltración. En una realización, este ejemplo ilustra la aplicación de la presente invención a una muestra concentrada de BoHV-5. En otra realización, este ejemplo ilustra la aplicación de la presente invención a una muestra concentrada de PIV-3. En otra realización, este ejemplo ilustra la aplicación de la presente invención a una muestra concentrada de virus de la Rabia.

En una realización, este ejemplo también ilustra la cuantificación y la caracterización de diluciones en serie de antígenos BoHV-5, antígenos PIV-3 y antígenos de virus de la Rabia que se prepararon a partir del concentrado de antígeno obtenido por un proceso de ultrafiltración.

30 I) Análisis de muestras concentradas de BoHV-5

El equipo usado y procesos realizados fueron los mismos que se describen en el Ejemplo 2 con las siguientes diferencias:

Equipo y condiciones de operación:

35 - Equipo cromatográfico: se usó un cromatógrafo Äkta Purifier UPC-10 de General Electric Healthcare equipado con bomba binaria, detector de UV de longitud de onda fija de 254/280 nm, detector de conductividad y paquete informático Unicorn de control y adquisición de datos.

40 - Columna cromatográfica: columna de vidrio de borosilicato XK 16/40 (16 mm ID x 40,0 cm L) de General Electric Healthcare empaquetada según las instrucciones del fabricante con medios cromatográficos de Sephacryl S-400 SEC/GPC de GE Healthcare Life Sciences.

- Bloque intercambiable de Eppendorf Thermomixer adecuado para diferentes tubos de centrifuga.

- TURBO™ DNasa (2 U/ μl) , catálogo # AM2238; Life Technologies.

- Tampón 10X de TURBO™ DNasa según lo suministra el fabricante; Life Technologies.

45 - Se controló el analizador ZEN1600 de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) Malvern Zetasizer Nano S y se analizaron los datos con el paquete informático Zetasizer v. 7.11.

Procedimiento de análisis:

50 Un cultivo de células de riñón Maldin-Darby (MDBK) se infectaron con Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5) cepa A663, el sobrenadante de cultivo se inactivó con una solución de etilénimina y se concentró por ultrafiltración para alcanzar un factor de concentración de 6,4X. Se preparó una solución placebo (control negativo) mediante congelación y descongelación repetida de un cultivo celular.

Dilución de la muestra:

Se preparó una dilución en serie de la muestra usando el placebo como diluyente.

Tabla 9. Esquema de dilución del concentrado BoHV-5 para la preparación de las diferentes muestras de BoHV-5

Muestra	1	2	3	4	5	6
% de concentrado (en volumen)	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Volumen de BoHV-5 concentrado (ml)	0	1	2	3	4	5
Volumen de solución de placebo (ml)	5	4	3	2	1	0

5 Pretratamiento de la muestra:

a) Digestión enzimática:

i) Se añaden a cada 4,5 ml de cada muestra diluida 500 μ l de tampón 10X de TURBO™DNasa y 20 μ l de TURBO™DNasa (2 U/ μ l).

10 ii) Se realizó una incubación de 60 minutos a 37°C y 750 rpm usando el Thermomixer Eppendorf con un termobloque adecuado para tubos de 15 ml.

iii) Se transfirió 1 ml de cada muestra a un tubo de microcentrífuga Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 16000 g a 4°C durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante pipeteando a un tubo nuevo teniendo cuidado de no distorsionar el sedimento para evitar obstruir la columna cromatográfica.

Carrera cromatográfica:

15 i) Se inyectaron 940 μ l de cada muestra centrifugada y digerida usando un bucle de medición en una válvula de inyección automática.

ii) Se llevó a cabo una carrera isocrática en fase móvil GPC1 a un flujo constante de 1 ml/min monitorizando a 254 nm en el detector de U.V. para obtener el perfil de U.V. con el detector Malvern Zetasizer en una configuración en serie para adquirir la intensidad de luz dispersada DLS y el Z-promedio.

20 iii) Se capturó el perfil U.V. y se analizó usando el paquete informático Unicorn y se recogió la intensidad de luz dispersada y el Z-promedio del diámetro de partícula y se analizó con el paquete informático Malvern Zetasizer v. 7.11.

Resultados:

25 La Figura 6A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno de BoHV-5 obtenido mediante la ultrafiltración. La Figura 6B muestra la superposición de perfiles cromatográficos obtenidos de las cinco muestras de BoHV-5 analizadas que van del 20% al 100% del concentrado de BoHV-5.

30 La Figura 6C muestra la superposición del perfil cromatográfico UV a 254 nm y el perfil cromatográfico DLS para una de las muestras. La superposición de los perfiles de U.V. y de DLS muestra claramente que el pico de BoHV-5 identificado registrado por U.V. es el único pico que genera una intensidad de luz dispersada cuando se registra mediante DLS. Este resultado indica que las partículas virales de BoHV-5 en esta muestra son las únicas especies de moléculas lo suficientemente grandes para dispersar realmente la luz a una intensidad lo suficientemente alta para ser detectada por el detector DLS.

35 Como se indica en la Figura 6D, se obtuvo un coeficiente de determinación muy alto R^2 (0,9987) que muestra una asociación constante y robusta entre la concentración viral estimada y la concentración viral real de la muestra, lo que sugiere que la presente invención puede estimar con precisión la concentración de partículas de BoHV-5 en un amplio intervalo de concentración viral.

Las determinaciones de DLS en línea de tamaño de partícula mostraron lecturas constantes que oscilan de 137,1 a 151,7 nm y consistente con la partícula de BoHV-5 en todo el intervalo de concentración evaluado (véanse la Figura 6D y la Tabla 10). Todos los resultados obtenidos de los registros de ultravioleta y de DLS se resumen en la Tabla 10.

40

Tabla 10. Análisis de ultravioleta y de DLS de un concentrado de BoHV-5 y sus muestras diluidas en serie.

% de concentrado de virus (en volumen)	Área de pico (mAU.ml)	Área de pico corregida (mAU.ml)	Tamaño de partícula (nm)
0	13,83	0,00	/
20	77,49	63,66	151,7
40	143,64	129,81	149,1
60	221,29	207,46	143,2
80	280,50	266,68	141,4
100	356,99	343,16	137,1

Análisis de muestras de PIV-3 concentradas

5 El equipo usado y procesos realizados fueron los mismos que se describen en el Ejemplo 2 con las siguientes diferencias:

Equipo y condiciones de operación:

- Equipo cromatográfico: se usó un cromatógrafo Äkta Purifier UPC-10 de General Electric Healthcare equipado con bomba binaria, detector de UV de longitud de onda fija de 254/280 nm, detector de conductividad y paquete informático Unicorn de control y adquisición de datos.
- 10 - Columna cromatográfica: se usó TOSOH Bioscience TSKgel G4000PWXL (7,8 mm ID x 30,0 cm L) o equivalente sin columna protectora o cartucho.
- Bloque intercambiable de Eppendorf Thermomixer adecuado para diferentes tubos de centrifuga.
- TURBO™DNasa (2 U/μl) , catálogo # AM2238; Life Technologies.
- Tampón 10X de TURBO™DNasa según lo suministra el fabricante; Life Technologies.
- 15 - Se controló el analizador ZEN1600 de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) Malvern Zetasizer Nano S y se analizaron los datos con el paquete informático Zetasizer v. 7.11.

Procedimiento de análisis:

20 Un cultivo de células de riñón Maldin-Darby (MDBK) se infectaron con Virus de Parainfluenza 3 (PIV-3), el sobrenadante de cultivo se inactivó con una solución de etilenimina y se concentró por ultrafiltración para alcanzar un factor de concentración de 19,4X. Se preparó una solución placebo (control negativo) mediante congelación y descongelación repetida de un cultivo celular.

Dilución de la muestra:

Se preparó una dilución en serie de la muestra usando el placebo como diluyente.

Tabla 11. Esquema de dilución del concentrado PIV-3 para la preparación de las diferentes muestras de PIV-3

Muestra	1	2	3	4	5	6
% de concentrado (en volumen)	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Volumen de PIV-3 concentrado (ml)	0	1	2	3	4	5
Volumen de solución de placebo (ml)	5	4	3	2	1	0

25

Pretratamiento de la muestra:

a) Digestión enzimática:

- i) Se añaden a cada 4,5 ml de cada muestra obtenida de la etapa anterior 500 μl de tampón 10X de TURBO™DNasa y 5 μl de TURBO™DNasa (2 U/μl).

ii) Se realizó una incubación de 60 minutos a 37°C y 750 rpm usando el Thermomixer Eppendorf con un termobloque adecuado para tubos de 15 ml.

iii) Se transfirió 1 ml de cada muestra a un tubo de microcentrifuga Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 16000 g a 4°C durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante pipeteando a un tubo nuevo teniendo cuidado de no distorsionar el sedimento para evitar obstruir la columna cromatográfica.

Carrera cromatográfica:

i) Se inyectaron 100 µl de cada muestra centrifugada y digerida usando un bucle de medición en una válvula de inyección automática.

ii) Se llevó a cabo una carrera isocrática en fase móvil GPC1 a un flujo constante de 0,5 ml/min monitorizando a 254 nm en el detector de U.V. para obtener el perfil de U.V. con el detector Malvern Zetasizer en una configuración en serie para adquirir la intensidad de luz dispersada DLS y el Z-promedio.

iii) Se capturó y se analizó el perfil U.V. usando el paquete informático Unicorn y se recogió la intensidad de luz dispersada y el Z-promedio del diámetro de partícula y se analizó con el paquete informático Malvern Zetasizer v. 7.11.

Resultados:

La Figura 7A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno de PIV-3 obtenido mediante la ultrafiltración. La Figura 7B muestra la superposición de perfiles cromatográficos obtenidos de las cinco muestras de PIV-3 analizadas que van del 20% al 100% del concentrado de PIV-3.

La Figura 7C muestra la superposición del perfil cromatográfico UV a 254 nm y el perfil cromatográfico DLS para una de las muestras. La superposición de los perfiles de U.V. y de DLS muestra claramente que el pico de PIV-3 identificado registrado por U.V. es el único pico que genera una intensidad de luz dispersada significativa cuando se registra mediante DLS. Este resultado indica que las partículas virales de PIV-3 en esta muestra son las únicas especies de moléculas lo suficientemente grandes para dispersar realmente la luz a una intensidad lo suficientemente alta para ser detectada por el detector DLS.

Como se indica en la Figura 7D, se obtuvo un coeficiente de determinación muy alto R^2 (0,9993) que muestra una asociación constante y robusta entre la concentración viral estimada y la concentración viral real de la muestra, lo que sugiere que la presente invención puede estimar con precisión la concentración de partículas de PIV-3 en un amplio intervalo de concentración viral.

Las determinaciones de DLS en línea de tamaño de partícula mostraron lecturas constantes que oscilan de 123 a 138 nm y consistente con la partícula de PIV-3 en todo el intervalo de concentración evaluado (véanse la Figura 7D y la Tabla 12). Para una de las muestras analizadas (80% de concentrado de virus), no se registró por lo que no se pudo realizar la lectura del tamaño Z-promedio. Todos los resultados obtenidos de las señales de ultravioleta y de DLS se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de ultravioleta y de DLS de un concentrado de PIV-3 y sus muestras diluidas en serie.

% de concentrado de virus (en volumen)	Área de pico (mAU.ml)	Área de pico corregida (mAU.ml)	Tamaño de partícula (nm)
0	3,17	0	-
20	8,92	5,75	123
40	14,19	11,02	129
60	19,03	15,86	138
80	22,04	20,86	-
100	29,54	26,37	132

III) Análisis de muestras de virus de la Rabia concentradas

El equipo usado y procesos realizados fueron los mismos que se describen en el Ejemplo 2 con las siguientes diferencias:

Equipo y condiciones de operación:

- Equipo cromatográfico: se usó un cromatógrafo Äkta Purifier UPC-10 de General Electric Healthcare equipado con bomba binaria, detector de UV de longitud de onda fija de 254/280 nm, detector de conductividad y paquete informático Unicorn de control y adquisición de datos.

