

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 053**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014** **PCT/EP2014/066039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015** **WO15011265**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014** **E 14744820 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 3024487**

54 Título: **Procedimiento para la inactivación de virus usando haces de electrones**

30 Prioridad:

26.07.2013 DE 102013012455

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

16.06.2020

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)
Hansastraße 27C
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**ULBERT, SEBASTIAN y
WETZEL, CHRISTIANE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 767 053 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la inactivación de virus usando haces de electrones

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la inactivación de virus, que se caracteriza por que una composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con haces de electrones, en el cual la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus (i) es líquida, especialmente una suspensión, y (ii) contiene al menos un inmunógeno viral.
- 10 El uso de vacunas permite combatir con éxito muchas enfermedades infecciosas en la medicina humana y veterinaria. No obstante, sigue habiendo una gran necesidad de tecnologías de vacunas que protejan de manera efectiva y duradera contra una infección, pero que sean exentas de riesgos para el individuo vacunado. Esto queda evidente en la fabricación de las llamadas vacunas muertas: para la inactivación de virus se usan sustancias químicas tóxicas, tales como formaldehídos, que después deben volver a eliminarse de la vacuna mediante procedimientos complicados. En la medicina veterinaria, las vacunas inactivadas con formaldehído representan la mayor parte de todas las vacunas, en la medicina humana se emplean por ejemplo contra la encefalitis centro-europea, la gripe, la polio o la hepatitis A. El uso de formaldehído conduce a una alteración química (enlace cruzado) de los antígenos virales. Eso a su vez resulta en una eficacia disminuida de la vacuna, lo que se debe compensar mediante cantidades más elevadas de material de partida infeccioso y de potenciador de acción (adyuvantes). Una técnica que evite estos problemas es una clara necesidad insatisfecha de la industria de vacunas.
- 15 Estudios han demostrado que por el formaldehído se destruyen a entre el 30% y el 80% los antígenos importantes para una vacuna exitosa (Amanna y col., "Nature Medicine, 18, 2012"). Estos problemas son conocidos por la industria de vacunas y se están buscando alternativas. Se está experimentando con rayos UV, temperaturas elevadas, rayos gamma o peróxidos. Sin embargo, hasta ahora, ninguna de estas técnicas ha salido de la fase experimental en laboratorio. Diversos procedimientos para la inactivación de virus para la fabricación de una vacuna se describen por ejemplo en Stauffer y col. ("Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery", 2006, 1, 291 a 296).
- 25 Además, se ha descrito que poblaciones de salmonellas pueden reducirse empleando haces de electrones de alta energía (documento US8,173,139B1). Sin embargo, allí no se describe en qué medida se ve perjudicada la estructura de los antígenos. Las salmonellas además son seres vivos con un metabolismo propio. Por lo tanto, no era de suponer que los haces de electrones pudiesen aplicarse en virus que fuera de sus células hospedadoras no disponen de un metabolismo propio.
- 30 En la presente invención se ha encontrado ahora de manera sorprendente que es posible inactivar virus con haces de electrones, sin que durante ello se destruyan proteínas estructurales virales. Por lo tanto, la irradiación con haces de electrones resulta sorprendentemente adecuada especialmente para la fabricación de vacunas de partículas enteras virales inactivadas
- 35 La inactivación de los virus se produce probablemente por la destrucción del ácido nucleico, no quedando dañada o quedando dañada apenas la estructura viral y especialmente la estructura del antígeno. Los resultados al ejemplo del virus PRRSV patógeno porcino están representados en los ejemplos 1 y 2 así como en las figuras 1 a 3. En estos, un líquido, en concreto, una suspensión de estos virus en una solución tampón acuosa se trató con haces de electrones. Dicha suspensión es inmunogénica y resulta adecuada como vacuna contra el PRRSV para cerdos.
- 40 Los resultados con el virus de influenza A están representados en el ejemplo 3 y en las figuras 4 y 5. En este, un líquido, en concreto, una suspensión de estos virus en una solución tampón acuosa se trató con haces de electrones. Dicha suspensión es inmunogénica y resulta adecuada como vacuna contra la influenza A.
- 45 Se describe un procedimiento para la inactivación de virus, que se caracteriza por que una composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con haces de electrones, y en el cual la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus (i) es líquida, especialmente una suspensión, y (ii) contiene al menos un inmunógeno viral.
- 50 Especialmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la inactivación de virus, que se caracteriza por que una composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con haces de electrones, y en el cual la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones comprendida en el intervalo de 15 a 110 kGy y el tiempo de irradiación se sitúa en el intervalo de entre 1 segundo y 100 segundos, y los haces de electrones se aceleran con una energía de aceleración de entre 150 keV y 700 keV, y la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus (i) es líquida, especialmente una suspensión, y (ii) contiene al menos un inmunógeno viral.
- 55 En una forma de realización preferible, el al menos un virus es activo antes de la irradiación y/o la composición inmunogénica o vacuna contiene virus activos. Especialmente, la concentración de virus activos antes de la irradiación en la composición líquida o vacuna, medida como valor TCID₅₀ (50% de dosis infecciosa en cultivo de tejido) por ml de líquido, es de al menos 10⁴, 10⁵, 10⁶ por ml.
- 60

Se revela un procedimiento para la inactivación de virus, que se caracteriza por que una composición que contiene al menos un virus se irradia con haces de electrones, y en el cual la composición que contiene al menos un virus (i) es líquida, especialmente una suspensión, y/o (ii) una composición inmunogénica.

El procedimiento puede aplicarse en cualquier tipo de virus, especialmente en virus envueltos o no envueltos.

En una forma de realización preferible resulta adecuado para virus envueltos, ya que las proteínas de envoltura constituyen unos antígenos aptos para una reacción de vacuna. La estructura del antígeno se conserva con el procedimiento según la invención, mientras que los virus mismos se inactivan (véanse las figuras 1, 2 y 3). Por lo tanto, con el procedimiento según la invención, de manera sorprendente se puede fabricar especialmente una vacuna viral inactivada de partículas enteras para virus envueltos.

En otra forma de realización preferible se puede fabricar una vacuna viral inactivada de partículas enteras para virus no envueltos. Un antígeno adecuado para una reacción de vacuna en virus no envueltos es especialmente una proteína de cápside del virus.

Los siguientes virus pueden irradiarse por ejemplo según la invención:

Virus envueltos, por ejemplo:
Virus ADN bicatenarios, por ejemplo:

el virus de la viruela (causa viruela);
los virus del herpes (por ejemplo, herpes simplex (HSV) (causa herpes labial o genital); el virus de la varicela-zoster (VZV) (causa varicela y herpes zoster)
el virus de Epstein Barr (EBV) (causa la fiebre glandular de Pfeiffer), el virus de citomegalia (CMV) causa citomegalia, el virus del herpes humano 6 7 (causa la fiebre de los tres días), el virus del herpes humano 8 (HHV 8) (causa el sarcoma de Kaposi)

los hepadnavirus, por ejemplo:
el virus de la hepatitis B (causa la hepatitis B), los virus ARN monocatenarios positivos, por ejemplo:

los flavivirus, por ejemplo:
el virus de la hepatitis C (causa la hepatitis C)
los togavirus, por ejemplo:
el virus de la rubéola (causa la rubéola)
los coronavirus (causan inflamaciones gastrointestinales, SARS), los virus ARN monocatenarios negativos, por ejemplo:
los ortomixovirus, por ejemplo:
los virus de la influenza A, B o C (causan influenza)
los paramixovirus, por ejemplo:

los virus de la parainfluenza (causan la parainfluenza)
el virus de del sarampión (causan el sarampión)
el virus de las paperas (causa paperas)
el virus respiratorio sincitial (RSV)
pneumoviridae, por ejemplo los géneros:
pneumovirus, metapneumovirus

los rhabdovirus, por ejemplo:
el virus de la rabia (causa la rabia)

los retrovirus, por ejemplo:

el virus de la inmunodeficiencia humana (causa el SIDA)
el HTLV (causa leucemia)

los virus no envueltos, por ejemplo:

virus de ADN bicatenarios, por ejemplo:

los adenovirus (causan rinitis, resfriados)
los papovirus (causan verrugas)

los virus de ADN monocatenarios, por ejemplo:
los parvovirus, por ejemplo:

el parvovirus B19 (causa eritema infeccioso)
los virus ARN bicatenarios, por ejemplo:
los rotavirus (diarrea)
los virus ARN monocatenarios positivos, por ejemplo:

los picomavirus, por ejemplo:

el virus de la polio (causa la polio)
los virus de coxsackie
los echovirus
el virus de la hepatitis A (causa la hepatitis A)
los rinovirus (causan rinitis, resfriados)

los calcivirus (causan diarrea)

En una forma de realización preferible, el al menos un virus por lo tanto está seleccionado de entre:

- (i) un virus envuelto o un virus no envuelto, especialmente un virus envuelto, y/o
- (ii) un virus ADNbc, un virus ARNbc, un virus ARNmc o un virus ADNmc, y/o
- (iii) un virus patógeno para humanos o patógeno para animales.

En una forma de realización preferible, el animal es un mamífero, especialmente seleccionado de entre cerdos, vacas, caballos, perros, gatos y ovejas.

