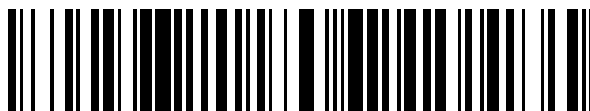


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 839 623**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2017 PCT/US2017/014267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17132059**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2017 E 17702277 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3408280**

54 Título: **Inactivación de virus por deslipidación**

30 Prioridad:

27.01.2016 US 201662287488 P

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

05.07.2021

73 Titular/es:

**ELANCO US INC. (100.0%)
2500 Innovation Way
Greenfield, IN 46140, US**

72 Inventor/es:

**DIAZ, LEYLA y
WU, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 839 623 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

Inactivación de virus por deslipidación

La presente invención se refiere a vacunas que contienen virus envueltos cuyas envolturas se han empobrecido de lípidos utilizando metil β -ciclodextrina (MBCD).

- 5 Un virus es un elemento genético móvil que no tiene actividad metabólica por sí solo. En cambio, un virus puede infectar una célula huésped y utilizar la energía y los procesos de esa célula huésped para reproducirse. Algunos virus están “desnudos”, lo que significa que una partícula viral individual, o virión, está compuesta solo por la cápside que rodea el genoma viral y quizás algunas proteínas no estructurales codificadas por virus. En otros virus, la cápside está contenida dentro de una membrana o envoltura. Debido a que el genoma viral es generalmente
10 demasiado pequeño para codificar proteínas implicadas en la síntesis de lípidos, tales virus envueltos deben construir sus envolturas a partir de los lípidos de la célula huésped. Por lo tanto, el contenido de lípidos de una envoltura viral varía dependiendo de las características lipídicas de la célula huésped.

- Los virus están bien adaptados a sus organismos huéspedes y, a menudo, son patógenos lo que causa enfermedades e incluso la muerte de sus huéspedes. Los virus pueden tener un gran impacto económico, ya sea infectando a los seres humanos y/o sus animales de compañía, o afectando a las plantas y animales que son una fuente de alimento. Las vacunas son el método preferido para proteger a un animal huésped de la infección viral. Una vacuna crea respuestas inmunitarias protectoras a virus que comprenden anticuerpos e inmunidad celular. A menudo se requieren ambos tipos de respuestas para reducir las nuevas infecciones de las células huésped y para eliminar las partículas virales y las células infectadas del huésped.

- 20 Hace casi 40 años, Moore et al., (J. Virol. 27(2): 320-329, 1978) demostraron utilizando vesículas sin colesterol que la reducción del colesterol de las envolturas virales podría reducir la capacidad de las partículas virales para infectar sus células diana. Por el contrario, otros investigadores reportaron que la infectividad viral requería la presencia de colesterol en la membrana de la célula diana, pero no en la envoltura viral. Otros han postulado que el proceso de eliminación del colesterol, más bien que la falta de colesterol en las envolturas, es la causa de la disminución de la infectividad. Independientemente del papel del colesterol en la función del virus, no se ha demostrado la pérdida completa y permanente de la infectividad de los virus con la disminución de colesterol, ni se ha demostrado que los virus con disminución de colesterol sean útiles en vacunas seguras y eficaces.

- Se han reportado medios químicos para la eliminación del colesterol, tales como, por ejemplo, el uso de ciclodextrinas, n-butanol, di-isopropil éter (DIPE), fluoroéter tal como sevoflurano, tensioactivos tales como TRITON X-100™ (polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter o polioxietilen octil fenil éter) o TWEEN 20™ (PEG (20) monolaurato de sorbitán), dietil éter, y combinaciones de los mismos. Algunos medios químicos han resultado demasiado duros, dando como resultado la pérdida de proteínas virales de los viriones o cambios estructurales en las proteínas restantes. La presencia y la conformación nativa de las proteínas serían necesarias para que los viriones empobrecidos en colesterol fueran útiles en las vacunas, particularmente en las vacunas que estimulan la
35 producción de anticuerpos neutralizantes dirigidos a las proteínas de la envoltura viral.

- En algunos casos, se ha demostrado que la reducción del colesterol es reversible. La adición de colesterol exógeno podría reconstituir la envoltura viral y restaurar la infectividad. Esto podría plantear un problema de seguridad con respecto al uso de virus con colesterol reducido en las vacunas, ya que el colesterol y otros lípidos presentes en la sangre u otros fluidos corporales, o incluso las membranas de la célula huésped que entran en contacto con los viriones con colesterol reducido, podrían potencialmente reconstituir los viriones y restaurar la infectividad.