- Columna cromatográfica: se usó TOSOH Bioscience TSKgel G4000PWXL (7,8 mm ID x 30,0 cm L) o equivalente sin columna protectora o cartucho.

- Bloque intercambiable de Eppendorf Thermomixer adecuado para diferentes tubos de centrifuga.

- TURBO™DNasa (2 U/μl) , catálogo # AM2238; Life Technologies.

5 - Tampón 10X de TURBO™DNasa según lo suministra el fabricante; Life Technologies.

- Se controló el analizador ZEN1600 de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) Malvern Zetasizer Nano S y se analizaron los datos con el paquete informático Zetasizer v. 7.11.

Procedimiento de análisis:

10 Un cultivo de células de riñón de Hamster recién nacido (BHK21) se infectaron con virus de la Rabia (vacunas cepa Pasteur/PV), el sobrenadante de cultivo se inactivó con una solución de etilenimina y se concentró por ultrafiltración para alcanzar un factor de concentración de 10,2X. Se preparó una solución placebo (control negativo) recogiendo un cultivo celular no infectado del mismo tiempo de crecimiento de los cultivos infectados en el momento de la recogida.

Dilución de la muestra:

Se preparó una dilución en serie de la muestra usando el placebo como diluyente.

15 Tabla 13. Esquema de dilución del concentrado del virus de la Rabia para la preparación de las diferentes muestras de virus de la Rabia

Muestra	1	2	3	4	5	6
% de concentrado (en volumen)	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Volumen de PV de la Rabia concentrado (ml)	0	1	2	3	4	5
Volumen de solución de placebo (ml)	5	4	3	2	1	0

Pretratamiento de la muestra:

a) Digestión enzimática:

20 i) Se añaden a cada 4,5 ml de cada muestra obtenida en la etapa anterior 500 μl de tampón 10X de TURBO™DNasa y 5 μl de TURBO™DNasa (2 U/μl).

ii) Se realizó una incubación de 60 minutos a 37°C y 750 rpm usando el Thermomixer Eppendorf con un termobloque adecuado para tubos de 15 ml.

25 iii) Se transfirió 1 ml de cada muestra a un tubo de microcentrifuga Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 16000 g a 4°C durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante pipeteando a un tubo nuevo teniendo cuidado de no distorsionar el sedimento para evitar obstruir la columna cromatográfica.

Carrera cromatográfica:

i) Se inyectaron 100 μl de cada muestra centrifugada y digerida usando un bucle de medición en una válvula de inyección automática.

30 ii) Se llevó a cabo una carrera isocrática en fase móvil GPC1 a un flujo constante de 0,5 ml/min monitorizando a 254 nm en el detector de U.V. para obtener el perfil de U.V. con el detector Malvern Zetasizer en una configuración en serie para adquirir la intensidad de luz dispersada DLS y el Z-promedio.

35 iii) Se capturó y se analizó el perfil U.V. usando el paquete informático Unicorn y se recogió la intensidad de luz dispersada y el Z-promedio del diámetro de partícula y se analizó con el paquete informático Malvern Zetasizer v. 7.11.

Resultados:

La Figura 8A muestra el perfil cromatográfico registrado a 254 nm de un concentrado de antígeno del virus de la Rabia obtenido mediante la ultrafiltración. La Figura 8B muestra la superposición de perfiles cromatográficos obtenidos de las cinco muestras del virus de la Rabia analizadas que van del 20% al 100% del concentrado del virus de la Rabia.

La Figura 8C muestra la superposición del perfil cromatográfico UV a 254 nm y el perfil cromatográfico DLS para una de las muestras. La superposición de los perfiles de U.V. y de DLS muestra claramente que el pico del virus de la Rabia identificado registrado por U.V. es el único pico que genera una intensidad de luz dispersada significativa cuando se registra mediante DLS. Este resultado indica que las partículas virales del virus de la Rabia en esta muestra son las únicas especies de moléculas lo suficientemente grandes para dispersar realmente la luz a una intensidad lo suficientemente alta para ser detectada por el detector DLS.

Como se indica en la Figura 8D, se obtuvo un coeficiente de determinación muy alto R^2 (0,9972) que muestra una asociación constante y robusta entre la concentración viral estimada y la concentración viral real de la muestra, lo que sugiere que la presente invención puede estimar con precisión la concentración de partículas del virus de la Rabia en un amplio intervalo de concentración viral.

Las determinaciones de DLS en línea de tamaño de partícula mostraron lecturas constantes que oscilan de 106 a 112 nm y consistente con la partícula del virus de la Rabia en todo el intervalo de concentración evaluado (véanse la Figura 8D y la Tabla 14). De hecho, el virus de la Rabia tiene una forma de bala y se describe que es aproximadamente 180 nm de longitud y 75 nm de diámetro. Dado que el detector DLS calcula el radio hidrodinámico para cada partícula y ya que, para ese propósito, el DLS considera que todas las partículas son esféricas, es totalmente lógico que la medida del tamaño obtenida en este experimento oscile entre 75 y 180 nm. Todos los resultados obtenidos de las señales de ultravioleta y de DLS se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Análisis de ultravioleta y de DLS de un concentrado del virus de la Rabia y sus muestras diluidas en serie.

% de concentrado de virus (en volumen)	Área de pico (mAU.ml)	Área de pico corregida (mAU.ml)	Tamaño de partícula (nm)
0	0,0	0,0	-
20	3,83	3,83	106
40	8,28	8,28	107
60	12,39	12,39	112
80	16,03	16,03	110
100	19,17	19,17	106

Interpretación de los resultados

Este ejemplo ilustra que la presente aplicación es capaz de generar mediciones precisas en un amplio rango de concentraciones virales para virus con envuelta.

En una realización, este ejemplo muestra que la presente aplicación es capaz de generar mediciones precisas para partículas de virus con envuelta, como BoHV-5, PIV-3 y de la Rabia en un amplio rango de concentraciones virales como lo indica la alta linealidad de la concentración viral determinada a partir de diversas muestras virales diluidas del concentrado viral.

Este ejemplo muestra la capacidad de la presente invención para caracterizar de forma consistente y precisa el tamaño e integridad del antígeno Bo-HV-5, el antígeno PIV-3 y el antígeno del virus de la Rabia independientemente de la concentración viral.

Como se demuestra en este ejemplo, el método de la presente invención es muy adecuado para cuantificar y caracterizar partículas virales en muestras concentradas y, por lo tanto, se puede aplicar a bancos de antígeno BoHV-5 o bancos de antígeno PIV-3 o bancos de antígeno del virus de la Rabia ultraconcentrados.

Ejemplo 7

Monitorización de la infección por FMDV en cultivo celular industrial

Este ejemplo muestra el uso de la presente invención para monitorizar el curso de la infección en un biorreactor de cultivo celular industrial de 2000 litros.

Para la etapa de infección por FMDV, se crecieron 2000 l de cultivo de suspensión celular BHK (Riñón de Hamster Recién nacido) en GMEM (Medio Mínimo Esencial de Glasgow) suplementado con suero bovino adulto al 12% en volumen hasta una concentración celular de $2,4 \times 10^6$ células/ml. Una vez que se alcanzó esta concentración celular, se dejaron sedimentar las células y se descartó el medio que contenía suero y se reemplazó por GMEM sin suero. Una vez resuspendidas, se inoculó el cultivo celular con una siembra de cultivo de FMDV Campos O1 a una MOI (multiplicidad de infección) que oscila entre 0,001 y 0,05 partículas virales viables por célula. La temperatura se mantuvo constante a 37°C antes y después de la infección. Las muestras de cultivo se extrajeron a intervalos de 1 hora hasta la 4ª hora y cada 30 minutos a partir de entonces. Se determinó el recuento celular mediante microscopía

en un hemocitómetro NeuBauer Mejorado. La muestra restante se centrifugó y se analizó directamente el sobrenadante usando la presente invención para cuantificar la concentración de virus y caracterizar su tamaño e integridad. Los resultados del Ejemplo 7 se resumen en la Figura 9 y en la Tabla 15.

Tabla 15. Cambio en la concentración, tamaño y recuento celular del virus durante la infección de 8 horas

Horas después de la infección	Concentración viral ($\mu\text{g/ml}$)	Tamaño de partícula (nm)	Recuento celular ($\times 10^6$ células/ml)
0	0,03*	/	2,38
1,0	0,01*	/	2,52
2,0	0,01*	/	2,56
3,0	0,01*	/	2,78
4,0	0,12*	/	2,80
4,5	0,18*	/	2,58
5,0	0,19*	/	2,54
5,5	0,25*	/	2,16
6,0	1,22	31,0	2,06
6,5	2,72	32,3	1,20
7,0	3,85	33,4	0,60
8,0	5,20	34,7	0,06

5 * Esos valores están por debajo del límite actual de detección de la técnica validada y, por lo tanto, no se pueden tomar en este ejemplo como significativamente diferentes del ruido de fondo.

Hasta la 4ª hora después de la infección, las células continúan creciendo pero se detectó nada o muy poco virus. De la hora 4 hasta la hora 6,5, el virus se puede detectar mediante el detector de U.V. pero la señal era demasiado baja para permitir una lectura DLS precisa. Desde la hora 6,5 en adelante, el virus fue fácilmente detectable tanto con detectores de U.V. como de DLS. El detector DLS en línea produjo lecturas de 31-35 nm, que eran totalmente consistentes con el diámetro descrito de FMDV.

15 Este ejemplo muestra cómo la cuantificación y la técnica de caracterización de la presente invención se pueden realizar en un intervalo de concentración muy bajo de partículas de virus FMD. El detector de U.V. comenzó a proporcionar lecturas fiables a 254 nm a 6 horas después del inicio de la infección del cultivo celular (medida superior a 1 $\mu\text{g/ml}$, que es el límite de detección (LOD) validado actual). Sorprendentemente, el detector DLS comenzó a proporcionar mediciones fiables y consistentes del tamaño de las partículas FMDV a una concentración inicial de 1,2 $\mu\text{g/ml}$. Esto representa una característica importante de la presente invención, ya que la concentración de proteína de trabajo generalmente descrita para un funcionamiento normal de los detectores DLS está en el intervalo de 0,5 a 2 mg/ml, varios órdenes de magnitud más altos que las concentraciones virales descritas en este ejemplo.

20 Este ejemplo también demuestra que la técnica de la presente invención se puede aplicar a partículas de virus FMD vivas. Estos datos, junto con el resto de los datos de la presente invención, demuestran además que se puede usar la técnica descrita en absolutamente cada etapa del proceso de fabricación de una vacuna FMD, sin importar si el virus está aún vivo o si se ha inactivado ya. Del mismo modo, la técnica de la presente invención se puede aplicar a cada etapa del proceso de fabricación de otros tipos de partículas de virus vivos, como el Rotavirus Bovino, BoHV-5, PIV-3 y virus de la Rabia.

25 Finalmente, se puede razonablemente anticipar que el uso de los más modernos detectores de U.V., como detectores que tienen un paso óptico más grande o un nivel de fondo reducido, podría permitir disminuir aún más el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) de la presente invención para, por ejemplo, un LOD de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y un LOQ de 0,3 $\mu\text{g/ml}$.

30 Ejemplo 8

Sistema de conmutación de columnas

En una realización, la presente invención proporciona un método de cuantificación y caracterización de alto rendimiento de todos los virus con envuelta y sin envuelta.