En una forma de realización más preferible, el al menos un virus está seleccionado de entre un virus ARNbc envuelto, un virus ARNmc- envuelto, o un virus ARNmc+ envuelto, patógenos para humanos y/o patógenos para animales.

En los ejemplos se mostró que el virus PRRS (*“porcine respiratory and reproductive failure syndrome virus”* / virus del síndrome reproductivo y respiratorio), un virus ARN monocatenario positivo de la familia *arteviridae* que infecta a cerdos, se inactivó con el procedimiento según la invención de tal forma que se conservó en gran medida la estructura viral y la estructura del antígeno. De esta manera, se logró fabricar una vacuna viral inactivada de partículas enteras contra el virus PRRS.

En una forma de realización aún más preferible, el al menos un virus está seleccionado de entre un virus ARNmc+ patógeno para humanos y/o patógeno para animales, de forma particularmente preferible de entre un virus de la familia *arteriviridae*, de forma aún más preferible, el al menos un virus es un *“porcine reproductive and respiratory syndrome virus”* (virus PRRS).

En otra forma de realización preferible, el al menos un virus está seleccionado de entre un echovirus, un virus HI, un rotavirus, un virus de la pseudorrabia, un parvovirus, un parvovirus porcino, un virus H5N1, un virus H1N1, un virus de Epstein Barr, un virus de paperas, un virus de influenza A y B, el virus de la encefalitis centro-europea, el virus IPV y el virus de la hepatitis A.

En otra forma de realización preferible, el al menos un virus está seleccionado de entre un virus patógeno para animales, el virus de la influenza A y B, el virus de la encefalitis centro-europea, el virus IPV y el virus de la hepatitis A. Resultan especialmente preferibles los virus de la influenza A y B.

Con el procedimiento según la invención es posible que una composición inmunogénica o vacuna que contiene un (1) virus se irradie tal como está representados en los ejemplos con PRRSV. Sin embargo, también es posible que la composición inmunogénica o vacuna contenga 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más virus distintos. Esto puede ser útil por ejemplo para la fabricación de vacunas combinadas. Estos dos o más virus distintos pueden ser variantes de las mismas especies de virus, o virus de especies, familias o géneros distintos. Por lo tanto, en una forma de realización preferible, la composición inmunogénica o vacuna (i) contiene un virus o (ii) dos o más virus distintos. Pero también es posible fabricar una vacuna combinada, de tal forma que se irradian dos o más virus individualmente y se combinan sólo después de la irradiación.

En los ejemplos, una suspensión de virus PRRSV se irradió con electrones que se aceleraron a menos de 300 KeV, por ejemplo a 150 KeV (véanse las figuras 1 a 5). Los electrones de este tipo están acelerados con baja energía.

El procedimiento según la invención se caracteriza por que los haces de electrones se aceleran con baja energía o con energía media, con una energía de aceleración de entre 150 keV y 700 keV, más preferentemente de entre 200 keV y 500 keV, aún más preferentemente de entre 250 keV y 400 keV.

Es posible trabajar durante ello bajo atmósfera de presión normal o trabajar sustancialmente bajo atmósfera de presión norma y los haces de electrones pueden aplicarse por tanto preferentemente sustancialmente bajo

atmósfera de presión normal. Por sustancialmente bajo atmósfera de presión normal se entiende 1 bar +/- 0,1 bar. La atmósfera de presión normal puede estar presente por ejemplo como oxígeno del aire, nitrógeno o gas de dióxido de carbono.

5 Como se muestra en los ejemplos, el virus PRRSV se pudo inactivar empleando una dosis de 50 kGy, 100 kGy o 200 kGy. Además, se pudo mostrar que el virus de la influenza A en suspensión se inactiva completamente con una dosis de 200 kGy.

La dosis de haces de electrones según la invención se sitúa en el intervalo de 15 a 110 kGy.

10 Se encontró que resulta ventajosa una dosis de al menos 50 kGy para lograr una inactivación lo más completa posible de los virus.

15 Se revela que el procedimiento por lo tanto se caracteriza por que la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones de al menos 50 kGy, de al menos 60 kGy, de al menos 70 kGy, de al menos 80 kGy, de al menos 90 kGy, de al menos 100 kGy, de al menos 110 kGy, de al menos 120 kGy, de al menos 130 kGy, de al menos 140 kGy, de al menos 150 kGy, de al menos 160 kGy, de al menos 170 kGy, de al menos 180 kGy, de al menos 190 kGy, de al menos 200 kGy o de al menos 250 kGy.

20 Además, se encontró que resulta ventajosa una dosis de 300 kGy o inferior para evitar posibles daños de la composición.

25 Se revela que por lo tanto el procedimiento se caracteriza por que la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones de como máximo 300 kGy, de como máximo 250 kGy, de como máximo 200 kGy, de como máximo 190 kGy, de como máximo 180 kGy, de como máximo 170 kGy, de como máximo 160 kGy, de como máximo 150 kGy, de como máximo 140 kGy, de como máximo 130 kGy, de como máximo 120 kGy, de como máximo 110 kGy, de como máximo 100 kGy, de como máximo 90 kGy, de como máximo 80 kGy, de como máximo 70 kGy o de como máximo 60 kGy.

30 Se revela que la dosis de haces de electrones se sitúa en el intervalo de 50 kGy a 300 kGy. Por ejemplo, la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se puede irradiar con una dosis de haces de electrones de 50 kGy, de 60 kGy, de 70 kGy, de 80 kGy, de 90 kGy, de 100 kGy, de 110 kGy, de 120 kGy, de 130 kGy, de 140 kGy, de 150 kGy, de 160 kGy, de 170 kGy, de 180 kGy, de 190 kGy, de 200 kGy, de 210 kGy, de 220 kGy, de 230 kGy, de 240 kGy, de 250 kGy, de 260 kGy, de 270 kGy, de 280 kGy, de 290 kGy o de 300 kGy.

35 Se revela que por lo tanto el procedimiento se caracteriza por que la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones comprendida en el intervalo de 50 kGy a 300 kGy, preferentemente de 50 kGy a 200 kGy, más preferentemente de 50 kGy a 150 kGy, aún más preferentemente de 50 kGy a 120 kGy.

40 En una forma de realización preferible por lo tanto el procedimiento según la invención se caracteriza por que la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones comprendida en el intervalo de 50 kGy a 110 kGy.

45 Se revela que el al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones de 1 a 300 kGy, más preferentemente con una dosis de haces de electrones de 1 a 150 kGy, aún más preferentemente con una dosis de haces de electrones de 10 a 120 kGy.

Según la invención, el al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones de 15 a 110 kGy.

50 En el ejemplo 1 se pudo mostrar que mediante la irradiación con electrones por medio del procedimiento según la invención se consiguió una inactivación en 2,5 niveles de log (figura 1). La inactivación se determinó mediante la medición del valor TCID₅₀.

55 En una forma de realización preferible por lo tanto el procedimiento según la invención se caracteriza por que, tras la irradiación, la actividad del al menos un virus, preferentemente medida como valor TCID₅₀ (50% de dosis infecciosa en cultivo de tejido), es inferior a 5%, preferentemente inferior a 1%, más preferentemente inferior a 0,1% de la actividad antes de la irradiación, de forma aún más preferible, que tras la irradiación ya no se puede detectar ninguna actividad del al menos un virus. Por lo tanto, el valor TCID₅₀ se puede determinar tal como se describe en el ejemplo 2. El experto elegirá para ello un cultivo de tejido adecuado para un virus determinado. En el ejemplo 2, para el virus PRRSV se determinó el valor TCID₅₀ en células Marc145. En el ejemplo 3, se determinó para el virus de la influenza A el valor TCID₅₀ en células MDCK.

65 Para el virus PRRSV envuelto, en los ejemplos se pudo mostrar que bajo las condiciones indicadas se conservaba sustancialmente la estructura del antígeno: la unión de un suero policlonal, dirigido contra el virus no inactivado, al al menos un virus de la composición irradiada correspondía a más de 90% de la unión al virus no inactivado (véase la

figura 1). También se conservaba sustancialmente la estructura del antígeno de virus de influenza que se trataron con una dosis de haces de electrones de 200 kGy (figura 5). La unión de un suero policlonal, procedente de un ser humano infectado con influenza A, al virus irradiado con 200 kGy correspondía a aproximadamente 80% de la unión al virus no inactivado.

5 En otra forma de realización, el procedimiento según la invención por lo tanto se caracteriza por que el al menos un virus es un virus envuelto y por que la estructura de antígeno de los virus de la composición inmunogénica o vacuna se conserva sustancialmente tras la irradiación.

10 En otra forma de realización, el procedimiento según la invención por lo tanto se caracteriza por que el al menos un virus es un virus no envuelto y por que la estructura de antígeno de los virus de la composición inmunogénica o vacuna se conserva sustancialmente tras la irradiación.

15 Los antígenos son sustancias, tales como especialmente proteínas, a los que se pueden ligar específicamente anticuerpos. Para actuar como antígenos, los antígenos o los epítopes contenidos en estos deben estar químicamente y estructuralmente intactos. Frecuentemente, para la unión de los anticuerpos es necesario que se conserve la estructura bidimensional y/o tridimensional de los antígenos o de los epítopes contenidos en estos. Ahora, sorprendentemente se ha encontrado que por la irradiación con haces de electrones se conserva sustancialmente la estructura de antígeno de los virus irradiados y, por tanto, la composición líquida irradiada puede emplearse como vacuna para desencadenar una respuesta inmune específica en un ser humano o animal, especialmente un mamífero.