- Las vacunas que contienen virus atenuados se consideran normalmente que son las más eficaces para generar inmunidad protectora. Sin embargo, existe una preocupación por la seguridad de que los virus atenuados puedan mutar o recombinarse y, por lo tanto, volver a un estado virulento. Los virus inactivados (es decir, muertos) generalmente se consideran que son más seguros para su uso en vacunas, pero los medios de inactivación a menudo alteran o destruyen los epítomos antigénicos, por lo que la eficacia como estimuladores de la inmunidad protectora disminuye o se pierde.

- Cham et al., 2006 describen la deslipidación de un hepadnavirus y analiza la inactivación viral y el desarrollo de vacunas (J Virol Methods. 2006 Oct; 137(1): 160-3). El documento de Patente US2009/017069 se refiere a las composiciones de la vacuna de SARs y los métodos para producirlas.

- Debido a la falta de vacunas eficaces, los virus envueltos siguen planteando un riesgo para la salud de los seres humanos y los animales no humanos, y las enfermedades causadas por virus envueltos tienen un enorme impacto económico. Se necesitan vacunas mejoradas que sean tanto seguras como eficaces. Por ejemplo, un método mejorado de inactivación de virus envueltos que conservan la inmunogenicidad de los antígenos virales, mantiene intactos los viriones y presenta poco o ningún riesgo de seguridad sería beneficioso para aliviar las enfermedades provocadas por virus envueltos. La presente solicitud describe dicho método mejorado de inactivación viral, que comprende la deslipidación de envolturas virales con MBCD.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método para preparar un virus envuelto inactivado que comprende mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo. Una concentración de MBCD en la primera mezcla es al menos de 5 mM a 100 mM. Además, una concentración de MBCD en la primera mezcla es de 20 mM a 40 mM. Más aún, una concentración de MBCD en la primera mezcla es de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 40 mM. Además, una concentración de MBCD en la segunda mezcla es de al menos 10 mM a 100 mM. Además, una concentración de MBCD en la segunda mezcla es de 30 mM a 50 mM. Un primer periodo de tiempo es de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas. Además, el primer periodo de tiempo es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas. Más aún, el primer periodo de tiempo es aproximadamente de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, o 24 horas.

Un segundo periodo de tiempo es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 48 horas. Además, el segundo periodo de tiempo es de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas. Más aún, el segundo periodo de tiempo es 24, 30, 36, 40, 44, o 48 horas.

Una temperatura de la primera mezcla durante el primer periodo de tiempo es temperatura ambiente, o de 20°C a 25°C. Además, la temperatura de la primera mezcla durante el primer periodo de tiempo es de 22°C a 24°C.

Una temperatura de la segunda mezcla durante el segundo periodo de tiempo es temperatura ambiente, o de 20°C a 25°C. Además, la temperatura de la segunda mezcla durante el segundo periodo de tiempo es de 22°C a 24°C.

El virus envuelto se puede aislar de la primera mezcla antes de la etapa de obtención de la segunda mezcla. Alternativamente y sin limitación, la segunda disolución de MBCD se podría mezclar directamente con la primera mezcla. El mezclado directo podría realizarse en el mismo recipiente de inactivación que el primer mezclado, o la primera mezcla podría trasladarse a un nuevo recipiente de inactivación antes de mezclar con la segunda disolución de MBCD.

La presente invención proporciona un método para preparar un virus envuelto inactivado que comprende mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo; en donde el primer periodo de tiempo comprende además mezclar la primera mezcla. La agitación podría ser de aproximadamente 30 rpm a aproximadamente 100 rpm. Preferiblemente, la agitación podría ser de aproximadamente 40 rpm a aproximadamente 60 rpm. Lo más preferible, la agitación podría ser aproximadamente 50 rpm.

La presente invención proporciona un método para preparar un virus envuelto inactivado que comprende mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo; en donde el segundo periodo de tiempo comprende además mezclar la segunda mezcla. La agitación podría ser de aproximadamente 30 rpm a aproximadamente 100 rpm. Preferiblemente, la agitación podría ser de aproximadamente 50 rpm.

La presente invención proporciona un método para preparar un virus envuelto inactivado que comprende mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo; en donde el virus envuelto es un virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS). El virus envuelto podría ser también un virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV).