35 Debido a la naturaleza de la cromatografía de exclusión por tamaño, es normalmente necesario eluir completamente todos los picos de la muestra anterior antes de comenzar una nueva ronda de cromatografía para otra muestra. Por lo tanto, los antígenos virales que tienen un gran peso molecular se pueden cuantificar durante la primera mitad de un análisis cromatográfico, pero el análisis de la siguiente muestra no se puede iniciar hasta que los componentes de bajo peso molecular de la muestra anterior se eluyan completamente de la columna. De lo contrario, los picos de virus

de la siguiente muestra pueden superponerse con los picos finales de la muestra de ejecución anterior lo que da lugar a una contaminación. Los datos capturados dentro de este marco de tiempo no sirven para cuantificar el contenido del virus o determinar la integridad del antígeno. El tiempo requerido para eluir todos los componentes de bajo peso molecular se puede considerar como una inactividad improductiva del equipo y del tiempo del operador lo que finalmente reduce la productividad general del laboratorio analítico.

Es posible aumentar la productividad configurando otro sistema de HPLC con su propio par de detectores de UV y de DLS, pero esto puede ser muy costoso e inconveniente debido a las limitaciones de espacio en los laboratorios de control de calidad (QC) de la vacuna FMDV. La presente invención proporciona un sistema de conmutación de columnas que es capaz de reducir el gasto de tener detectores duplicados de UV y DLS y mantener el radio de acción del equipo en casi la misma configuración de una sola columna.

En una realización, el presente sistema de conmutación de columnas está configurado para incluir un conjunto de dos válvulas, dos bombas de HPLC, dos columnas SEC, un detector de U.V. y un detector de DLS. En otra realización, según se ilustra en la Figura 10, el sistema además incluye componentes como un inyector automático y un recolector de residuos. Esta configuración es factible para reducir el tiempo de ejecución a la mitad y, por lo tanto, duplica de modo eficaz la productividad. Se debe señalar que el presente sistema de conmutación de columnas puede tomar cualquier forma adecuada y configurarse con diversas características y componentes de acuerdo con la necesidad de la cuantificación y caracterización. Por ejemplo, uno puede conectar tres bombas de HPLC, tres columnas SEC y un detector de DLS para ejecutar tres lotes de muestras de forma simultánea.

Como se ilustra en la Figura 10, el conjunto de dos válvulas incluye la válvula 1 y la válvula 2 que se pueden conectar a diferentes componentes del sistema como la bomba, el inyector automático, diferentes tipos de columnas, detectores de UV y el recolector de residuos. Las dos válvulas se pueden controlar de forma independiente u operar juntas para implementar el presente sistema de conmutación de columnas.

Antes de la ejecución, las muestras a analizar se colocan en el inyector automático. Se colocan tampones apropiados como el tampón de equilibrado y el tampón de lavado bajo las dos bombas.

Como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 10, mientras se ejecuta una muestra en la Columna 1 usando la Bomba B, la Columna 2 se lava y se equilibra con el tampón apropiado de la Bomba A. Después de que se eluya el pico de virus y se cuantifique en el detector de DLS, se cambia el conjunto de válvulas a la posición mostrada en el panel derecho de la Figura 10.

El análisis de la siguiente muestra en cola en el inyector automático se puede iniciar inmediatamente en la Columna 2. Mientras tanto, cualquier componente de bajo peso molecular que permanezca en la Columna 1 que no sea de interés se puede eliminar directamente a los Residuos bajo el equilibrado por la Bomba A. Para las siguientes muestras, se cambia el conjunto de válvulas de un sitio a otro y el análisis de las muestras se alterna de la Columna 1 y la Columna 2 hasta que se hayan agotado todas las muestras en el inyector automático.

En una realización, las columnas configuradas en el presente sistema de conmutación de columnas se pueden cargar con el mismo tipo de virus. En otra realización, las columnas configuradas en el sistema de conmutación de columnas se pueden cargar con diferentes tipos de virus. En cualquier caso, los detectores de UV y de DLS cuantifican y analizan los picos eluidos de manera secuencial de las columnas para lograr un análisis de alto rendimiento. Con un lavado adecuado de los tubos, las columnas y el sistema de detección, el riesgo de contaminación cruzada es muy bajo y, por lo tanto, está garantizada la precisión del análisis.

En una realización, las válvulas están controladas por el mismo paquete informático que controla e integra el funcionamiento de otros componentes del sistema como las bombas e inyectores automáticos o el paquete informático que captura los datos de los detectores de UV y de DLS. En una realización, se usó el paquete informático Agilent ChemStation que controla el cromatógrafo Agilent 1260 Infinity para controlar todo el sistema. También es posible preestablecer programas para implementar un proceso totalmente automatizado que incluye, pero no se limita a, las siguientes etapas: equilibrado y lavado de la columna, inyección de la muestra a la columna, realización de la cromatografía de exclusión por tamaño con un perfil de UV registrado y cuantificación, caracterización del pico eluido usando un detector de U.V. y un detector de DLS y eliminación de residuos de la columna. También se puede usar otro sistema automatizado o robotizado para realizar etapas como la extracción con solvente (p. ej., cloroformo) y la digestión enzimática en la etapa de pretratamiento para mejorar aún más la eficacia de la cuantificación y caracterización.

En una realización, el funcionamiento del sistema está estrechamente controlado por un paquete informático y sistema adecuados. Por ejemplo, el paquete informático y el sistema que produce, integra y analiza los cromatogramas de UV y de DLS se puede usar para convertir los datos cromatográficos de cada fracción eluida en datos analíticos en tiempo real para una interpretación más sencilla. También se pueden incluir sistemas de advertencia para condiciones de error comunes (p. ej., fugas, sobrepresión) y también se puede incluir un sistema de control remoto en el presente sistema.

Este ejemplo muestra claramente que la implementación del sistema de conmutación de varias columnas aumenta aún más el rendimiento del análisis. Todo el sistema demuestra muchas características sinérgicas que mejoran en

- gran medida la eficacia del análisis de antígenos FMDV; a saber, eliminación de la interferencia de moléculas de ADN grandes mediante digestión con endonucleasas, eliminación de la interferencia de residuos lipídicos grandes mediante extracción con solvente (p. ej., cloroformo), separación de moléculas de bajo peso molecular mediante SEC, elución de las partículas de virus en el volumen de exclusión (o cerca del volumen de exclusión) de la columna SEC, ejecución simultánea de dos o más análisis SEC y análisis DLS a tiempo real. La presente invención es capaz de producir un pico de virus con envuelta y sin envuelta puro y segregado y analizar el pico eluido mediante el detector de U.V. y el detector DLS en 20 minutos después del inicio de la ejecución cromatográfica. La presente invención no solo logra un alto rendimiento sino también un análisis más rentable de antígenos virales porque el sistema de conmutación no requiere múltiples detectores DLS y, por lo tanto, minimiza el espacio de trabajo para configurar todo el sistema.
- 5
- 10 En una realización de la presente SEC, la elución del pico viral se completa antes de la marca de 20 minutos después de la inyección de la muestra para todos los virus y la cromatografía completa dura aproximadamente 50 minutos para eluir las moléculas de bajo y alto peso molecular de la columna. Por consiguiente, se puede cargar una muestra en una columna cada 50 minutos para para una nueva ronda de separación.
- 15 En una realización de la presente invención en la que se implementa el sistema de conmutación de columnas se puede realizar el análisis de la siguiente muestra después del primer análisis de 20 minutos de la primera muestra y, por lo tanto, maximiza el uso de maquinaria y tiempo. Se estima que la presente invención puede completar la purificación, cuantificación y caracterización de al menos 57 muestras por día.
- 20 En una realización del presente sistema de conmutación de columnas que comprende dos columnas SEC, cuando una muestra se carga en cada una de las columnas cada 50 minutos, las dos columnas pueden manejar aproximadamente 57 muestras cada 24 horas.
- 25 En una realización, el presente sistema de conmutación de columnas comprende tres bombas de HPLC, tres columnas SEC, un detector de U.V. y un detector DLS. Dado que el pico de virus se eluye a aproximadamente 20 minutos después de la inyección de la muestra, las tres columnas juntas con los detectores de U.V. y de DLS pueden manejar 3 muestras por hora. En este caso, se carga una muestra en cada una de las columnas cada 60 minutos. Los dos detectores registraron y analizaron señales de virus eluidas de la primera columna y después el virus eluyó de la segunda columna y finalmente de la tercera columna. Después de que el pico de virus se ha eluido de la columna número 3, el sistema vuelve a la columna número 1 para cargar la siguiente muestra. Por lo tanto, el sistema puede manejar y analizar aproximadamente 72 muestras cada 24 horas.
- 30 Además de la capacidad de manejar todo tipo de muestras, desde muestras crudas hasta muestras altamente purificadas y concentradas, la presente invención proporciona claramente un análisis muy versátil, sensible y de alto rendimiento que no se puede lograr con ninguna tecnología actual como ELISA, SRID, PCR a tiempo real, FPLC y la técnica de gradiente de sacarosa 146S.
- 35 En resumen, la presente invención proporciona métodos y sistemas que pueden aislar todos los tipos de virus incluyendo con envuelta, sin envuelta, virus de ADN y de ARN, y sus antígenos de alta pureza, cuantifica y caracteriza estos productos con alta sensibilidad y precisión en muy poco tiempo. A partir de los datos de los Ejemplos 4-6 y las Figuras 4-9, es indudable que la presente invención se puede usar para cuantificar una gran diversidad de virus con alta reproducibilidad, linealidad, precisión y sensibilidad independiente de la concentración viral. Los datos presentes en esta memoria también demostraron que la presente invención puede determinar el tamaño y la integridad de varios tipos de virus con alta sensibilidad y precisión. Más importante aún, la presente invención se puede aplicar a todo tipo
- 40 de muestras; sin importar si es una muestra altamente purificada o muestras crudas tomadas de cualquier etapa del proceso de fabricación de la vacuna. La presente invención puede determinar la cantidad, el tamaño y la integridad de las partículas virales con un alto rendimiento sin afectar a la integridad de las partículas. Por lo tanto, la presente invención proporciona un análisis que refleja verdaderamente las características de las partículas virales tal y como están en las muestras originales. Claramente, la presente invención permite un análisis de muy alto rendimiento de
- 45 productos virales para satisfacer la alta demanda tanto en cantidad como en calidad de vacunas virales.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la cuantificación y caracterización de uno o más tipos de virus o partículas virales, que comprende las etapas de:
- 5 a) tratar especímenes que comprenden dichos virus o partículas virales con una o más enzimas para obtener una pluralidad de muestras virales en donde dichos especímenes se tratan en un disolvente antes o después de tratarse con dicha una o más enzimas;
- b) aplicar una primera muestra viral a un sistema cromatográfico de exclusión por tamaño que comprende una pluralidad de bombas y una pluralidad de columnas de exclusión por tamaño, en donde:
- 10 i. una primera bomba está conectada a una primera columna cromatográfica de exclusión por tamaño a través de una primera válvula, dicha primera columna está conectada además a través de una segunda válvula a un sistema de detección que comprende un detector de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) y un detector de UV; y
- 15 ii. una segunda bomba está conectada a una segunda columna cromatográfica de exclusión por tamaño a través de dicha primera válvula, dicha segunda columna está conectada además a través de una segunda válvula a un recolector de residuos,
- en donde la primera muestra viral se ejecuta a través de la primera columna mientras se pasa un tampón de lavado a través de la segunda columna;
- c) eluir la primera muestra viral de la primera columna y obtener el perfil cromatográfico para la cuantificación y caracterización de la primera muestra viral por dicho sistema de detección;
- 20 d) cambiar las conexiones para dicha primera y segunda bombas para que
- i. dicha primera bomba está ahora conectada a dicha segunda columna a través de la primera válvula, dicha segunda columna está conectada además a través de dicha segunda válvula a dicho sistema de detección; y
- 25 ii. dicha segunda bomba está ahora conectada a dicha primera columna a través de la primera válvula, dicha primera columna está conectada además a través de dicha segunda válvula a un recolector de residuos;
- e) aplicar una segunda muestra viral a la segunda columna mientras se aplica un tampón de lavado a la primera columna;
- f) eluir dicha segunda muestra viral de dicha segunda columna y obtener el perfil cromatográfico para la cuantificación y caracterización de dicha segunda muestra viral por dicho sistema de detección; y
- 30 g) repetir las etapas de (b) a (f), obteniendo así la cuantificación y caracterización de dicha pluralidad de muestras virales.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dichos virus o partículas virales son virus con envuelta, virus sin envuelta, virus de ADN, virus de ARN, virus vivos, virus vivos atenuados, virus inactivados, virus recombinantes, vectores virales o partículas similares a virus.
- 35 3. El método de la reivindicación 1, en donde los virus son virus de la Fiebre Aftosa (FMDV), Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5), Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1), virus de la Parainfluenza 3 (PIV-3), Rotavirus Bovino, virus de la Rabia, virus de la Diarrea Viral Bovina, Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRISV), Circovirus Porcino 2 (PCV-2), Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV), Parvovirus Porcino (PPV) o virus de la Lengua Azul (BTV).
- 40 4. El método de la reivindicación 1, en donde la primera y segunda muestras virales comprenden el mismo tipo o diferentes tipos de virus o partículas virales.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dichos especímenes se seleccionan del grupo que consiste en sobrenadante de cultivos celulares infectados con virus, un producto intermedio de un proceso de fabricación de vacunas, un lote o banco de antígeno, una vacuna, un lote de vacuna monovalente y un lote de vacuna multivalente.
- 45 6. El método de la reivindicación 1, en donde la enzima es una endonucleasa, exonucleasa, enzima de restricción, ADNasa o ARNasa para eliminar moléculas que interfieren en la cuantificación y caracterización de dichos virus.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el disolvente es un disolvente no polar seleccionado del grupo que consiste en cloroformo, benceno, tolueno, hexano, pentano y octano.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el sistema cromatográfico comprende dos o tres columnas cromatográficas.