Un epítopo es una región de un antígeno a la que se liga específicamente un anticuerpo.

25 En una forma de realización especialmente preferible, la unión de un suero policlonal, dirigido contra el virus no inactivado, al al menos un virus de la composición inmunogénica o vacuna irradiadas es de al menos 40%, preferentemente al menos 70%, más preferentemente al menos 80%, aún más preferentemente al menos 90% de la unión del suero policlonal al al menos un virus de la composición inmunogénica o vacuna antes de la irradiación.

30 La unión del suero policlonal al al menos un virus de la composición inmunogénica o vacuna se determina preferentemente por medio del ELISA. La determinación de la unión por medio del ELISA se realiza preferentemente tal como se explica en los ejemplos.

35 ELISA ("Encyme Linked Immunosorbent Assay" / ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) designa un procedimiento de comprobación basado en anticuerpos que es muy conocido por los expertos desde hace décadas. Con la ayuda del ELISA se pueden comprobar sustancias como por ejemplo proteínas. Se sirve de la propiedad de anticuerpos específicos que ligan el antígeno a la sustancia que ha de ser comprobada. Un anticuerpo previamente se marca con una enzima. La reacción catalizada por la enzima reportera sirve como comprobante de la presencia del antígeno. Un sustrato se hace reaccionar por la enzima y el producto de reacción puede comprobarse entonces, por ejemplo mediante la medición de la absorción o quimioluminiscencia.

40 En otra forma de realización, el procedimiento según la invención por lo tanto se caracteriza por que el al menos un virus es un virus envuelto y por que la estructura de antígeno de los virus de la composición se conserva sustancialmente tras la irradiación.

45 En otra forma de realización, el procedimiento según la invención por lo tanto se caracteriza por que el al menos un virus es un virus no envuelto y por que la estructura de antígeno de los virus de la composición se conserva sustancialmente tras la irradiación.

50 En otra forma de realización, la unión de un suero policlonal, dirigido contra el virus no inactivado, al al menos un virus de la composición irradiada es de al menos 40%, preferentemente al menos 70%, más preferentemente al menos 80%, aún más preferentemente al menos 90% de la unión del suero policlonal al al menos un virus de la composición antes de la irradiación.

55 La unión del suero policlonal al al menos un virus de la composición se determina preferentemente por medio del ELISA. La determinación de la unión por medio del ELISA se realiza preferentemente tal como se explica en los ejemplos.

60 Asimismo, para la fabricación de composiciones inmunogénicas y vacunas (sustancias de vacuna) para virus no envueltos y envueltos resulta ventajoso si la estructura viral de los virus se conserva sustancialmente tras la irradiación. Esto es válido especialmente si se desea una vacuna de cuerpos enteros, especialmente una vacuna de cuerpos enteros inactivada. Las vacunas de cuerpos enteros ofrecen la ventaja que contienen los distintos antígenos del virus y por tanto pueden desencadenar una respuesta inmune extensa. En los ejemplos, para un virus envuelto se pudo mostrar que la unión de un anticuerpo dirigido contra un antígeno del virus que estando intacta la envoltura de dicho virus no está accesible para el anticuerpo, en concreto, la proteína N del PRRSV, es sustancialmente igual en la composición irradiada y la del control negativo, mientras que en la composición tratada con peróxido se detectó

un aumento de la unión en más de 400%.

Una vacuna de cuerpos enteros o vacuna de partículas enteras es una vacuna que contiene un virus, cuya estructura de partículas se ha conservado sustancialmente.

5 Una vacuna de cuerpos enteros inactivada o una sustancia de partículas enteras inactivada es una vacuna muerta que contiene un virus, cuya estructura viral está conservada sustancialmente.

10 Una vacuna muerta contiene virus o bacterias o partes integrantes de virus o de bacterias o de sustancias tóxicas, que están inactivadas o destruidas. Estas ya no se pueden seguir reproduciendo dentro del cuerpo.

Un inmunógeno según la presente invención es un antígeno que a causa de su inmunogenicidad es capaz de desencadenar una respuesta inmune.

15 Una composición inmunogénica es una composición que es capaz de desencadenar una respuesta inmune en un ser humano o mamífero. Una composición inmunogénica contiene al menos un inmunógeno. En una forma de realización preferible, una composición inmunogénica es adecuada para la administración a un ser humano o a un animal y por tanto, para la toma por un animal o un ser humano. Por lo tanto, la composición preferentemente no contiene sustancias que no estén homologadas o adecuadas para la administración al ser humano o a un mamífero, especialmente sustancias cancerígenas, fuertemente alergénicas o tóxicas.

20 Una vacuna según la invención contiene al menos un antígeno y/o inmunógeno que a causa de su inmunogenicidad es capaz de desencadenar una respuesta inmune y está preparada para la administración a un animal o un ser humano. Una vacuna resulta adecuada para la administración a un ser humano o un animal. Una vacuna no contiene por tanto sustancias que no estén homologadas o adecuadas para la administración al ser humano o a un mamífero, especialmente sustancias cancerígenas, fuertemente alergénicas o tóxicas.

25 Una vacuna dirigida contra un virus protege preferentemente contra una infección o enfermedad viral o la mitiga. Una vacuna dirigida contra un virus por lo tanto es adecuada preferentemente para la prevención y/o el tratamiento, como por ejemplo la mitigación, de una infección o enfermedad viral en un ser humano o un animal, especialmente un mamífero.

30 En una forma de realización preferible, el procedimiento según la invención por lo tanto se caracteriza por que la estructura viral de los virus se conserva sustancialmente tras la irradiación.

35 En una forma de realización preferible, el procedimiento según la invención por lo tanto se caracteriza por que el al menos un virus es un virus envuelto y por que la estructura viral de los virus se conserva sustancialmente tras la irradiación.

40 En otra forma de realización preferible, el procedimiento según la invención por lo tanto se caracteriza por que el al menos un virus es un virus no envuelto y por que la estructura viral de los virus se conserva sustancialmente tras la irradiación.

45 Una estructura viral se conserva sustancialmente en el sentido de la presente invención, si la unión de un anticuerpo dirigido contra un antígeno del virus que estando intacta la envoltura de dicho virus no está accesible para el anticuerpo, al al menos un virus de la composición, especialmente una composición inmunogénica o vacuna, es tras la irradiación inferior a 400%, preferentemente inferior a 200%, más preferentemente inferior a 150%, aún más preferentemente inferior a 120% de la unión de dicho anticuerpo al al menos un virus de la composición, especialmente la composición inmunogénica o vacuna. Esto se determina preferentemente mediante el ELISA, tal como se muestra en los ejemplos. En la figura 3 se mostró de manera sorprendente que en el caso de la irradiación de una composición inmunogénica líquida que contiene virus PRRSV no queda accesible la proteína (N) de cápside en un ELISA usando un anticuerpo contra dicho antígeno.

50 En otra forma de realización, por lo tanto, la presente invención se refiere además al uso de un procedimiento según la invención para la fabricación de una vacuna viral inactivada de partículas enteras.

55 En los procedimientos según la invención se emplean haces de electrones. En la generación técnica de electrones - tras conectar la corriente - la tensión de aceleración aplicada en su emisión entre el cátodo o el ánodo determina su contenido energético en electronvoltios eV. Cuanto mayor sea este, mayor es la profundidad a la que el electrón provisto de más energía puede penetrar en la materia. La potencia de radiación es el producto de la corriente de haz (cantidad de los electrones generados) y la tensión de aceleración - indicada en kilovatios (kW). En el caso de elevadas potencias de radiación, la dosis de energía necesaria para desencadenar reacciones radioquímicas puede generarse y aplicarse en tiempos muy cortos (fracciones de segundos). En general, pese a su reducida profundidad de penetración, tienen ventaja los haces de electrones, especialmente en procesos de pasada continua de grandes cantidades de producto: se pueden iniciar y realizar procesos físico-químicos pudiendo ajustarse bien técnicamente. Una ventaja esencial es que el proceso de radiación puede conectarse o desconectarse prácticamente pulsando un

botón (por ejemplo, al contrario de los rayos gamma).

Los dispositivos adecuados para generar haces de electrones y los dispositivos para la realización del procedimiento son conocidos en el estado de la técnica (A. Heger: "Technologie der Strahlenchemie von Polymeren", Carl Hanser Verlag München Wien, 1990. ISBN 3-446-15630-5, capítulo 2: "Allgemeine Grundlagen; páginas 25 a 39 y capítulo 4: "Industrielle Bestrahlungsanlagen; páginas 69 a 149; documento DE19638925A1).

Los haces de electrones también resultan ventajosos frente a los rayos gamma: dado que las fuentes de gamma habituales frecuentemente proporcionan sólo aprox. 2 a 6 kGy por hora, dosis más altas sólo pueden realizarse en cursos de tiempo largos, mientras que los emisores de electrones lo consiguen en pocos segundos (altas tasas de dosis) y por tanto son notablemente más productivos.