La presente invención proporciona un virus envuelto deslipidado obtenido por el método de mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo según las reivindicaciones. También se describe en la presente memoria una vacuna que comprende el virus envuelto deslipidado obtenido mediante el método de mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo. También se describe en la presente memoria una vacuna que comprende un virus envuelto deslipidado obtenido mediante el método de mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo; en donde la

vacuna comprende además al menos uno de un adyuvante, un estabilizador, un conservante, y un diluyente de mezcla. Preferiblemente, el adyuvante es un adyuvante polimérico acuoso, en donde el polímero es acrilato o poliacrilato. Preferiblemente, el estabilizador comprende al menos uno de azúcares, carbohidratos, proteínas, y gelatinas. Preferiblemente, el conservante es un compuesto antibiótico o bioestático que retrasa, inhibe o previene el crecimiento, la actividad metabólica o la multiplicación de microorganismos. Preferiblemente, el diluyente de mezcla es agua, una disolución salina tamponada de fosfato, un medio de cultivo celular u otra disolución que comprenda salinidad y pH fisiológicos.

En la presente memoria se describe el uso de un virus envuelto deslipidado obtenido mediante el método de mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo; en donde el uso comprende el tratamiento de una enfermedad o síntoma provocado por un virus envuelto.

En la presente memoria se describe el uso de un virus envuelto deslipidado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o síntoma provocado por un virus envuelto; en donde el virus envuelto deslipidado se obtiene mediante el método de mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de MBCD para obtener una primera mezcla; incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo; mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo.

Como se utiliza en la presente memoria, un “virus envuelto” es cualquier virus que tiene una membrana de bicapa lipídica, o envoltura, que rodea un núcleo de nucleoproteína. Las envolturas virales se derivan típicamente de las membranas de las células huésped y contienen fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos, y esteroides tales como el colesterol. Los virus envueltos incluyen virus que tienen genomas codificados por DNA o RNA. Las especies de virus envueltos incluyen, sin limitación: herpesvirus, poxvirus, iridovirus, hepadnavirus, retrovirus, ortomixovirus, arenavirus, bunyavirus, paramixovirus, mononegavirus, rabdovirus, filovirus, coronavirus, arterivirus, flavivirus, y togavirus. Se están descubriendo nuevos virus con envoltura, y los virus envueltos se están clasificando y re-clasificando a medida que cada virus se caracteriza mejor. Una descripción más completa de los virus envueltos se puede encontrar en textos tales como Fields Virology (D.M. Knipe and P.M. Howley, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2013), ahora en su sexta edición.

El término “virus” como se utiliza en la presente memoria, podría significar las especies de virus o, de manera intercambiable, una unidad o unidades infecciosas individuales que contienen ácidos nucleicos, proteínas y una envoltura. Una “partícula viral” es una unidad infecciosa individual, y este término es sinónimo del término “virión”.

La “deslipidación” es el proceso de eliminar o reducir los lípidos de la envoltura viral. La deslipidación se mide por la cantidad de colesterol eliminado de las partículas virales por MBCD. Sin embargo, la MBCD también podría extraer, eliminar o reducir otros lípidos, como los fosfolípidos. También se ha demostrado que la MBCD interactúa con algunas proteínas, aunque el proceso descrito en la presente memoria minimiza la pérdida de proteínas de las proteínas virales como resultado de la deslipidación mediada por MBCD.

La “infectividad” es la capacidad de un virus para establecer una infección dentro de una célula huésped, que es cualquier célula de un ser humano o un animal no humano capaz de soportar la replicación del virus. La infectividad se puede medir, por ejemplo, mediante el número o porcentaje de células huésped infectadas por un número determinado de partículas virales, o por el número o porcentaje de partículas virales necesarias para infectar una célula huésped. Las partículas virales se pueden enumerar operativamente, tal como mediante la determinación del número de unidades formadoras de placa (PFU) dentro de un volumen de partículas virales. Las partículas virales también se pueden medir físicamente, tal como por la presencia de una proteína viral particular detectada, por ejemplo, mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), o mediante la medición del número de copias de un genoma viral presente en una disolución, detectadas, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Un “antígeno” es cualquier molécula capaz de ser detectada específicamente por el sistema inmunológico de un organismo. Normalmente, un antígeno viral es una proteína viral codificada por el genoma viral. La presencia de antígenos virales puede detectarse tanto por linfocitos T como por linfocitos B. La “inmunogenicidad” se refiere a la capacidad de un antígeno para provocar una respuesta inmune. Para las vacunas, la inmunogenicidad de un antígeno viral daría como resultado preferentemente una inmunidad protectora en un animal que reduciría, mitigaría o mejoraría una infección viral.