9. El método de la reivindicación 1, en donde el sistema cromatográfico comprende además un inyector automático de muestras para inyectar dichas muestras virales a las columnas cromatográficas.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el sistema cromatográfico comprende además uno o más sistemas para integrar y controlar el funcionamiento de la pluralidad de componentes del sistema cromatográfico.
- 5 11. El método de la reivindicación 1, en donde dicha cuantificación y caracterización de virus comprende determinar el tamaño y la integridad de dichos virus o partículas virales.
- 10 12. El método de la reivindicación 1, en donde se compara el perfil cromatográfico con un perfil cromatográfico derivado de una muestra de referencia de virus purificados, o se compara con un perfil cromatográfico derivado de partículas virales integrales completas para permitir la diferenciación de las partículas virales integrales completas de los fragmentos virales desintegrados.
13. El método de la reivindicación 1, en donde las columnas cromatográficas están diseñadas para separar partículas con tamaños en el intervalo de 10-200 nm y pesos moleculares en el intervalo de 10^5 - 10^9 Dalton.
14. El método de la reivindicación 1, en donde la cuantificación de virus es independiente de la concentración de dichos virus en dichas muestras virales.

15

Figura 1A

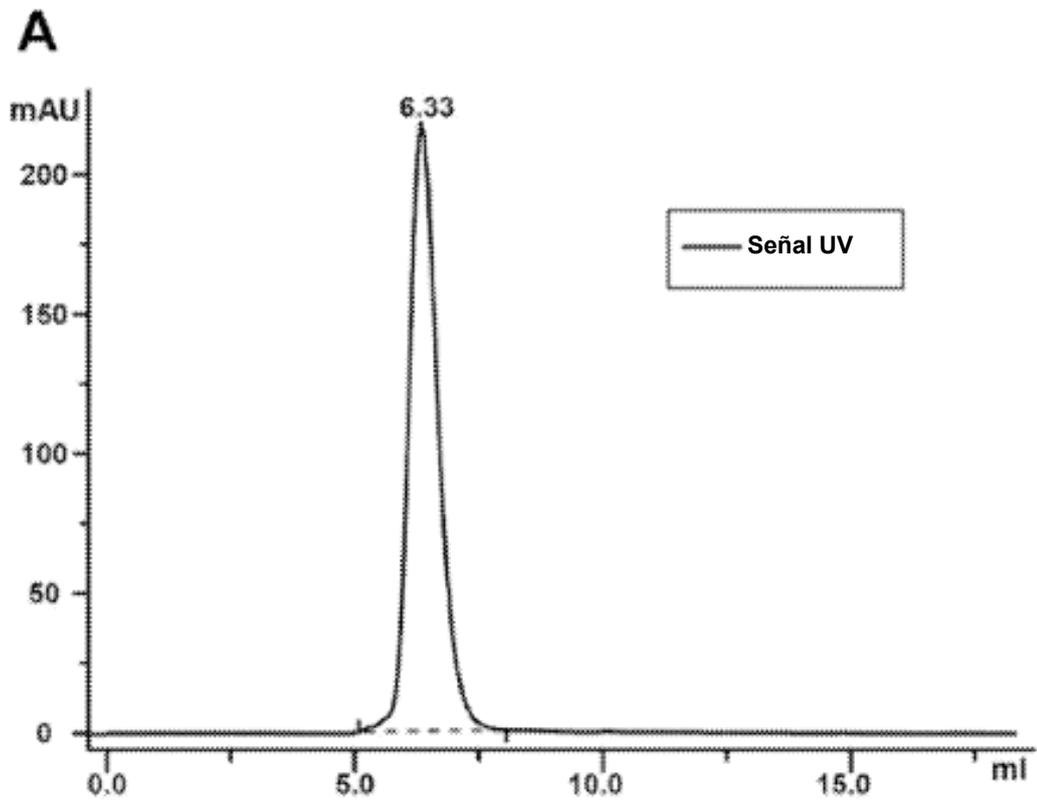


Figura 1B

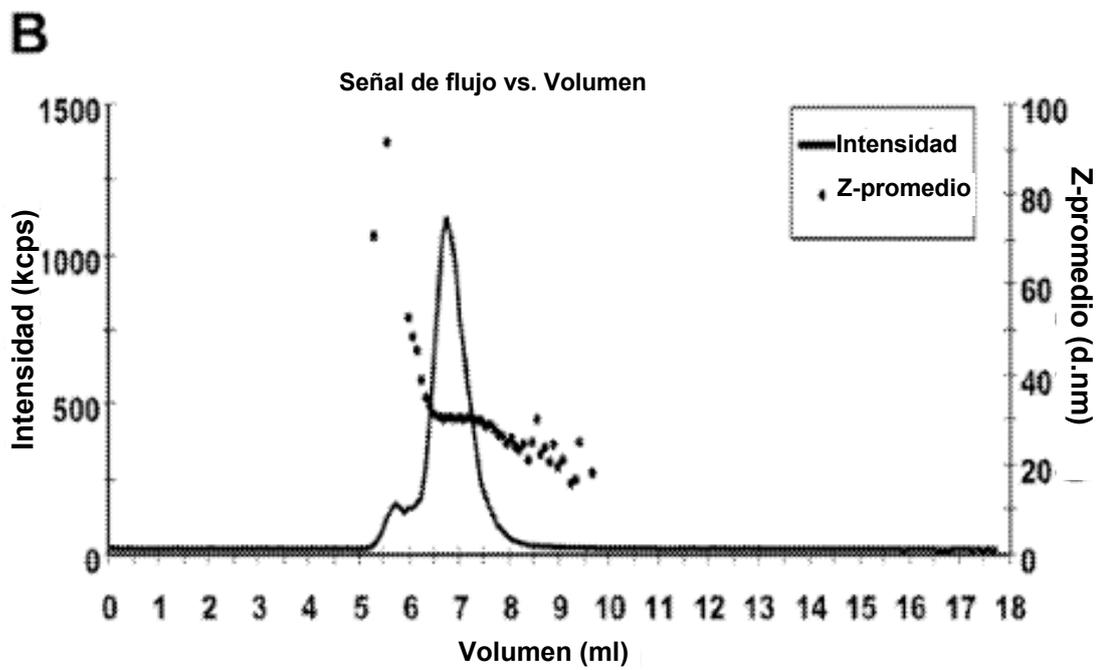


Figura 2A

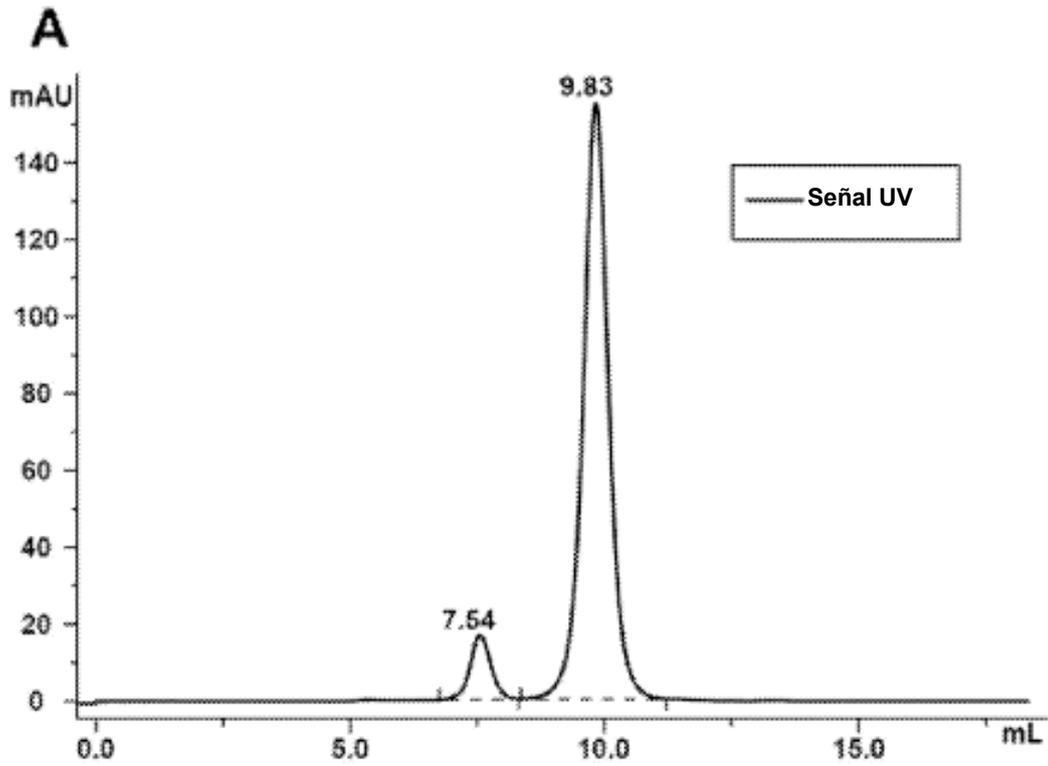


Figura 2B

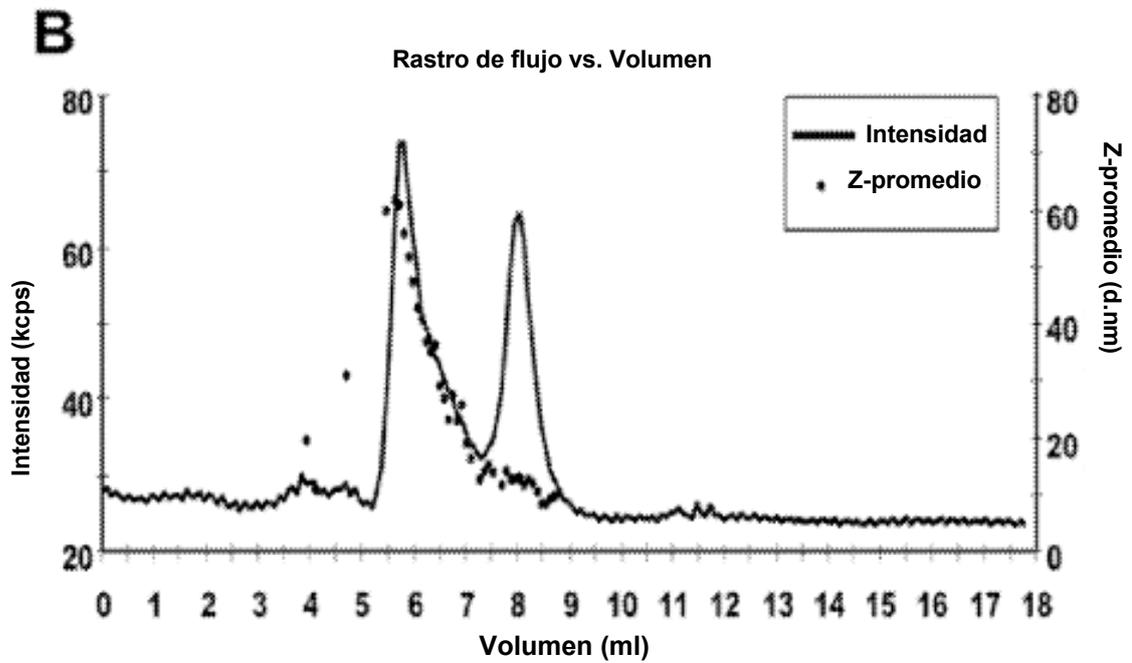


Figura 3A

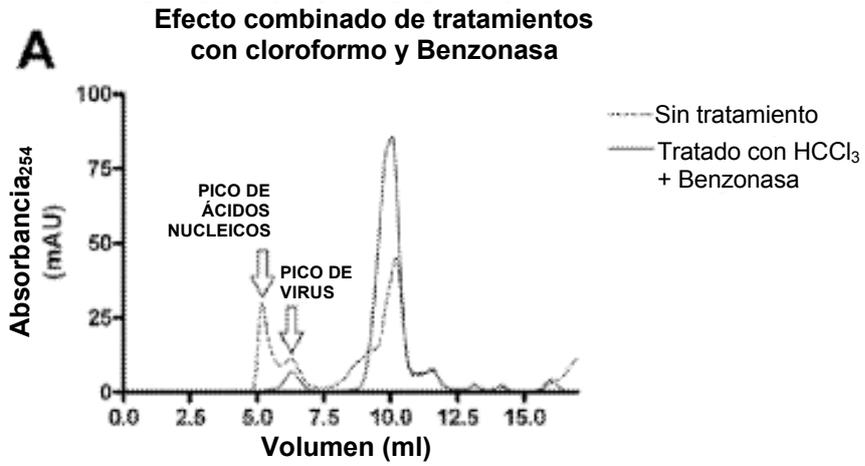


Figura 3B

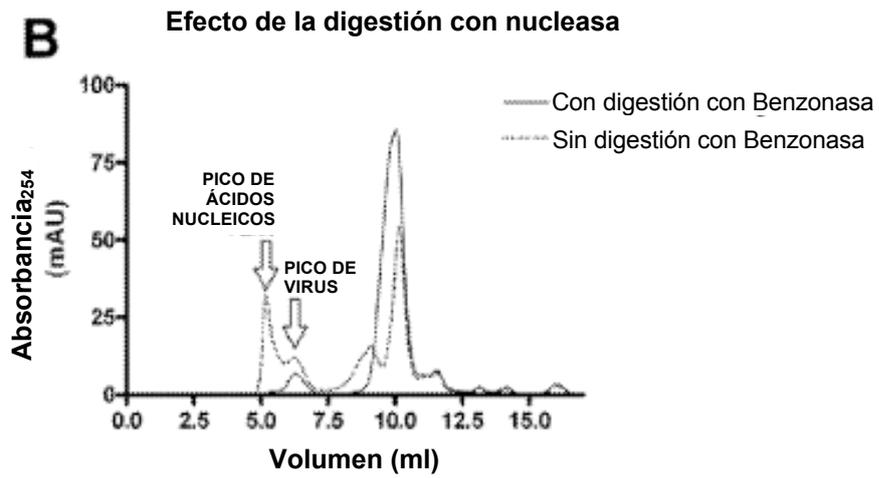


Figura 3C

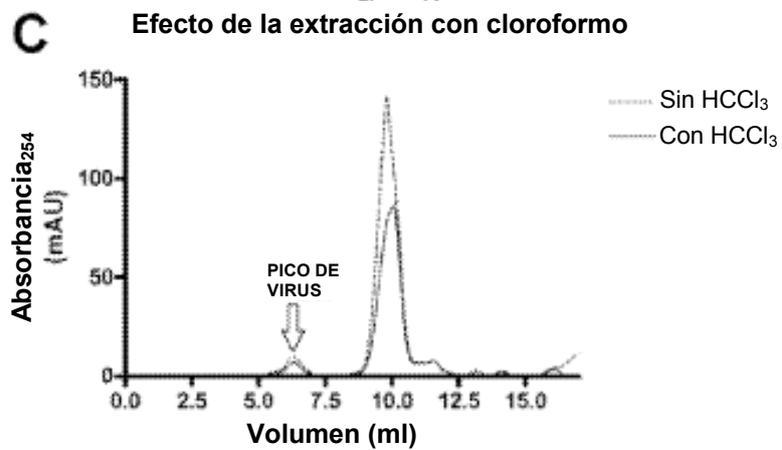


Figura 4A

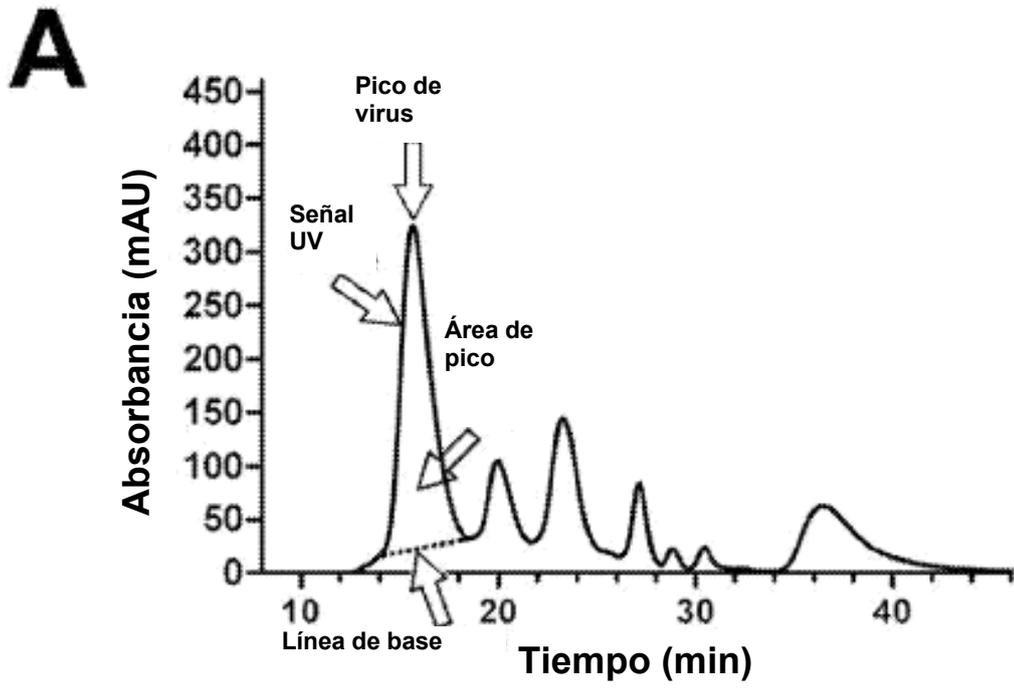


Figura 4B

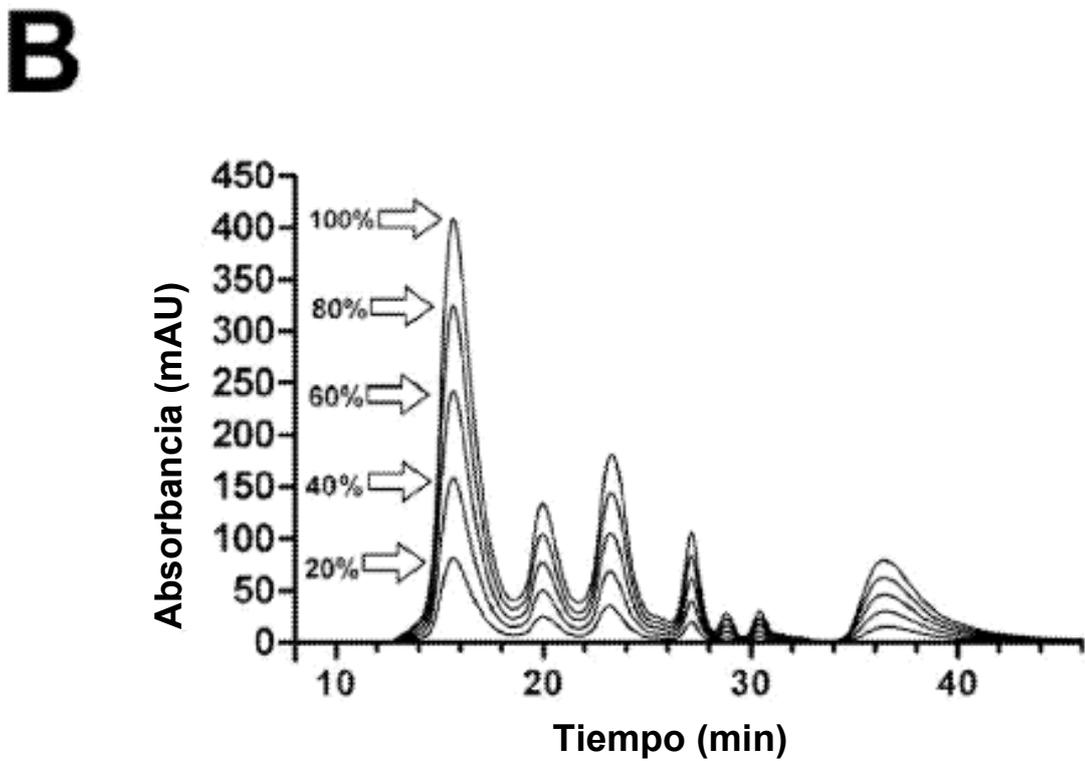


Figura 4C

C

Señal de flujo de U.V. y DLS de FMDV

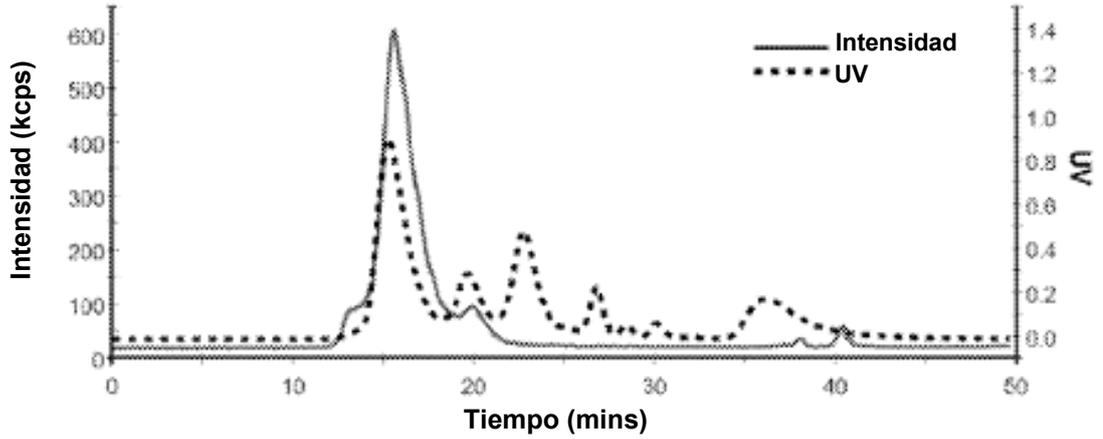