Con una radiación gamma habitual en aire en instalaciones de servicios comerciales se añade un efecto oxidativo de largo plazo (ozono en caso de aire o radicales de OH de agua) sobre el material tratado o al proceso de reacción, lo que frecuentemente no y ocasionalmente sí trae modificaciones o resultados del producto en el sentido deseado. Con expulsiones de dosis cortas por medio de instalaciones de haces de electrones, que generalmente también están concebidos para trabajos bajo atmósfera inerte, se excluyen este tipo de efectos secundarios a través de un tiempo de influjo más largo.

Preferentemente, el procedimiento según la invención se realiza usando un dispositivo para generar haces de electrones que trabaja de forma continua o con pulsaciones rápidas.

En otra forma de realización preferible, el procedimiento según la invención se realiza usando un dispositivo para generar haces de electrones que proporciona electrones según el principio de cátodo frío o caliente.

En otra forma de realización preferible, el procedimiento según la invención se realiza usando un dispositivo para generar haces de electrones que está realizado como emisor axial (escáner) o como emisor de banda ancha lineal.

En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, los electrones se aplican sobre la composición tras la salida de la cámara generadora, evacuada, del dispositivo, a través de una ventana de salida. Para ello, la composición inmunogénica o vacuna preferentemente está en un contenedor.

En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, la composición inmunogénica o vacuna se recibe de forma estática en el dispositivo o se transporta de forma continua por el haz de electrones.

Además, se puede adaptar la tasa de dosis (corriente de haz / tiempo). En líneas generales, se ha de tener en cuenta que – con respecto a la dosis final aplicada deseada – una elevada corriente de haz requiere poco tiempo de irradiación, y poca corriente de haz requiere un largo tiempo de irradiación. La tasa de dosis es adaptada por el experto teniendo en consideración, por ejemplo en el tubo hendido, la velocidad de paso del medio líquido así como el tipo de emisor.

Por ejemplo, una dosis comprendida en el intervalo de 10 a 300 kGy, especialmente de 50 a 300 kGy, puede aplicarse en un tiempo de hasta 1.000 seg.; dosis bajas de 1 a 25 kGy pueden aplicarse en un tiempo de 0,1 a 100 segundos. Las dosis a partir de 50 kGy que son preferibles requieren típicamente un tiempo de aplicación de 10 segundos a 1.000 segundos. Por lo tanto, en una variante, el tiempo de aplicación es de 10 segundos a 1.000 segundos.

En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la tasa de dosis se sitúa en el intervalo de 1 kGy/0,1 seg a 150 kGy/1.000 seg.

Por lo tanto, en el procedimiento según la invención, el tiempo de irradiación se sitúa en el intervalo de entre 1 segundo y 100 segundos.

Se revela que el tiempo de irradiación se sitúa en el intervalo de 0,1 segundos a 1.000 segundos.

Durante la irradiación se produce típicamente un aumento de temperatura. Para evitar procesos de desnaturalización, por lo tanto, resulta ventajoso si la temperatura sube sólo ligeramente.

En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la temperatura de la composición inmunogénica o vacuna antes de la irradiación se sitúa entre 1 °C y 40 °C, preferentemente entre 5 °C y 37 °C, más preferentemente entre 10 °C y 32 °C, aún más preferentemente entre 15 °C y 30 °C.

En otra forma de realización es posible, realizar la irradiación a temperaturas de la composición antes de la irradiación, inferiores a 1 °C, por ejemplo de composiciones congeladas. En este caso, la composición puede presentar después de la irradiación igualmente una temperatura inferior a 1 °C, o bien, la temperatura de la composición después de la irradiación puede ser de 1 °C o más.

En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, el aumento de temperatura de la composición inmunogénica o vacuna después de la irradiación en comparación con antes de la irradiación se sitúa entre 1 °C y 15 °C, preferentemente entre 2 °C y 10 °C.

5 En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la temperatura de la composición inmunogénica o vacuna después de la irradiación se sitúa entre 2 °C y 41 °C, preferentemente entre 6 °C y 38 °C, más preferentemente entre 11 °C y 33 °C, aún más preferentemente entre 16 °C y 31 °C.

10 La composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus es líquida. Un líquido de este tipo puede estar presente preferentemente como suspensión de virus en una solución acuosa, como en los ejemplos; sin embargo, también puede estar presente una suspensión de mayor densidad.

15 En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la densidad de la composición inmunogénica o vacuna se sitúa entre 0,9 y 2 g/cm³, preferentemente entre 1,0 y 1,8 g/cm³.

20 En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus es una suspensión líquida que contiene agua, preferentemente una suspensión del al menos un virus en una solución acuosa, conteniendo la solución acuosa de forma especialmente preferible una o varias sustancias tampón. La solución acuosa con tampón puede ser por ejemplo PBS. El pH de una solución de este tipo se sitúa preferentemente en el intervalo de pH 5,5 a 8,5, más preferentemente en el intervalo de pH 6,5 a 8,0.

25 Es posible irradiar con el procedimiento una vacuna lista por lo demás, que ya contiene excipientes y/o adyuvantes adecuados.

30 En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la composición inmunogénica o vacuna (a) contiene uno o varios adyuvantes, y/o (b), vehiculantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o (c) uno o varios inmunógenos adicionales.

En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la composición inmunogénica o vacuna se compone de un virus, especialmente un (1) virus, y de

35 (a) uno o varios adyuvantes y/o
(b) vehiculantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, como por ejemplo agua o una solución acuosa adecuada que contiene de manera especialmente preferible una o varias sustancias tampón,

y (c) opcionalmente uno o varios virus o inmunógenos adicionales.

40 En otra forma de realización preferible del procedimiento según la invención, por lo tanto, la composición inmunogénica es una vacuna que contiene al menos un inmunógeno viral y que opcionalmente contiene (a) uno o varios adyuvantes, y/o (b) vehiculantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o (c) uno o varios inmunógenos adicionales.

45 Los vehiculantes y excipientes adecuados y/o adyuvantes adicionales son ampliamente conocidos por el experto. Los adyuvantes adecuados son aquellos que sean suficientes para intensificar una respuesta inmune a un inmunógeno. Los adyuvantes adecuados son por ejemplo sales de aluminio tales como el fosfato de aluminio o el hidróxido de aluminio, las mezclas de escualeno (SAF-1), el péptido de muramilo, los derivados de saponina, las preparaciones de pared celular de microbacterias, el lípido A de monofosforilo, los derivados de ácido micólico, los copolímeros en bloque no iónicos, las sustancias tensioactivas, el quil A, la subunidad B de toxina de cólera, el polifosfaceno y derivados y complejos inmunoestimulantes (ISCs) tales como los que describen en Takahashi y col. (1990) "Nature" 344: 873 a 875.

50 Los vehiculantes y excipientes adecuados son por ejemplo agua o una solución acuosa adecuada para la administración, que de manera especialmente preferible contiene una o varias sustancias tampón.

Otros inmunógenos adecuados son ampliamente conocidos por el experto e incluyen especialmente

60 (a) sustancias orgánicas, especialmente proteínas, que pueden estar glicosiladas o no glicosiladas, ácidos nucleicos, toxinas, o moléculas de azúcar, especialmente sacáridos, que opcionalmente pueden estar unidos a un vehiculantes, y
(b) un virus o un ser vivo, especialmente una bacteria, pudiendo estar activo o inactivado el virus o ser vivo.

65 Otros inmunógenos adecuados son especialmente aquellos que desencadenan una respuesta inmune a un patógeno o factor de patología en el mismo animal o ser humano, como el al menos un virus de la composición. Por ejemplo, si el al menos un virus es un virus patógeno para el ser humano, los inmunógenos adicionales

preferentemente han de seleccionarse de tal forma que desencadenen una respuesta inmune a un patógeno humano y/o que prevengan o mitiguen una enfermedad humana.

5 En el caso de vacunas liofilizadas se pueden añadir agentes estabilizadores como vehiculantes y excipientes, como por ejemplo un poliol como la sacarosa o la trehalosa.

10 Como es habitual en todas las composiciones inmunogénicas o vacunas, la dosis inmunológicamente efectiva debe determinarse de forma empírica. Los factores que deberían tenerse en consideración para ello son si un inmunógeno se debe complejar con un adyuvante o una molécula vehiculante o si se debe unir a esta de forma covalente, el tipo de administración, y la cantidad de las dosis inmunizantes que se deben administrar. Estos factores son ampliamente conocidos en el ámbito del desarrollo de vacunas y el experto en esta materia puede determinar dichos factores sin problemas.

15 El al menos un virus, y dado el caso, uno o varios inmunógenos adicionales, pueden estar contenidos en diversas concentraciones en composiciones inmunogénicas o vacunas. La concentración mínima en una vacuna es habitualmente aquella que sea suficiente para su uso planificado para la vacunación, siendo posible también emplear menores concentraciones durante la irradiación según el procedimiento según la invención y ajustar entonces una mayor concentración en la vacuna acabada, o bien, emplear durante la irradiación según el procedimiento según la invención mayores concentraciones y ajustar entonces una menor concentración en la
20 vacuna acabada. La concentración máxima para la irradiación según el procedimiento según la invención habitualmente es aquella con la que el al menos un virus permanece suspendido homogéneamente durante la irradiación y/o, dado el caso, uno o varios inmunógenos adicionales permanezcan disueltos o suspendidos homogéneamente durante la irradiación. La concentración máxima en una vacuna es habitualmente aquella con la que el al menos un virus inactivado permanezca suspendido homogéneamente y/, dado el caso, uno o varios
25 inmunógenos adicionales permanezcan disueltos o suspendidos homogéneamente.