A diferencia de un antígeno, un “adyuvante” es un estimulador no específico de una respuesta inmune. Un adyuvante podría estimular la respuesta inmune innata mediante la unión y la activación a un receptor de reconocimiento de patrones (PRR). Dichos estimuladores de PRRs podrían ser, por ejemplo, ácidos nucleicos virales o bacterianos, lípidos de bacterias o parásitos, o proteínas o toxinas bacterianas, o cualquier imitador de dichas moléculas construido artificialmente. Los adyuvantes también incluyen, sin limitación: compuestos inorgánicos que añaden antígenos para facilitar el reconocimiento por los linfocitos B o la absorción por los fagocitos,

tales como alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidróxido de fosfato de calcio o sulfato de amonio; aceites; y detergentes. Los adyuvantes también podrían ser mediadores del huésped de la señalización inmune, tales como, sin limitación, citoquinas, linfoquinas, quimioquinas, interferones, anafilatoxinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación y moléculas de adhesión.

- 5 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “que trata”, “tratar”, o “tratamiento”, incluyen restringir, ralentizar, detener, reducir, mejorar o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente. Se puede aplicar un tratamiento de forma profiláctica o terapéutica.

10 Como se utiliza en la presente memoria “administrar a un animal” incluye la administración cutánea, subcutánea, intramuscular, mucosa, submucosa, transdérmica, oral o intranasal. La administración podría incluir inyección o administración tópica.

15 Los siguientes ejemplos experimentales son ilustrativos de los procesos de deslipidación. Los virus envueltos contienen diferentes niveles de colesterol en sus envolturas, dependiendo, por ejemplo, sin limitación, del tipo y especie de virus envuelto y la célula huésped en la que se replica el virus envuelto. Como apreciará un experto en la técnica, los procesos de deslipidación descritos en la presente memoria pueden requerir optimización para cada solución madre del virus en particular. Las membranas de los microorganismos pueden contener colesterol, hopanoides u otros esteroides y moléculas similares a los esteroides y, por lo tanto, los patógenos distintos de los virus también pueden inactivarse mediante los métodos descritos en la presente memoria.

EJEMPLO 1

20 La cepa del virus de la gripe humana H1N1 A/WSN/33 se deslipida utilizando los procedimientos siguientes. En los ejemplos siguientes, la deslipidación del virus de la gripe (IFV) daña la infectividad. Debido a que el método de deslipidación de la presente invención conserva las proteínas de la envoltura viral, se espera que los animales inoculados con el IFV deslipidado desarrollen respuestas inmunogénicas que los protejan de la infección de una dosis patógena del virus virulento.

Reactivos

25 La cepa de la gripe humana H1N1 A/WSN/33 y su línea de células huésped MDCK están disponibles en Wuxi AppTec (Shanghai, China). Otros reactivos incluyen MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA); EMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); Medio sin suero ULTRAMDCK™ (Lonza, Inc., Allendale, NJ); suero bovino fetal (FBS; Invitrogen); 0,25% de Tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetracético; Invitrogen); metil-β-ciclodextrina (MBCD, Sigma-Aldrich); Kit de AMPLEX Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen); PIERCE™ BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL); y MTT (Sigma-Aldrich).

Propagación del virus de la gripe H1N1 A/WSN/33 en la línea celular MDCK:

35 Las células se siembran con IFV según el siguiente procedimiento. El medio se retira de las células MDCK cultivadas en matraces T-75, las monocapas de células MDCK se enjuagan con 5 mL de PBS a temperatura ambiente y las células se separan con 1,5 mL de tripsina/EDTA a 37°C. Las células se re-suspenden en 10 mL de MEM que contiene un 10% de FBS y se sedimentan por centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se re-suspenden en MEM que contiene un 10% de FBS, y la densidad celular se ajusta a $2,5 \times 10^5$ células/mL. Se siembran quince mL de la suspensión de células MDCK en cada matraz T-75, y los matraces se colocan a 37°C con CO₂ al 5% y se incuban durante la noche.

40 Cuando las células MDCK tienen más del 90% de confluencia, se elimina el MEM de los matraces T75, se añaden 5 mL del medio de mantenimiento EMEM que contiene 1% de FBS y 1 µg/mL de tripsina, y las células se infectan con el virus de la gripe en una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Los matraces se incuban durante 60 – 90 minutos a 37°C con CO₂ al 5% y se agitan suavemente cada 15 minutos. Se añaden diez mL del medio de mantenimiento que contiene 1% de FBS y 1 µg/mL de tripsina a cada matraz, y los matraces se incuban durante 48 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Cuando se logra aproximadamente el 80% del efecto citopático (CPE) del virus
45 (generalmente después de aproximadamente 48 horas), se recolectan los sobrenadantes del cultivo para obtener IFV.