Figura 4D

D

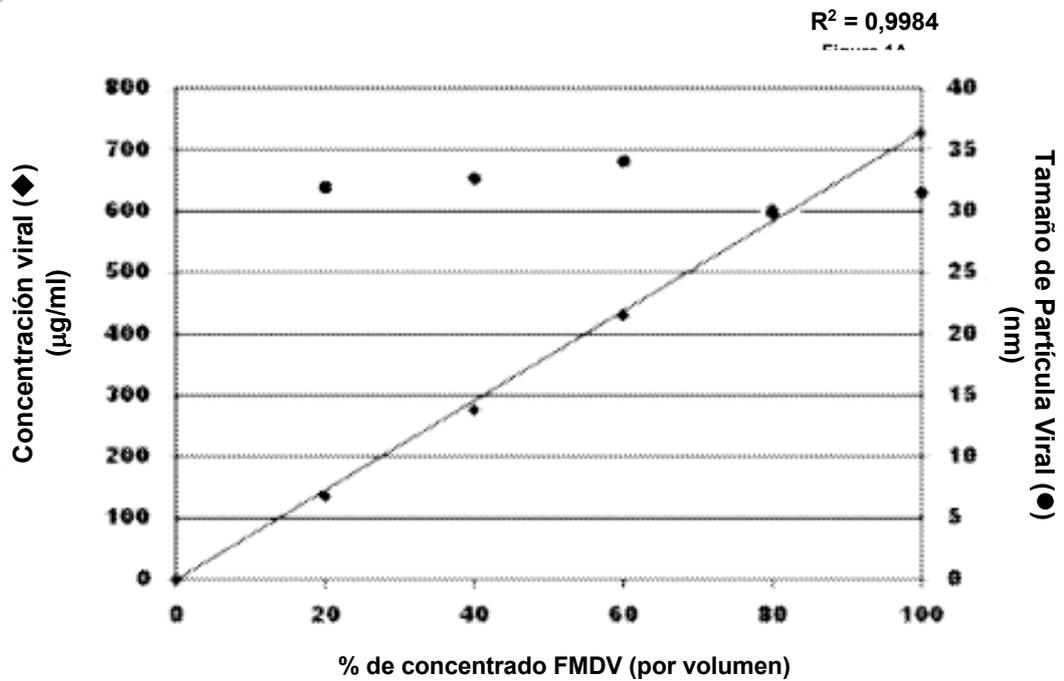


Figura 5A

A

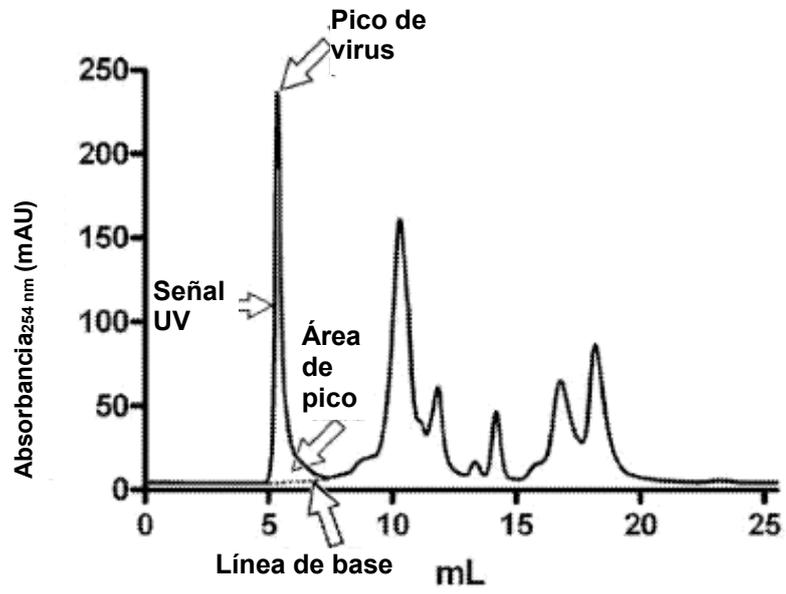


Figura 5B

B

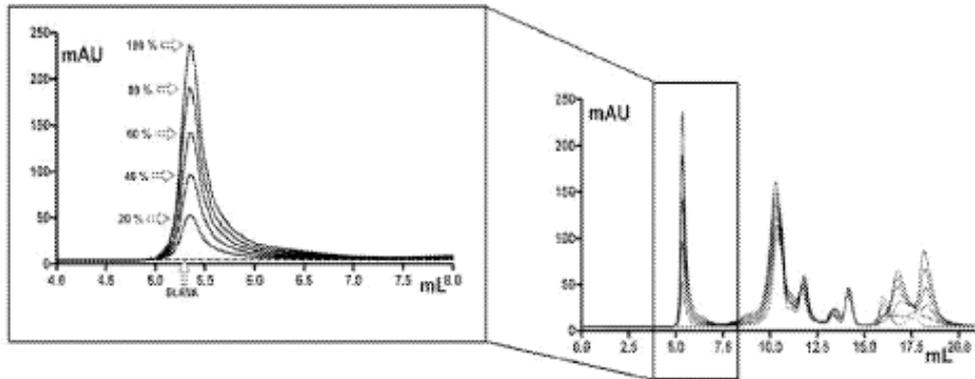


Figura 5C

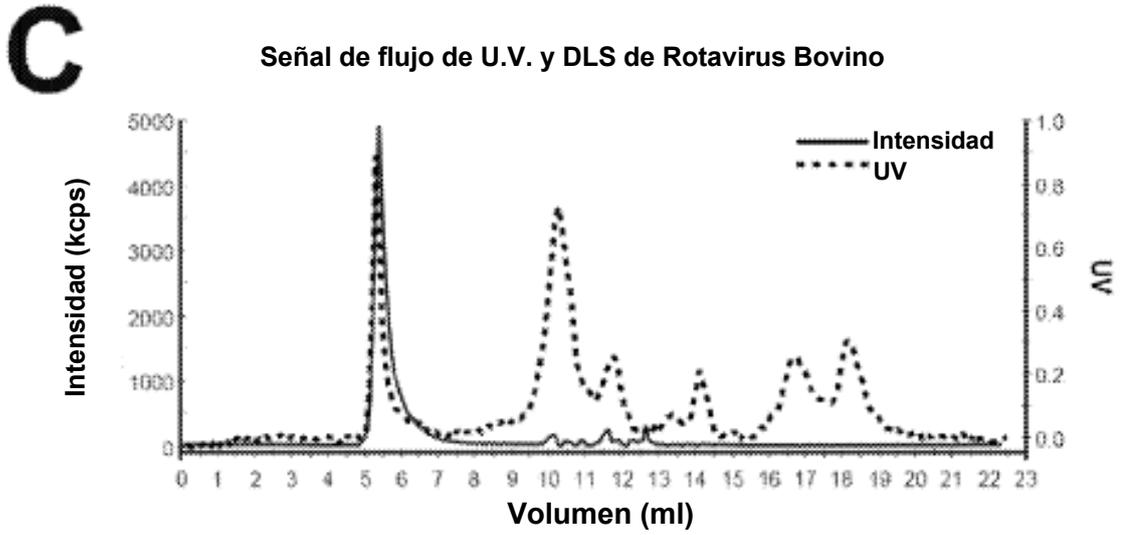


Figura 5D

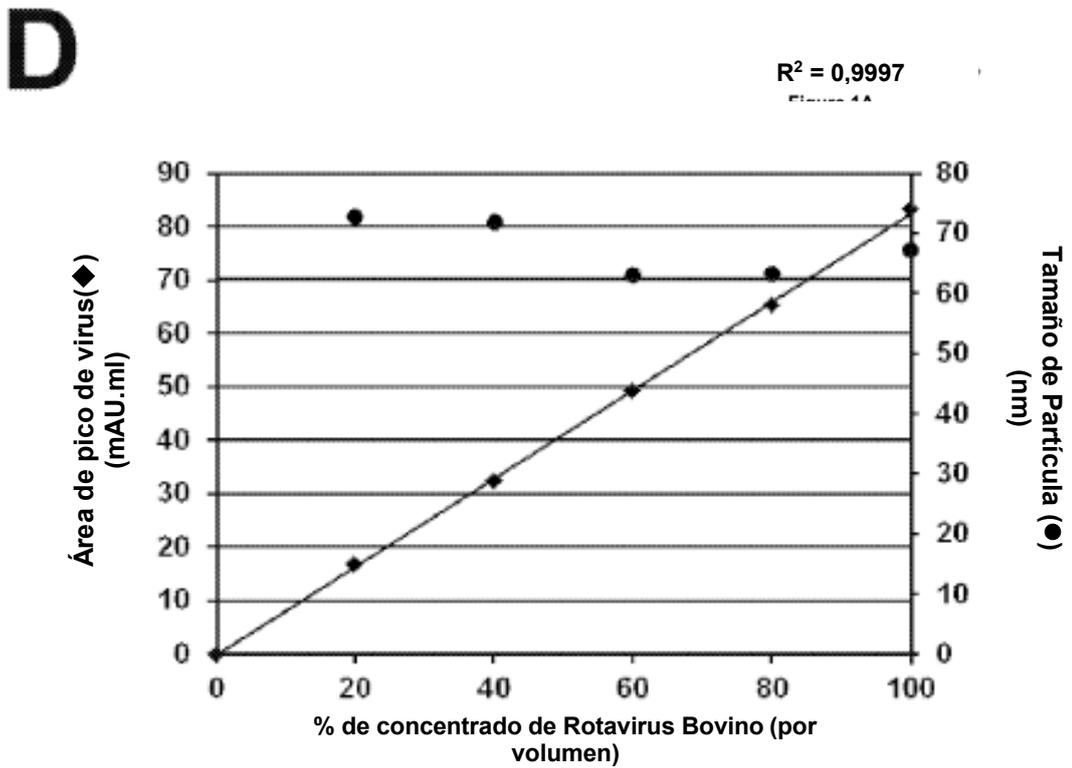


Figura 6A

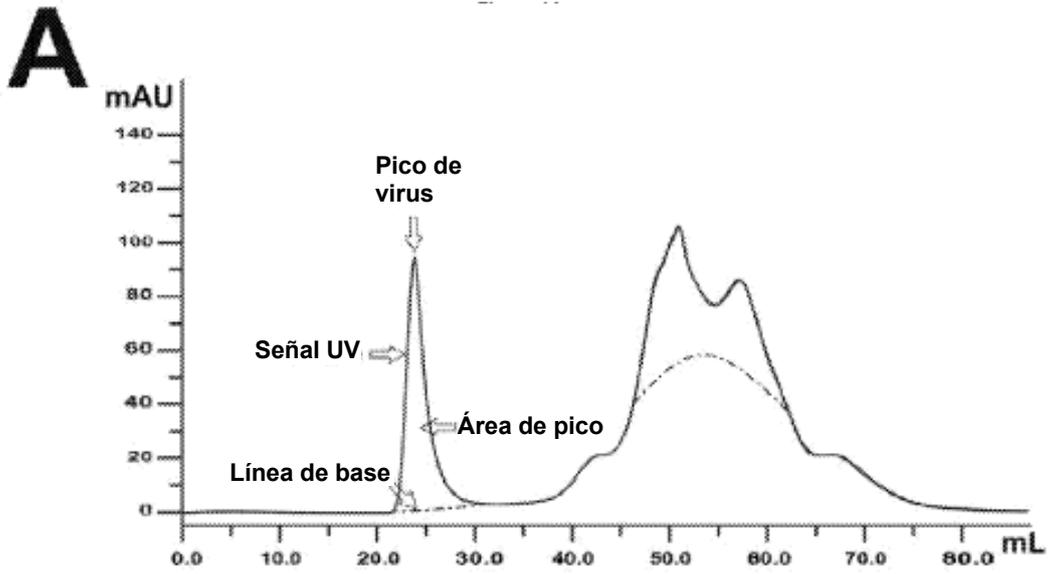


Figura 6B

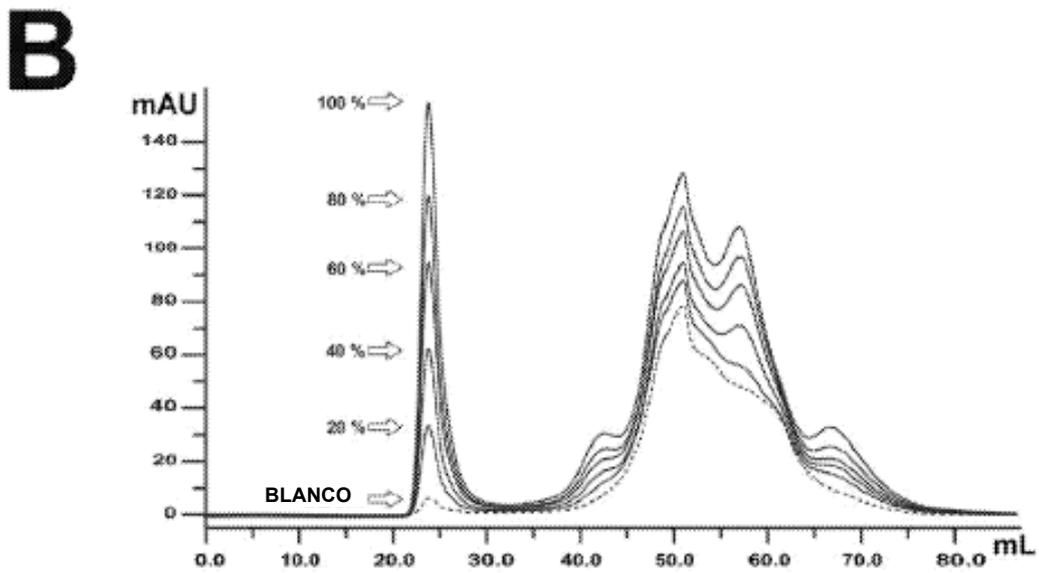


Figura 6C

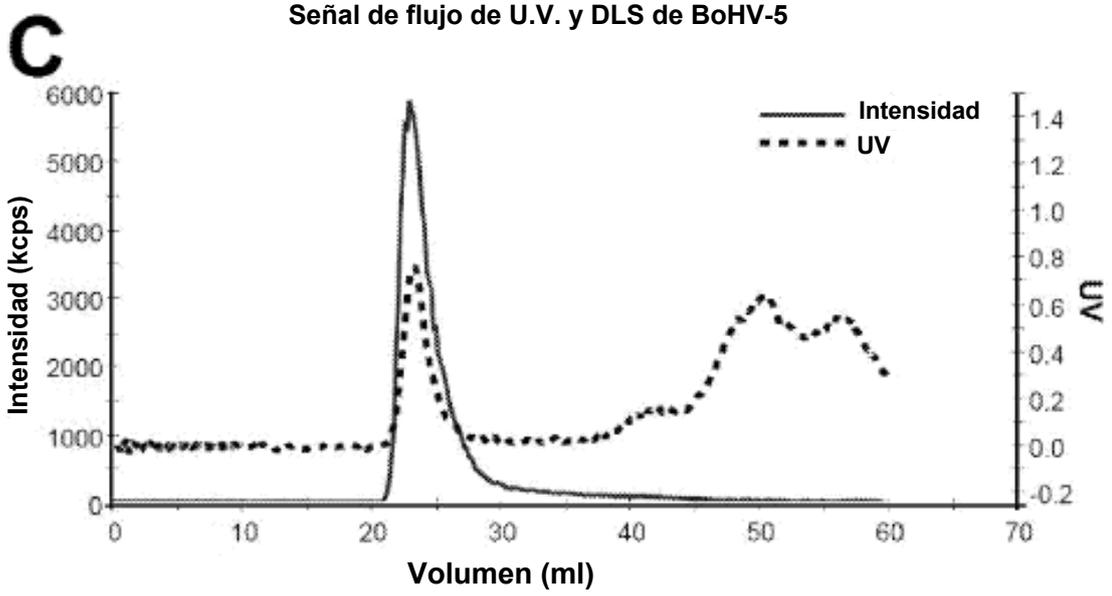


Figura 6D

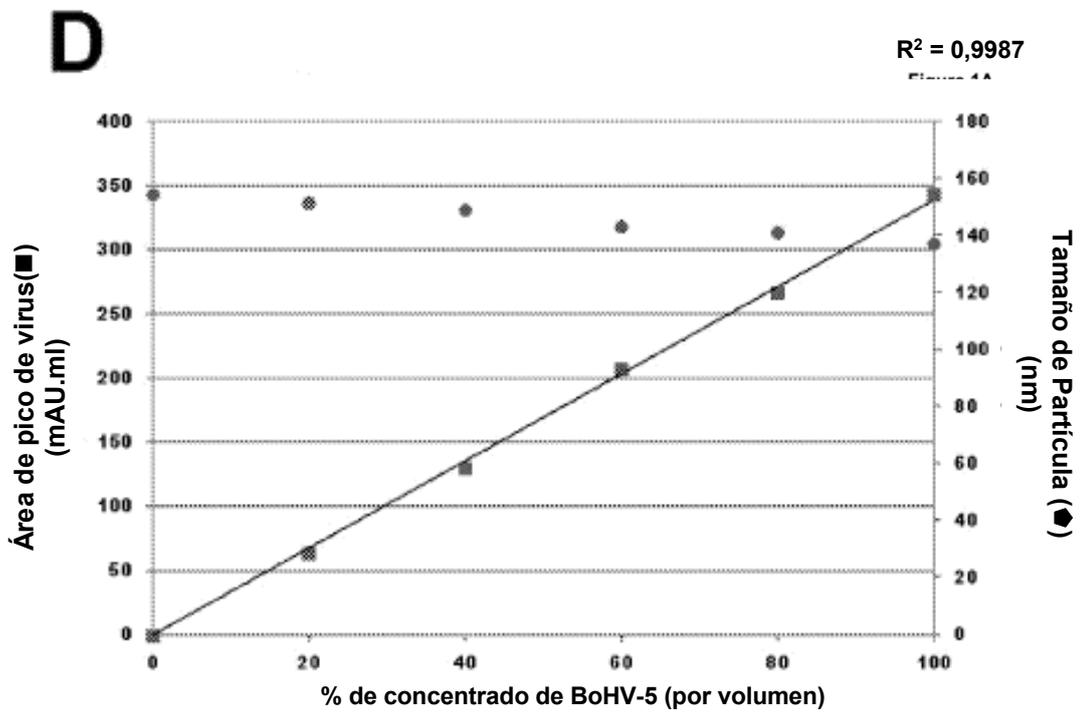


Figura 7A

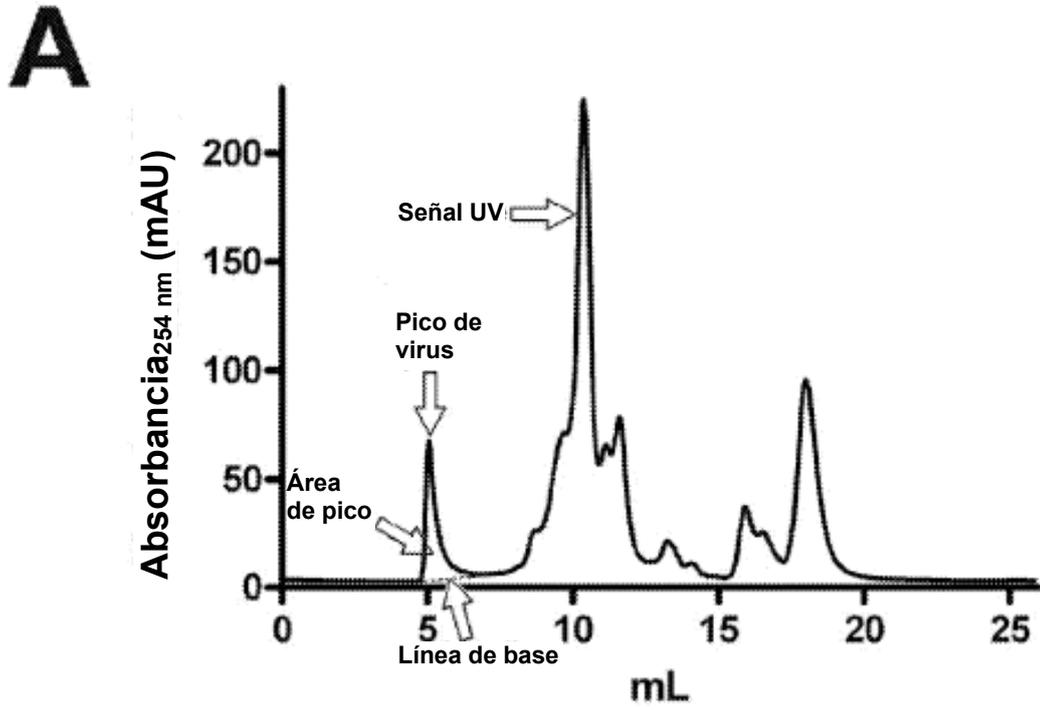


Figura 7B

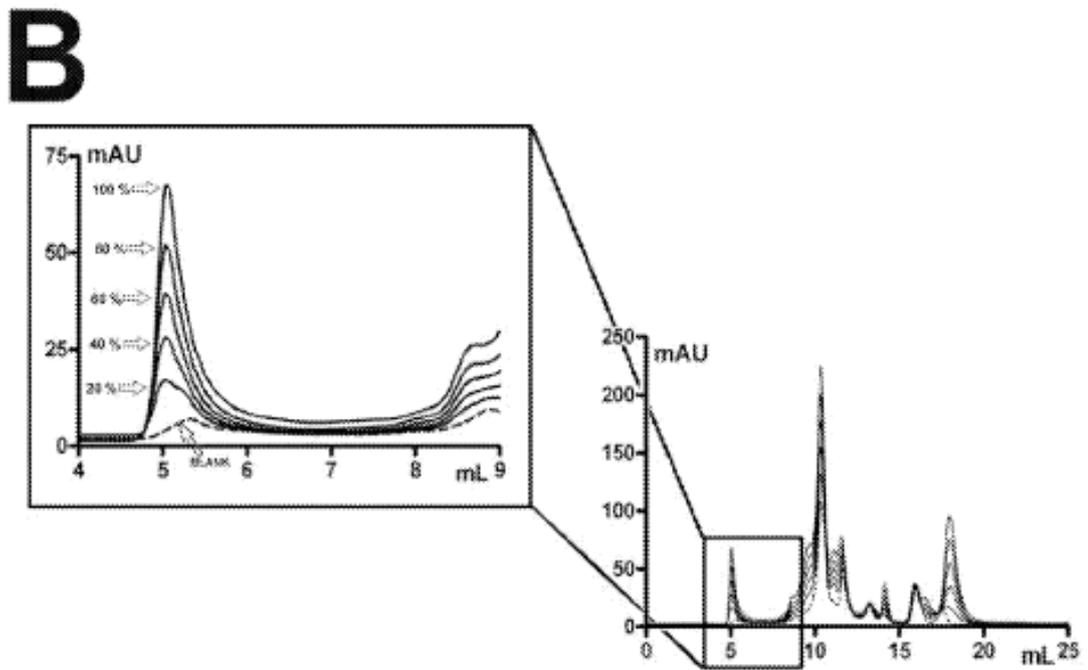


Figura 7C

C

Señal de flujo de U.V. y DLS de PIV-3