Las vacunas se pueden usar para proteger o tratar un ser humano o un animal, especialmente un mamífero, mediante su administración, especialmente mediante la administración sistémica o la administración a través de la mucosa. El tipo de administración puede ser elegido por el experto e incluye por ejemplo la inyección por vía
30 intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea, o la administración a través de la mucosa hacia el tracto oral, respiratorio o genitourinario.

La fabricación de vacunas se describe en líneas generales en "Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach"" (editores Powell M. F. & Newmann MJ) (1995) Plenum Press New York).

35 Pero alternativamente también es posible irradiar en primer lugar según la invención una composición inmunogénica que contiene al menos un virus y, a continuación, dado el caso, añadir excipientes y/o adyuvantes adecuados. También se pueden añadir inmunógenos adicionales para la fabricación de vacunas combinadas.

40 En otra forma de realización, la invención por tanto se refiere a un procedimiento para la fabricación de una vacuna que contiene al menos un inmunógeno viral, especialmente una vacuna, y que comprende una vacuna viral de partículas enteras, el cual se caracteriza por que

- 45 (a) el procedimiento según la invención se realiza tal como se ha descrito anteriormente,
- (b1) a la composición, especialmente una composición inmunogénica, que contiene al menos un virus se añaden opcionalmente uno o varios adyuvantes, y/o
- (b2) a la composición, especialmente una composición inmunogénica, que contiene al menos un virus se añaden opcionalmente uno o varios vehiculantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, y/o
- 50 (b3) a la composición, especialmente una composición inmunogénica, que contiene al menos un virus se añaden opcionalmente uno o varios inmunógenos adicionales,

realizándose los pasos (a) a (b3) en un orden discrecional.

55 Para ser adecuada para la aplicación en un animal o un ser humano y para garantizar un transporte seguro y una aplicación en una dosis definida, una vacuna de este tipo habitualmente está envasada de forma estéril y en un contenedor adecuado. Un contenedor de este tipo puede contener varias dosis o dosis individuales.

En otra forma de realización preferible, el procedimiento según la invención para la fabricación de una vacuna se caracteriza por que se realizan los siguientes pasos adicionales:

- 60 (c) la esterilización de la composición inmunogénica, y/o
- (d) el envasado de la composición inmunogénica en un contenedor,

65 pudiendo realizarse los pasos (a) a (d) en un orden discrecional, y a continuación de los pasos (a) a (d), la vacuna opcionalmente se seca, se liofiliza o se congela.

En otra forma de realización del procedimiento según la invención, por lo tanto, la composición que contiene al menos un virus además

- 5 (c) se esteriliza, y/o
(d) se envasa en un contenedor,

pudiendo realizarse los pasos (a) a (d) en un orden discrecional, y a continuación, la vacuna opcionalmente se seca, se liofiliza o se congela.

- 10 Las composiciones inmunogénicas y vacunas obtenidas con el procedimiento según la invención son claramente superiores a las composiciones inmunogénicas en el estado de la técnica, por que no contienen restos de sustancias químicas de inactivación (como el formaldehído) y/o por que se caracterizan por una estructura de antígeno intacta del virus y al mismo tiempo la inactivación del al menos un virus. Este es el caso especialmente en una vacuna de partículas enteras y/o vacuna muerta.

- 15 Por lo tanto, además se revela una composición inmunogénica o vacuna, preferentemente una vacuna, que de manera especialmente preferible contiene una vacuna viral inactivada de partículas enteras y que puede fabricarse mediante un procedimiento según la invención.

- 20 Se trata de una composición inmunogénica o vacuna, preferentemente una vacuna, que contiene una vacuna viral inactivada de partículas enteras para un virus envuelto o no envuelto, preferentemente un virus envuelto, y que se caracteriza por que

- 25 (a) la actividad del virus en la composición inmunogénica o vacuna es inferior a 10%, preferentemente inferior a 1%, más preferentemente inferior a 0,1% de la actividad del mismo número de virus no inactivados, y
(b) la estructura de antígeno de los virus inactivados en la composición inmunogénica o vacuna es sustancialmente igual en comparación con el mismo número de virus no inactivados.

- 30 En una forma de realización preferible de dicha composición inmunogénica o vacuna, la estructura viral de los virus inactivados es sustancialmente igual en comparación con el mismo número de virus no inactivados.

Dicha composición inmunogénica o vacuna se irradió con un haz de electrones, tal como se ha descrito anteriormente.

- 35 Una dosis de haces de electrones de 50 kGy a 300 kGy, preferentemente de 50 kGy a 200 kGy, más preferentemente de 50 kGy a 150 kGy, aún más preferentemente de 50 kGy a 120 kGy, todavía más preferentemente de 50 kGy a 110 kGy, permite una inactivación efectiva de un virus, conservándose al mismo tiempo la estructura viral así como la estructura de antígeno de un virus envuelto o no envuelto, preferentemente de un virus envuelto. La dosis de radiación según la invención se sitúa entre 15 y 110 kGy.

- 40 En otra forma de realización preferible ya no se puede detectar ninguna actividad del al menos un virus en la composición, especialmente en la composición inmunogénica o vacuna. Esto es de importancia especialmente para una vacuna muerta y/o una vacuna viral inactivada de cuerpos enteros.

- 45 La composición inmunogénica, preferentemente una vacuna, fabricada mediante el procedimiento según la invención, es adecuada para el uso como vacuna, especialmente para la prevención o el tratamiento, especialmente la mitigación, de infecciones virales o enfermedades causadas por el virus.

- 50 En otra forma de realización, la invención se refiere al uso de haces de electrones para la inactivación de virus en una composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus, donde la composición inmunogénica o la vacuna (i) es líquida, especialmente una suspensión, y (ii) contiene al menos un inmunógeno viral, situándose la dosis de haces de electrones en el intervalo de 15 kGy a 110 kGy y el tiempo de irradiación en el intervalo de 1 segundo a 100 segundos y acelerándose los haces de electrones con una energía de aceleración de entre 150 keV y 700 keV.

- 55 Se revela el uso de haces de electrones para la inactivación de virus en composiciones líquidas, preferentemente composiciones inmunogénicas líquidas o vacunas, más preferentemente vacunas.

- 60 En otra forma de realización, la invención se refiere al uso de haces de electrones para la fabricación de una vacuna viral inactivada de partículas enteras, situándose la dosis de haces de electrones en el intervalo de 15 kGy a 110 kGy y el tiempo de irradiación en el intervalo de 1 segundo a 100 segundos y acelerándose los haces de electrones con una energía de aceleración de entre 150 keV y 700 keV.

- 65 Los haces de electrones se aceleran con baja energía o con energía media, con una energía de aceleración entre 150 keV y 700 keV, más preferentemente entre 200 keV y 500 keV, aún más preferentemente entre 250 keV y 400 keV y/o se aplican sustancialmente bajo atmósfera de presión normal, estando presente la atmósfera de presión

normal como oxígeno de aire, nitrógeno o gas de dióxido de carbono.

En una forma de realización preferible del uso según la invención, la dosis de haces de electrones se sitúa en el intervalo de 50 kGy a 110 kGy.

5 Se revela el uso de un dispositivo para generar haces de electrones para la inactivación de virus en composiciones líquidas, preferentemente composiciones inmunogénicas líquidas, más preferentemente vacunas, especialmente vacunas líquidas.

10 Se revela el uso de un dispositivo para generar haces de electrones para la fabricación de una vacuna viral inactivada de partículas enteras.

En una forma de realización preferible de los usos según la invención, el dispositivo es adecuado para la emisión de haces de electrones acelerados con baja energía o energía media, preferentemente para la emisión de haces de electrones acelerados con una energía de aceleración de entre 150 keV y 700 keV, más preferentemente para la emisión de haces de electrones acelerados con una energía de aceleración de entre 200 keV y 500 keV, aún más preferentemente para la emisión de haces de electrones acelerados con una energía de aceleración de entre 250 keV y 400 keV.

20 En otra forma de realización preferible de los usos según la invención, el dispositivo es adecuado para la aplicación de haces de electrones sustancialmente bajo atmósfera de presión normal.

En otra forma de realización preferible de los usos según la invención, el dispositivo es adecuado para emitir una dosis de haces de electrones de 50 kGy a 110 kGy.

25 En otra forma de realización de los usos según la invención, el dispositivo es adecuado para emitir una dosis de haces de electrones de 15 kGy a 110 kGy.

30 Las formas de realización preferibles para el procedimiento según la invención son válidas también para los usos y las composiciones inmunogénicas y vacunas según la invención, siempre que sean aplicables.

Figuras:

35 la figura 1: muestra la actividad del virus PRRS después del tratamiento con un haz de electrones (gris) y sin irradiación (negro) Se indican los valores de TCID₅₀ por ml de solución vírica. Dosis: 100 kGy.