Purificación y titulación de IFV del H1N1 A/WSN/33:

50 IFV se purifica según el siguiente procedimiento. El sobrenadante del cultivo recogido se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos para eliminar los restos celulares y se recoge el sobrenadante. El sobrenadante se centrifuga a 38000 rpm durante 60 minutos para sedimentar el IFV. Los sedimentos de IFV se re-suspenden en un volumen apropiado de disolución salina tamponada fisiológicamente (PBS) para dar un título final de $> 1,0 \times 10^9$ unidades formadoras de placa/mL (PFU/mL). Alícuotas de 100 µL de esta disolución madre de IFV concentrada se almacenan a -80°C.

55 El IFV se valora para la infectividad *in vitro* utilizando el siguiente procedimiento. Utilizando los procedimientos de transferencia y cultivo celular anteriores, las células MDCK se suspenden en MEM que contiene FBS al 10% a una

densidad final de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Se añaden dos mL de suspensión de células MDCK a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y las placas se incuban durante la noche a 37°C con CO₂ al 5%. Las disoluciones madres virales se descongelan en un baño de agua a 37°C, seguido de centrifugación a 500 x g durante 10 minutos a 4°C. Se prepara una serie de diluciones 1/10 de la disolución madre y se almacena a 4°C hasta su uso, utilizando un medio libre de suero ULTRAMDCK™ y 2,5 µg/mL de tripsina como tampón de dilución.

Cuando las células tienen al menos un 90% de confluencia, se elimina el medio y se añaden 0,5 mL de tampón de dilución y 0,5 mL de dilución del virus en cada pocillo. Para el control negativo, se utiliza 1,0 mL de tampón de dilución. Las placas se agitan suavemente inmediatamente después de añadir cada dilución. Las placas se incuban durante 60-90 minutos a 37°C en CO₂ al 5% y se balancean cada 15 minutos. Cada pocillo de cada placa de 6 pocillos se recubre después con 3 mL de una mezcla 1:4 de agarosa de bajo punto de fusión al 2,5% en disolución de PBS y tampón de dilución a 37°C. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir solidificar la mezcla de recubrimiento; después las placas se incuban a 37°C con CO₂ al 5% durante 3 días.

Las placas se visualizan utilizando el siguiente procedimiento. Una vez que las placas se han desarrollado completamente (3 días después de la infección), se añade 1 mL de paraformaldehído al 4% y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Se descarta la agarosa solubilizada y se añaden 0,1 mL de violeta cristal al 0,5% a cada pocillo. El número de placas se cuenta después de 15 minutos de incubación y se convierte en un título basado en los factores de dilución.

Deslipidación

El proceso de deslipidación para el IFV purificado se ejecuta en dos reacciones paralelas: un tratamiento con disolvente que comprende poner en contacto el IFV con MBCD y un tratamiento simulado, donde los IFV se tratan de la misma manera, pero sin exposición a la MBCD. El mismo título de IFV se utiliza tanto en el tratamiento simulado como con el disolvente. El IFV en el tratamiento simulado puede titularse para proporcionar una medida indirecta de la cantidad de IFV deslipidado que queda después del tratamiento con disolvente.

Los tratamientos con disolventes y simulados se realizan según el siguiente procedimiento. Se diluyen alícuotas (100 µL) de la disolución madre de IFV preparada anteriormente ($> 1,0 \times 10^9$ PFU/mL) en 900 µL de PBS en tubos Eppendorf para lograr un título final de $1,0\text{-}5,0 \times 10^8$ PFU/mL. Se añade la MBCD en PBS a una concentración final de 50 mM para el tratamiento con disolvente, o se añade un volumen igual de PBS al tratamiento simulado. Los tubos Eppendorf se tapan y sellan con parafilm. Todas las muestras se aseguran en un agitador orbital de baño de aire de temperatura constante SHZ-82 (Changzhou Guohua Appliance Co., China) precalentado a 37°C. Las muestras tratadas con disolvente y simuladas se centrifugan a una velocidad de rotación orbital de 220 rpm a 37°C durante 30 minutos o 45 minutos. Las muestras se centrifugan en una micro-centrífuga durante 1 minuto y los sobrenadantes que contienen IFV se transfieren a tubos de ultracentrífuga. Los tubos se centrifugan a 200000 x g (OPTIMA™ L-100XP; Beckman Coulter, Inc., Indianapolis IN) durante 30 minutos para sedimentar el IFV y se descartan los sobrenadantes. Los sedimentos de IFV se re-suspenden en 1/10 del volumen original añadido a cada tubo Eppendorf anterior y se almacenan a -80°C hasta que se realicen análisis posteriores.