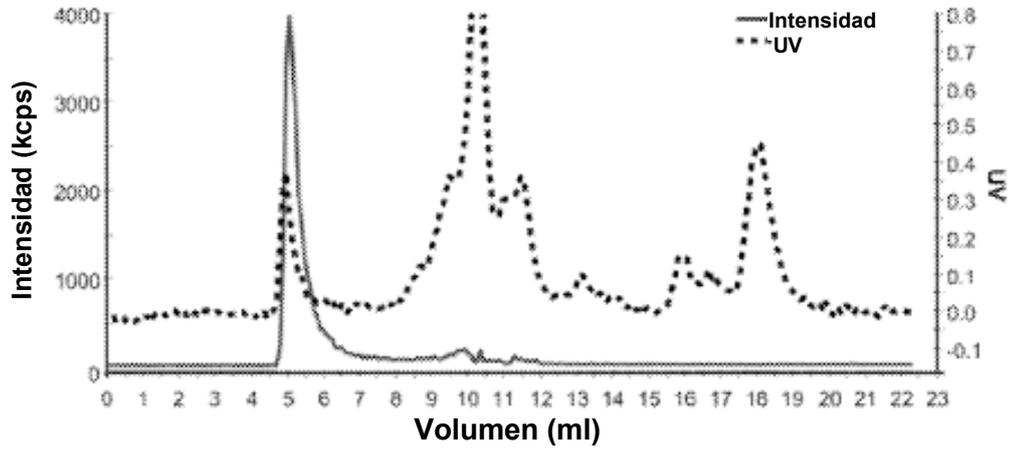


Figura 7D

D

R² = 0,9993

Figura 4A

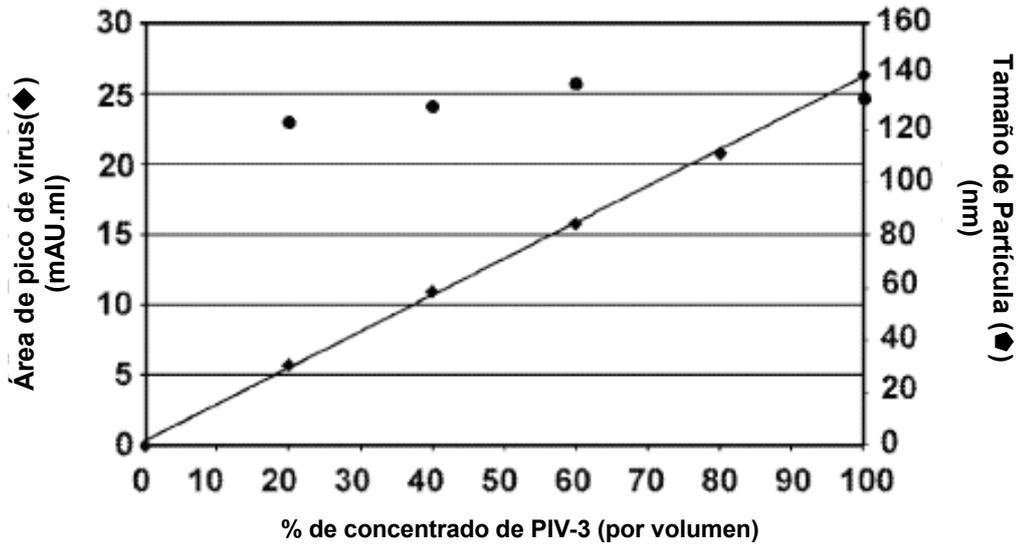


Figura 8A

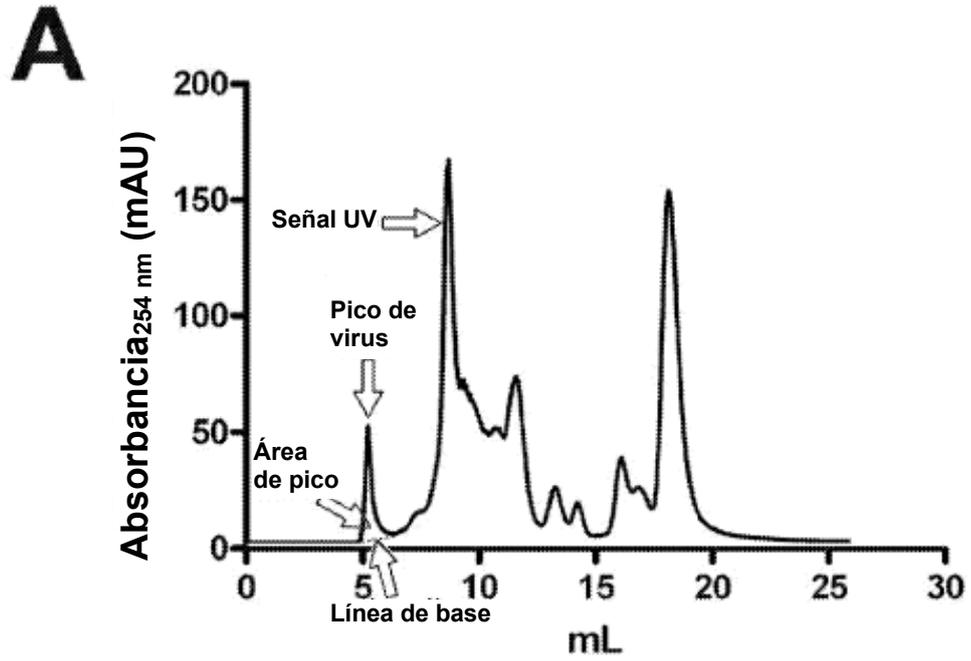


Figura 8B

Figura 1A

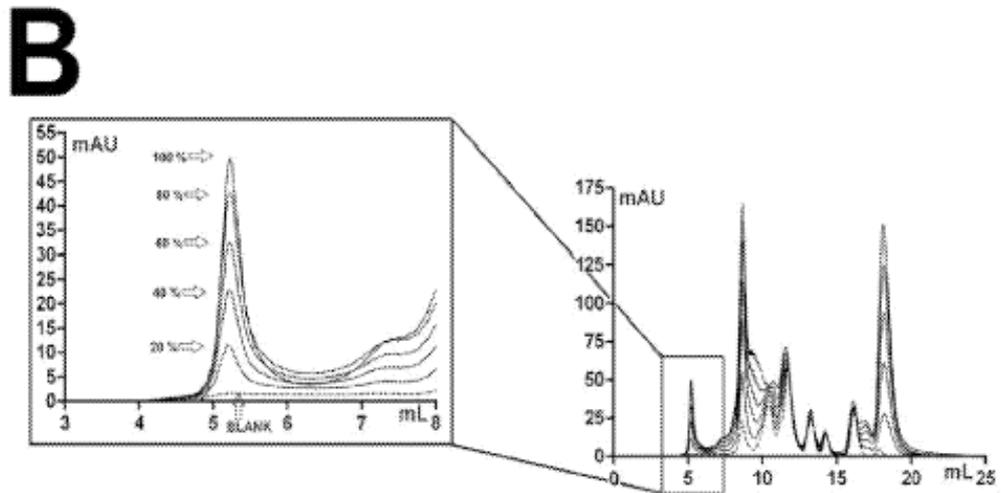


Figura 8C
Figura 1A

C

Señal de flujo de U.V. y DLS del virus de la Rabia

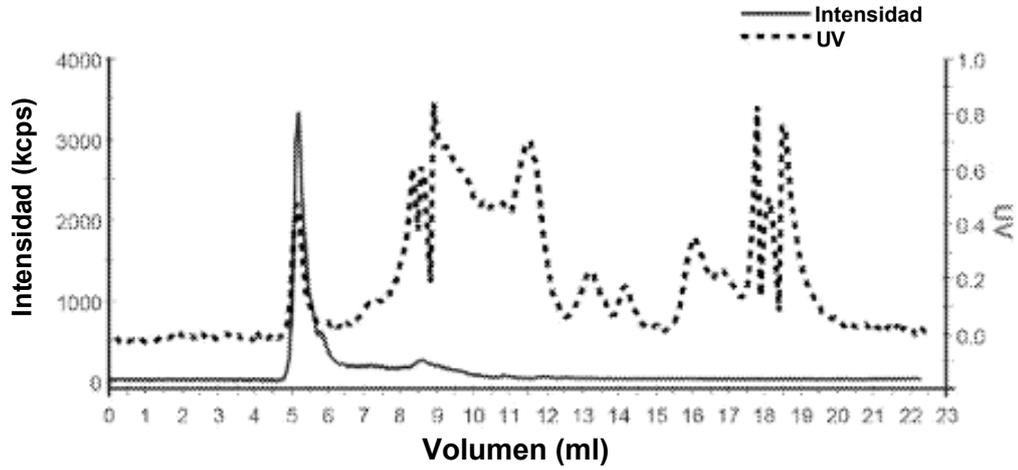


Figura 8D
Figura 1A

D

$R^2 = 0,9972$

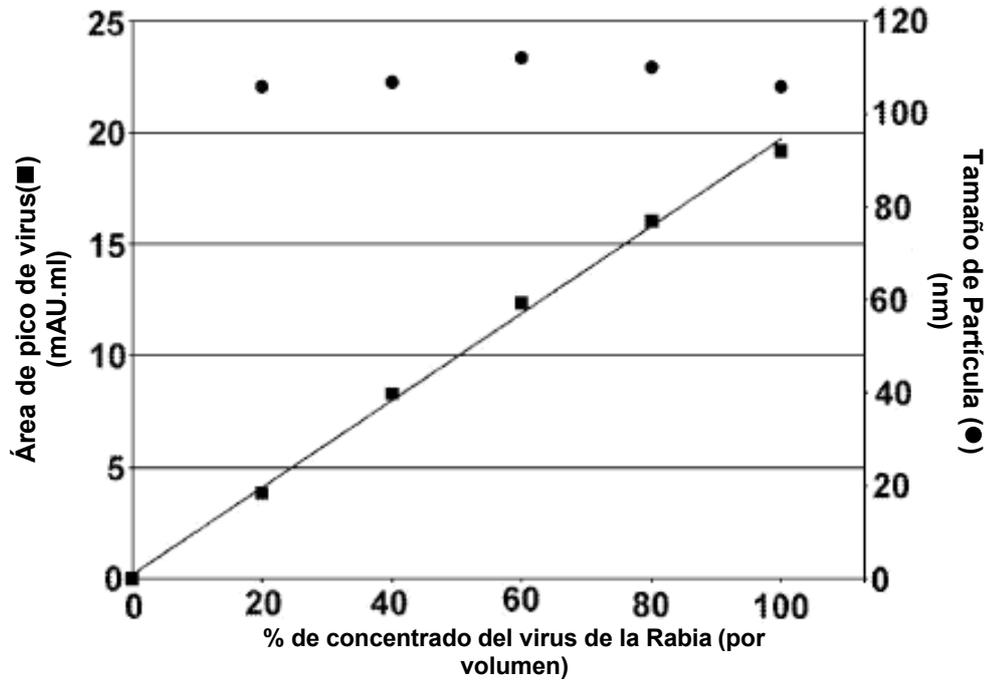


Figura 9
Figura 1A

- Concentración viral ($\mu\text{g/ml}$)
- Tamaño de partícula (nm)
- * Recuento celular ($\times 10^6$ células/ml)

Línea temporal de la infección de FMDV



Figura 10