40 la figura 2: muestra los resultados relativos a la integridad del antígeno después del tratamiento. Virus PRRS se trataron con haces de electrones (gris), formaldehído (rayas) o no se trataron (negro). La integridad de los antígenos se determinó mediante la incubación con un suero policlonal procedente de un cerdo infectado con PRRSV. Se indican valores OD (densidad óptica) en el ELISA. Dosis: 100 kGy.

45 la figura 3: muestra los resultados de la integridad de la envoltura del virus después del tratamiento. Virus PRRS se trataron con haces de electrones (gris), peróxido (rayas) o no se trataron (negro). La integridad de la envoltura del virus se analizó con un anticuerpo contra la proteína (N) de cápside de PRRSV. Se indican valores OD en el ELISA. Dosis: 100 kGy.

50 la figura 4: virus H3N8 se trataron con electrones de baja energía de 200 kGy (E) o de 0 kGy (NC) y se midió su actividad a través de una determinación de TCID₅₀.

55 La figura 5: la integridad de los antígenos se determinó mediante la incubación con un suero procedente de un ser humano positivo de influenza. Valores son las señales de absorción en un ensayo ELISA. E: Virus H3N8 tratados con una dosis de haces de electrones de 200 kGy; CN: Virus H3N8 tratados con 0 kGy (control).

Ejemplo 1: Resumen de los experimentos

60 Los experimentos se realizaron a modo de ejemplo con el virus PRRS ("porcine respiratory and reproductive failure síndrome virus"). Este virus es un virus ARN monocatenario positivo de la familia *arteriviridae*. El virus infecta a cerdos y causa daños anuales de miles de millones en la industria porcina. El PRRSV se hizo pasar por el haz de electrones en 100 µl de medio líquido y se irradió con 100 kGy. La cantidad de virus empleada era de $2 \cdot 10^4$ TCID₅₀ por fórmula. Después se analizó la actividad de los patógenos así como la conservación de sus antígenos.

65 Para la determinación de actividad, los virus (y los controles no tratados) se aplicaron en células Marc145 y al cabo de tres días se determinó el valor TCID₅₀. Por la irradiación resultó frente al control una reducción de la actividad en 2,5 niveles de log (figura 1). La calidad de los antígenos se examinó mediante mediciones con anticuerpos. Para

ello, se examinaron sueros de cerdos que se habían infectado con una cepa de vacuna de PRRSV. La inmunización con un virus vivo conduce a una extensa respuesta inmune humoral contra los antígenos en su estado original no dañado. Por lo tanto, la medida de la unión de antígenos policlonales, procedentes de un animal inmunizado de esta manera, a un antígeno es un indicador directo de la integridad del antígeno. La figura 2 muestra claramente que las propiedades de unión del suero porcino a los virus PRRS apenas han cambiado por la irradiación de los virus. Por consiguiente, prácticamente todos los antígenos se encuentran todavía en su estado original no dañado, aunque el virus se inactivó en 2,5 niveles de log. Para comparar, se inactivaron virus PRRS también con formaldehído. Este proceso condujo a una clara disminución de la señal de ELISA, y por tanto, a una clara destrucción de los antígenos.

Además, se examinó en qué medida el proceso de inactivación afecta la estructura viral. Esto se midió con un anticuerpo contra la proteína (proteína N) de cápside del PRRSV. Esta proteína queda protegida por la envoltura intacta del virus y no está accesible para anticuerpos. Por lo tanto, una señal indica la envoltura dañada del virus. Como muestra la figura 3, la envoltura del virus sigue intacta tras la irradiación, mientras que en el caso de la activación con peróxido según (Amanna y col., supra) se produce una clara afectación de la estructura. Estos datos indican que en la irradiación con electrones, la inactivación se basa probablemente sobre todo en la destrucción de los ácidos nucleicos, mientras que los antígenos y la estructura viral se mantienen sustancialmente inalterados.

Por lo tanto, el método descrito resulta adecuado para la fabricación de partículas de virus inactivadas, por ejemplo para la fabricación de vacunas, donde ofrece claras ventajas frente al formaldehído: los antígenos se conservan mucho mejor y se puede prescindir de la adición de sustancias químicas tóxicas.

Ejemplo 2: Materiales y métodos

Cultivo de virus, inactivación e irradiación

Cultivos celulares de células Marc145 se infectaron con PRRSV (cepa de vacuna DV). Al cabo de tres días se retiraron los sobrenadantes y se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C con 4.000 x g. Los sobrenadantes depurados de esta manera se aplicaron en capa sobre un colchón de sacarosa al 15% y se ultracentrifugaron durante tres horas con 100.000 x g. Se retiró el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en PBS ("phosphate buffered saline", pH 7,4). Tras la determinación de la infecciosidad, la suspensión de virus se ajustó a una concentración de 2×10^5 TCID₅₀ /ml. Respectivamente 100 µl de esta solución se aplicaron en placas de 6 pocillos (que previamente se recubrieron con 0,5% de agarosa) y se irradiaron con 50, 100 y 200 kGy. Controles negativos se trataron de la misma manera, salvo la irradiación.

Tras la irradiación, la solución que contenía el virus se retiró y se seguía usando en mediciones de TCID₅₀ y de antígenos. El PRRSV se inactivó durante 22 horas con 0,3% de formaldehído. Después, el formaldehído se volvió a eliminar de la suspensión de virus mediante diálisis. La inactivación a través de peróxido se realizó según Amanna y col. (supra) durante 22 horas en 3% de H₂O₂, con una diálisis subsiguiente.

Mediciones de TCID₅₀

Para examinar la actividad de los virus irradiados, series de dilución (respectivamente en pasos de 1:10) de las suspensiones de virus se aplicaron sobre células Marc 145 en placas de 96 pocillos. Al cabo de tres días se determinó el efecto citopático (CPE). Al TCID₅₀ corresponde la dilución con la que el 50% de los pocillos de cultivo celular infectados presentan todavía un CPE.

Mediciones de antígenos

1,5 µl de la suspensión de virus (muestras irradiadas y de control) se incubaron durante la noche a 4 °C sobre placas de microtítulo de 96 pocillos. El día siguiente se realizó un ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") según el protocolo estándar. Para la detección de los antígenos se usó un suero de un cerdo infectado con PRRSV (cepa de vacuna DV) (dilución 1:100). Para la detección se usó un anticuerpo secundario IgG anti-porcino (conjugado con "horseradish peroxidase" (peroxidasa de rábano) Zymed) en dilución 1:5000.

Irradiación con electrones

Para la irradiación, la composición que contenía virus PRRSV se aplicó de manera fina sobre una superficie grande de agarosa. En detalle, se realizó lo siguiente:

- 1.) la fabricación de 0,5 % de geles de agarosa en PBS,
- 2.) el vertido de los geles en un aparato de vertido de gel con un espesor de capa de 1 mm,
- 3.) el corte de los geles con una forma circular con un diámetro de 3,5 cm,
- 4.) el secado de los geles (aprox. 14 h bajo un banco de trabajo estéril en marcha) en placas de Petri (diámetro de 3,5 cm), los controles negativos de dosimetría se secaron entonces con la lámina de dosimetría incorporada ya,
- 5.) la aplicación de 100 µl de suspensión de virus (PBS puro para controles negativos de dosimetría, tiempo de

actuación de aprox. 15 min.),
6.) el embalado con lámina de PET/PE,
7.) la irradiación bajo las condiciones que se indican a continuación.

5 La irradiación se realizó mediante irradiación casi estacionaria de respectivamente 100 ml de medio en aire.

Se usó un emisor de banda de electrones de funcionamiento continuo (tipo Navarone, fabricante: COMET). Los electrones se aceleraron a 150 keV, la corriente de haz era de 5 mA. Distancia de aire entre la composición inmunogénica que contenía virus PRRSV y la ventana de salida de electrones: 45 mm.

10 La aplicación de las dosis de energía de 50, 100 y 200 kGy se realizó en pasos individuales de respectivamente 25 kGy (correspondiendo a 2, 4 u 8 pasadas de las muestras o pasadas lineales con respectivamente 115 mm/seg.). Las dosis de destino se podían lograr bajo atmósfera de presión normal de aire con una precisión de aprox. $\pm 10\%$.

15 La documentación de las dosis aplicadas se realizó de forma espectrométrica por medio de una lámina de dosimetría de cianuro de pararosnilina y un sistema RisöScan con una longitud de ondas de medición de 554 nm. Para la irradiación con 100 kGy, la lámina de dosimetría se cambió después de 50 kGy, ya que el tipo de dosímetro mencionado presenta un intervalo de medición hasta 80 kGy como máximo. Para la dosis de destino de 200 kGy, la lámina de dosimetría se cambió correspondientemente después de 50, 100 y 150 kGy.

20 La muestra cero no mostraba ningún aporte de dosis, es decir que la dosis aplicaba se debe exclusivamente al tratamiento con haz de electrones y el contacto con PBS y con los geles de agarosa no causaba ninguna alteración de las tiras de dosimetría.

25 Ejemplo 3: irradiación de virus de influenza

Virus de influenza A (*equine* influenza H3N8, cepa A/Equine 2/Miami/1/63) se reprodujeron sobre células MDCK y se concentraron de manera análoga a los virus PRRS (ejemplos 1 y 2) mediante ultracentrifugación.