Caracterización del IFV deslipidado:

El contenido de proteínas del IFV deslipidado y tratado de forma simulada se determina utilizando un ensayo BCA (PIERCE™ BCA Protein Assay Kit) según las instrucciones del fabricante. El contenido de colesterol se determina utilizando un ensayo de colesterol (AMPLEX® Red Cholesterol Assay Kit, Life Technologies, Grand Island, NY) realizado según las instrucciones del fabricante. La infectividad *in vitro* se mide utilizando los mismos procedimientos de titulación que se expusieron anteriormente.

La actividad de hemaglutinación (HA) se determina como sigue. La sangre de pollo recién aislada se lava tres veces con PBS y los glóbulos rojos (RBC) se re-suspenden en PBS a una concentración del 1%. Se preparan diluciones de virus (50 µL) en PBS y se mezclan con 50 µL de la suspensión de RBC. La mezcla se añade a pocillos individuales en una placa de 96 pocillos y se deja que los RBC sedimenten durante 45 minutos. Los pocillos se consideran negativos para HA (es decir, sin aglutinación de RBC) si está presente un punto o sedimento de RBC, y un pocillo se considera positivo si está presente una suspensión suave de RBC.

Se preparan dos lotes de muestras de IFV deslipidadas y tratadas de forma simulada según el procedimiento descrito anteriormente. La disolución madre de IFV utilizada para las pruebas tiene un título de $2,2 \times 10^{10}$ PFU/mL. En el primer lote ("preparación A"), el tiempo de deslipidación es de 30 minutos; en el segundo lote ("preparación B"), el tiempo de deslipidación es de 45 minutos. Después de la ultracentrifugación, se caracterizan las muestras deslipidadas y tratadas de forma simulada.

La infectividad *in vitro* muestra que las PFU de las muestras deslipidadas son aproximadamente ~1/7000 de las de las muestras simuladas correspondientes. Los resultados de la infectividad se muestran en la TABLA 1, a continuación. A pesar de la diferencia en los títulos, los contenidos de proteína de las diversas muestras están dentro del 10% entre sí. El contenido de proteína del IFV deslipidado de la preparación A es el 97% de la muestra simulada; y el contenido de proteína del IFV deslipidado de la preparación B es el 93% de la muestra simulada.

(véase TABLA 1). También se observa que después del tratamiento se recupera aproximadamente el 20% del material de partida, como se determina por el contenido de proteína. El porcentaje de recuperación basado en el contenido de proteína es comparable con los títulos medidos del material de partida ($2,2 \times 10^9$ PFU/mL) y las muestras tratadas de forma simulada ($4,0 \times 10^8$ PFU/mL, que es el 18% del título de partida). Después de la deslipidación, queda menos del 2% de colesterol, en comparación con el tratamiento simulado (véase TABLA 1).

Tabla 1

Tratamiento		Infectividad <i>in vitro</i> (PFU/mL)	Contenido de proteínas (mg/mL)	Contenido de colesterol (µg/mL)
Preparación A (30 minutos)	Simulado	4×10^8	1,49	16,4
	Deslipidado	6×10^4 (1/6667) ^a	1,44 (97%) ^b	0,25 (1,5%) ^b
Preparación B (45 minutos)	Simulado	2×10^8	1,39	15,9
	Deslipidado	3×10^4 (1/6667) ^a	1,29 (93%) ^b	0,1 (0,6%) ^b

Notas: ^a fracción de infectividad, en comparación con el tratamiento simulado;

^b porcentaje en comparación con el tratamiento simulado.

El tratamiento simulado indica que el tratamiento físico (agitación y centrifugación) da como resultado una pérdida de título y proteína. La deslipidación por MBCD elimina preferentemente el colesterol, pero no las proteínas del IFV. Además, el IFV tratado con MBCD tiene menos infectividad *in vitro*, pero la infectividad no se eliminó por completo.