30 La irradiación con haces de electrones igualmente se realizó de manera análoga a los ejemplos 1 y 2, pero con una dosis de 0 kGy (control) y 200 kGy.

Las mediciones de actividad se realizaron mediante una determinación de punto final TCID₅₀. Los antígenos se examinaron en el formato ELISA con el suero de un ser humano infectado con influenza A.

35 Como en PRRSV se muestra una inactivación de los virus de influenza. Con una dosis de 200 kGy ya no se podían detectar virus activos en el cultivo celular (figura 4). A pesar de ello, los antígenos siguen estando presentes estando sustancialmente inalterados (figura 5).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la inactivación de virus, **caracterizado**

por que una composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con haces de electrones,

y

la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones comprendida en el intervalo de 15 a 110 kGy y el tiempo de irradiación se sitúa en el intervalo de entre 1 segundo y 100 segundos, y los haces de electrones se aceleran con una energía de aceleración de entre 150 keV y 700 keV,

y la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus

(i) es líquida, especialmente una suspensión,

y

(ii) contiene al menos un inmunógeno viral.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado**

A) **por que** el al menos un virus por lo tanto está seleccionado de entre:

(i) un virus envuelto o no envuelto, y/o

(ii) un virus ADNbc, un virus ARNbc, un virus ARNmc o un virus ADNmc, y/o

(iii) un virus patógeno para humanos y/o patógeno para animales, preferentemente por que el al menos un virus está seleccionado de entre un virus ARNbc envuelto, un virus ARNmc- envuelto, o un virus ARNmc+ envuelto, patógenos para humanos y/o patógenos para animales, de manera especialmente preferible

a) **por que** el al menos un virus está seleccionado de entre un virus ARNmc+ patógeno para humanos y/o patógeno para animales, de forma particularmente preferible por que el al menos un virus está seleccionado de entre un virus de la familia *arteriviridae*, de forma aún más preferible por que el al menos un virus es un "*porcine reproductive and respiratory síndrome virus*" (virus PRRS) (virus de síndrome reproductivo y respiratorio),

o

b) **por que** el al menos un virus está seleccionado de entre un virus patógeno para animales, el virus de la influenza A y B, el virus de la encefalitis centro-europea, el virus IPV y el virus de la hepatitis A,

y/o

B) **por que** la vacuna o composición inmunogénica (i) contiene un virus o (ii) dos o más virus distintos.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado**

A) **por que** los haces de electrones se aceleran con una energía de aceleración entre 200 keV y 500 keV, preferentemente con una energía de aceleración entre 250 keV y 400 keV y/o los haces de electrones se aplican sustancialmente bajo atmósfera de presión normal, estando presente la atmósfera de presión normal preferentemente como oxígeno de aire, nitrógeno o gas de dióxido de carbono, y/o

B) **por que** la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus se irradia con una dosis de haces de electrones comprendida en el intervalo de 50 kGy a 110 kGy, y/o

C) **por que** tras la irradiación, la actividad del al menos un virus, preferentemente medida como valor TCID₅₀, es inferior a 5%, preferentemente inferior a 1%, más preferentemente inferior a 0,1% de la actividad antes de la irradiación, de forma aún más preferible, que tras la irradiación ya no se puede detectar ninguna actividad del al menos un virus.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado**

A) **por que** la estructura de antígeno de los virus de la composición inmunogénica o vacuna se conserva sustancialmente tras la irradiación, preferentemente, por que la unión de un suero policlonal, dirigido contra el virus no inactivado, al al menos un virus de la composición inmunogénica o vacuna irradiadas es de al menos 40%, preferentemente al menos 70%, más preferentemente al menos 80%, aún más preferentemente al menos 90% de la unión del suero policlonal al al menos un virus de la composición inmunogénica o vacuna antes de la irradiación, determinándose la unión del suero policlonal al al menos un virus de la composición inmunogénica o vacuna preferentemente por medio de ELISA,

y/o

B) **por que** la estructura viral de los virus se conserva sustancialmente tras la irradiación.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que**

(a) la irradiación se realiza usando un dispositivo para generar haces de electrones

- 5 (i) que trabaja de forma continua y/o
(ii) que proporciona electrones según el principio de cátodo frío o caliente y/o
(iii) que está realizado como emisor axial (escáner) o como emisor de banda ancha lineal,
y/o
10 (iv) los electrones se aplican sobre la composición inmunogénica o vacuna tras la salida de la cámara generadora evacuada del dispositivo, a través de una ventana de salida, estando la composición inmunogénica o vacuna preferentemente en un contenedor y/o
(v) la composición inmunogénica o vacuna se recibe de forma estática en el dispositivo o se transporta de forma continua por el haz de electrones,
15 y/o
(b) la tasa de dosis se sitúa en el intervalo de 1 kGy/0,1 seg. a 150 kGy/1.000 seg.
(c) la temperatura de la composición inmunogénica o vacuna antes de la irradiación se sitúa entre 1 °C y 40 °C, preferentemente entre 5 °C y 37 °C, más preferentemente entre 10 °C y 32 °C, aún más preferentemente entre 15 °C y 30 °C, y/o
20 (d) el aumento de temperatura de la composición inmunogénica o vacuna después de la irradiación en comparación con antes de la irradiación se sitúa entre 1 °C y 15 °C, preferentemente entre 2 °C y 10 °C.
(e) la temperatura de la composición inmunogénica o vacuna después de la irradiación se sitúa entre 2 °C y 41 °C, preferentemente entre 6 °C y 38 °C, más preferentemente entre 11 °C y 33 °C, aún más preferentemente entre 16 °C y 31 °C.
25 (f) la densidad de la composición inmunogénica o vacuna se sitúa entre 0,9 y 2 g/cm³, preferentemente entre 1,0 y 1,8 g/cm³, y/o
(g) la composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus es una suspensión líquida que contiene agua, preferentemente una suspensión del al menos un virus en una solución acuosa, conteniendo la solución acuosa de forma especialmente preferible una o varias sustancias tampón y/o
30 (h) la composición inmunogénica o vacuna contiene

(a) uno o varios adyuvantes, y/o
(b) vehiculantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o
(c) uno o varios inmunógenos adicionales,
35 estando seleccionado el o los inmunógenos adicionales de entre:

(i) una sustancia orgánica, especialmente una proteína, que puede estar glicosilada o no glicosilada, un ácido nucleico, una toxina, o una molécula de azúcar que opcionalmente puede estar unida a un vehiculante, y
40 (ii) un virus o un ser vivo, especialmente una bacteria, pudiendo estar activo o inactivado el virus o ser vivo.

6. Procedimiento para la fabricación de una vacuna que contiene al menos un inmunógeno viral, especialmente una vacuna, que comprende una vacuna viral de partículas enteras, **caracterizado por que**

- 45 (a) el procedimiento según la invención se realiza según una de las reivindicaciones 1 a 5,
(b1) a la composición inmunogénica que contiene al menos un virus se añaden opcionalmente uno o varios adyuvantes, y/o
(b2) a la composición inmunogénica que contiene al menos un virus se añaden opcionalmente uno o varios vehiculantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, y/o
50 (b3) a la composición inmunogénica que contiene al menos un virus se añaden opcionalmente uno o varios inmunógenos adicionales,

realizándose los pasos (a) a (b3) en un orden discrecional, realizándose preferentemente los siguientes pasos adicionales:

- 55 (c) la esterilización de la composición inmunogénica, y/o
(d) el envasado de la composición inmunogénica en un contenedor, pudiendo realizarse los pasos (a) a (d) en un orden discrecional,
60

y a continuación de los pasos (a) a (d), la vacuna opcionalmente se seca, se liofiliza o se congela.

7. Uso de haces de electrones

- 65 (a) para la inactivación de virus en una composición inmunogénica o vacuna que contiene al menos un virus, donde la composición inmunogénica o la vacuna

- (i) es líquida, especialmente una suspensión, y
- (ii) contiene al menos un inmunógeno viral,

5 y/o
 (b) para la fabricación de una vacuna viral inactivada de partículas enteras,

10 situándose la dosis de haces de electrones en el intervalo de 15 kGy a 110 kGy y el tiempo de irradiación en el intervalo de 1 segundo a 100 segundos y acelerándose los haces de electrones con una energía de aceleración de entre 150 keV y 700 keV.

15 8. Uso según la reivindicación 7, en el que los haces de electrones se aceleran con una energía de aceleración entre 200 keV y 500 keV, preferentemente con una energía de aceleración entre 250 keV y 400 keV, y/o los haces de electrones se aplican sustancialmente bajo atmósfera de presión normal, estando presente la atmósfera de presión normal preferentemente como oxígeno de aire, nitrógeno o gas de dióxido de carbono.

 9. Uso según la reivindicación 7 u 8, en el que la dosis de haces de electrones se sitúa en el intervalo de 50 kGy a 110 kGy.

20 10. Uso de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de una vacuna viral inactivada de partículas enteras.