Comparación de la delipidación de IFV con diisopropil éter y MBCD:

Además de MBCD, otro disolvente lipídico, diisopropil éter (DIPE) se utilizó para deslipidar el IFV. Las muestras de IFV del mismo material de partida se tratan con diferentes concentraciones de DIPE o con MBCD 50 mM. Aliquotas de la misma cantidad de IFV se tratan con 2%, 4%, 8%, o 12% de DIPE o MBCD 50 mM a 37°C durante 30 minutos. Después de una breve centrifugación a 2000 x g durante 3 minutos, se elimina el disolvente visible y los materiales acuosos se dejan secar en una campana extractora durante 20 minutos. Después, las muestras se centrifugan a 200000 x g durante 30 minutos para recuperar las partículas de virus. La infectividad *in vitro*, las actividades de HA, el contenido de proteínas y el contenido de colesterol del IFV se muestran en la TABLA 2.

El tratamiento con DIPE a una concentración de hasta el 12% no es tan eficaz para eliminar el colesterol como el MBCD 50 mM en las mismas condiciones. Mientras que el DIPE al 12% elimina aproximadamente el 80% del colesterol del IFV, el MBCD 50 mM elimina más del 98%. Las infectividades del IFV de estos dos tratamientos se reducen 32- y 2250- veces, respectivamente, en comparación con el tratamiento simulado, como se determina al comparar los PFU/mL. La eliminación del colesterol por ambos disolventes es relativamente específica, porque el contenido de proteínas se reduce en menos del 20% en los distintos tratamientos. Dentro de la capacidad de cuantificar la actividad de hemaglutinación (HA), el MBCD 50 mM afecta la actividad de HA en el mismo grado que el 2%-8% de DIPE.

Tabla 2

Tratamiento	PFU/mL	Unidades de HA	Proteínas (mg/mL)	Colesterol (µg/mL)
Simulado	$9,0 \times 10^8$	64	0,39	8,26
2% de DIPE	$1,2 \times 10^8$	32	0,39 (100%) ^a	6,61 (80,0%) ^a
4% de DIPE	$1,4 \times 10^8$	32	0,32 (82%) ^a	4,88 (59,1%) ^a
8% de DIPE	$9,0 \times 10^7$	32	0,36 (92%) ^a	3,47 (42,0%) ^a
12% de DIPE	$2,8 \times 10^7$	16	0,33 (85%) ^a	1,81 (21,9%) ^a
MBCD 50 mM	$4,0 \times 10^5$	32	0,33 (85%) ^a	0,14 (1,7%) ^a

Nota: ^a porcentaje en comparación con el tratamiento simulado

Tratamiento con disolventes durante 45 minutos:

Se repiten los tratamientos anteriores, excepto que la duración del tratamiento con MBCD se extiende de 30 a 45 minutos. Los resultados se muestran a continuación en la TABLA 3.

Tabla 3

Tratamiento	PFU/mL	Unidades de HA	Proteínas (mg/mL)	Colesterol (µg/mL)
Simulado ^a	1,2 x 10 ⁷	32	0,42	6,16
10% de DIPE ^a	1,0 x 10 ⁵	16	0,21 (50%) ^c	1,32 (21,4%) ^c
MBCD 50 mM ^b	1,0 x 10 ³	32	0,39 (94%) ^c	0,15 (2,5%) ^c

Nota: ^a rotación de extremo a extremo a 37°C durante 30 minutos.

^b rotación de extremo a extremo a 37°C durante 45 minutos.

^c porcentaje en comparación con el tratamiento simulado.

- 5 Al igual que con un tratamiento de 30 minutos, un tratamiento de 45 minutos con MBCD 50 mM elimina aproximadamente el 97% del colesterol para IFV y hace que el virus sea 10000 veces menos infeccioso *in vitro*, en comparación con el tratamiento simulado. Por el contrario, el DIPE al 10% (tratamiento de 30 minutos) es menos eficaz para eliminar el colesterol (aproximadamente el 80%) y da como resultado una disminución de
- 10 MBCD, mientras que se redujo hasta cierto grado por DIPE al 10%. El contenido de proteínas se reduce al 50% después del tratamiento con DIPE al 10%, en comparación con una reducción del 6% con MBCD 50 mM.

Los dos conjuntos de experimentos presentados en la presente memoria demuestran que el MBCD 50 mM elimina selectivamente el colesterol y hace que el IFV deslipidado sea menos infeccioso mientras mantiene la mayoría de las proteínas. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos pudo eliminar completamente la infectividad y, por lo tanto, inactivar completamente el virus, por lo que se requiere una mayor optimización del procedimiento para inactivar completamente el virus de la gripe. La optimización adicional podría incluir, sin limitación, aumentar el tiempo de tratamiento con MBCD y tratar el virus por un segundo período de tiempo con MBCD.