Figura 1

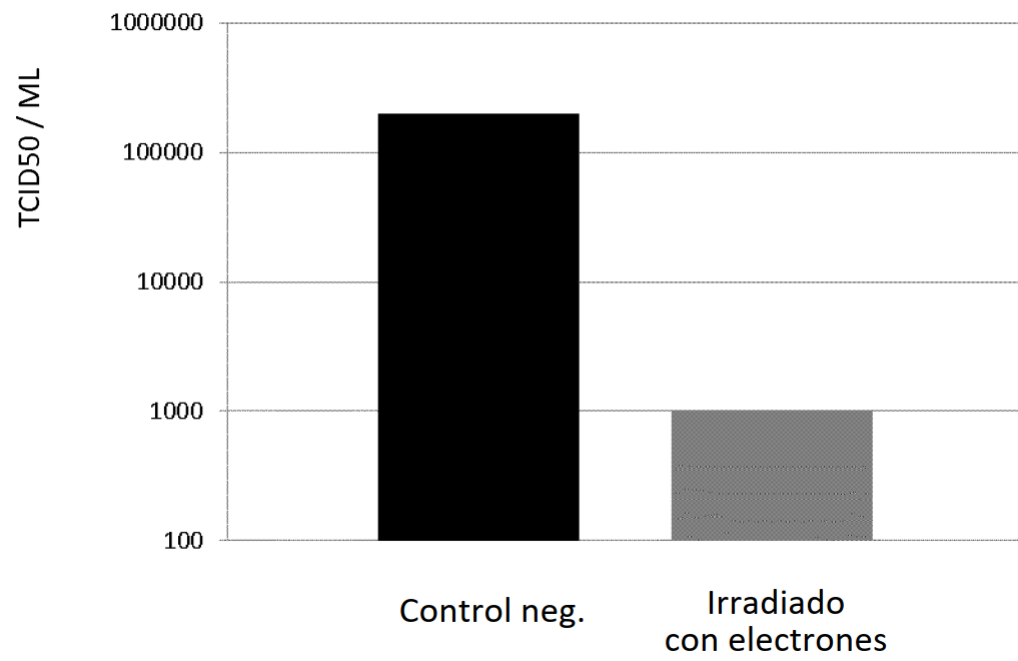


Figura 2

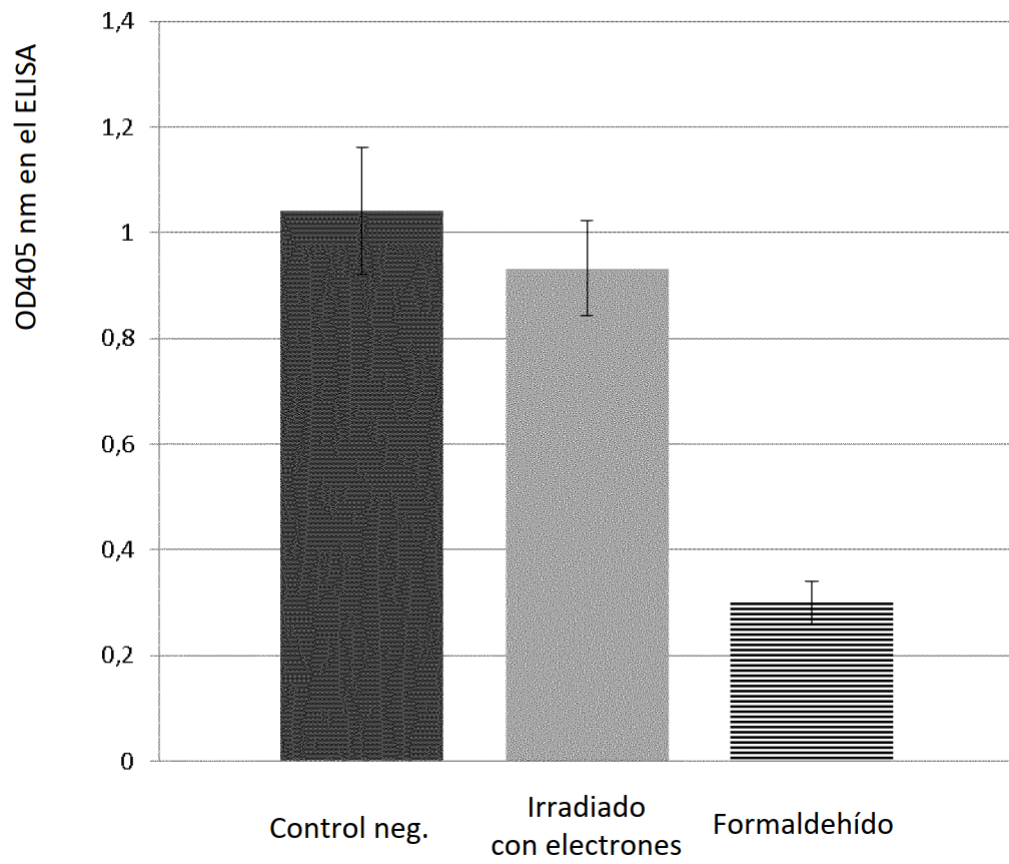


Figura 3

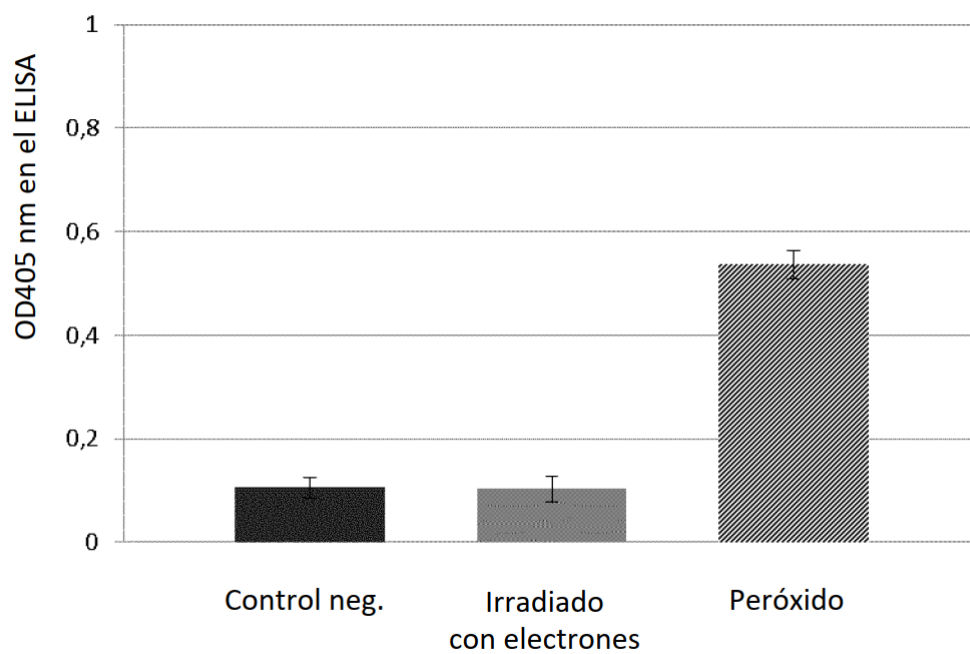


Figura 4

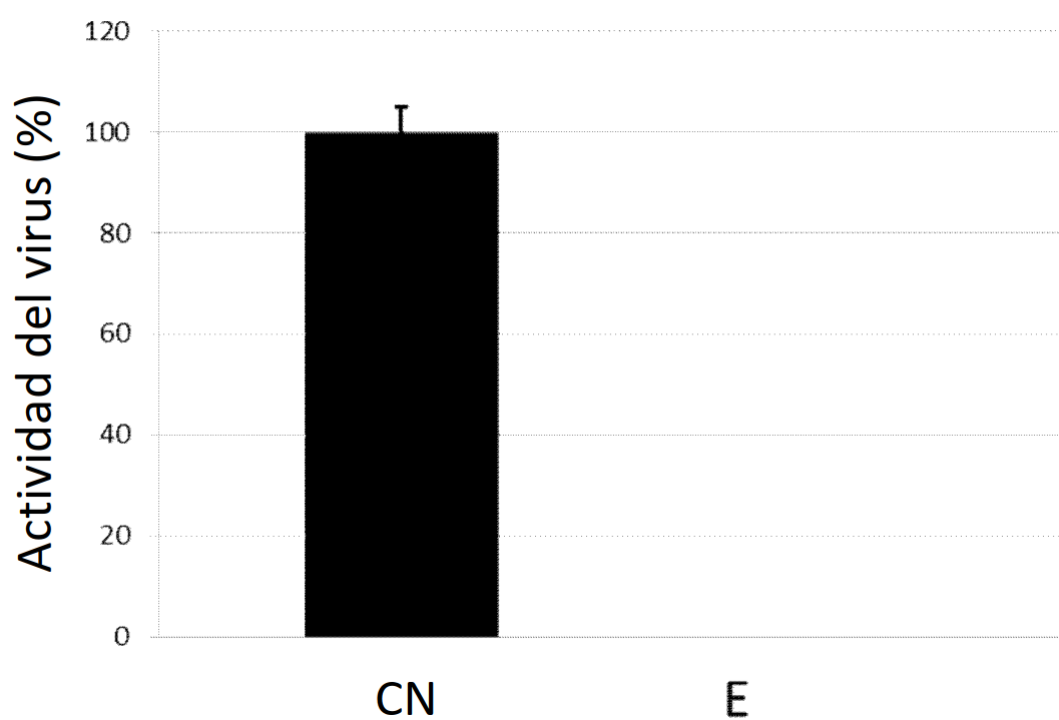


Figura 5