EJEMPLO 2

- 20 El tratamiento de PRRSV con MBCD elimina selectivamente el colesterol, disminuye la infectividad viral, y mantiene la mayoría del contenido de proteína viral.

Reactivos:

La cepa del virus PRRSV utilizada en este ejemplo es RESP (Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, China). La célula huésped utilizada es Marc-145 (Wuxi AppTec, Shanghai, China). Otros reactivos utilizados son los mismos que en el Ejemplo 1, anterior, excepto DMEM (Invitrogen), que se utiliza cuando se cultivan células Marc-145.

- 25 Propagación de PRRSV en células Marc-145:

Las células se siembran con PRRSV según el siguiente procedimiento. El medio se elimina de las células Marc-145 cultivadas en matraces T-75, las monocapas de células Marc-145 se enjuagan con 5 mL de PBS a temperatura ambiente y las células se separan con 1,5 mL de tripsina/EDTA a 37°C. Las células se re-suspenden en 10 mL de medio DMEM que contiene 10% de FBS y se sedimentan mediante centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se re-suspenden en medio DMEM que contiene 10% de FBS y la densidad celular se ajusta a 2,5 x 10⁵ células/mL. Se siembran quince mL de la suspensión de células Marc-145 en cada matraz T75, y los matraces se colocan a 37°C con CO₂ al 5% y se incuban durante la noche.

35 Cuando las células Marc-145 tienen una confluencia superior al 90%, se elimina el DMEM de los matraces T-75, se añaden 5 mL de medio de mantenimiento EMEM que contiene FBS al 2% y las células se infectan con PRRSV a un MOI de 0,1. Los matraces se incuban durante 60-90 minutos a 37°C con CO₂ al 5% y se agitan suavemente cada 15 minutos. Se añaden diez mL de medio de mantenimiento EMEM que contiene FBS al 2% a cada matraz, y los matraces se incuban durante 96 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Cuando se alcanza el 80% de CPE (generalmente 96 horas), se recolectan los sobrenadantes del cultivo para obtener PRRSV.

Purificación de PRRSV:

- 40 El PRRSV se purifica según el siguiente procedimiento. El sobrenadante de cultivo recogido se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos para eliminar los restos celulares, y se recoge el sobrenadante. El sobrenadante se centrifuga a 100000 x g durante 60 minutos para sedimentar el PRRSV. Los sedimentos de PRRSV se re-suspenden en un volumen apropiado de disolución salina tamponada fisiológicamente (PBS) hasta un título de aproximadamente 1 x 10⁹ PFU/mL. Se almacenan alícuotas de 100 µL de PRRSV concentrado a -80°C.

- 45 El PRRSV se titula para la infectividad *in vitro* utilizando el siguiente procedimiento. Utilizando los procedimientos de transferencia y el cultivo celular anteriores, las células Marc-145 se suspenden en DMEM que contiene FBS al 10%

a una densidad final de $1,5 \times 10^5$ células/mL. Dos mililitros de la suspensión de células Marc-145 se añaden a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y las placas se incuban durante la noche a 37°C con CO₂ al 5%. Las muestras de virus se descongelan en un baño de agua a 37°C, seguido por centrifugación a 500 x g durante 10 minutos a 4°C. Se prepara una serie de dilución 1/10 de los virus y se almacena a 4°C hasta su uso, utilizando EMEM, como el tampón de dilución.

Cuando las células Marc-145 tienen al menos un 90% de confluencia, se elimina el medio, y se añaden 0,5 mL de tampón de dilución y 0,5 mL de la dilución del virus en cada pocillo. Para el control negativo, se utiliza 1,0 mL de tampón de dilución. Las placas se agitan suavemente inmediatamente después de añadir cada dilución. Las placas se incuban durante 60-90 minutos a 37°C en CO₂ al 5% y se balancean cada 15 minutos. Cada pocillo de cada placa de 6 pocillos se recubre después con 3 mL de una mezcla 1:4 de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 2,5% en PBS y tampón de dilución a 37°C. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir que la mezcla de recubrimiento solidifique, y después las placas se incuban a 37°C con CO₂ al 5% durante 96 horas.

Las placas se visualizan utilizando el siguiente procedimiento. Una vez que las placas se desarrollen completamente (96 horas después de la infección), se añade 1 mL de paraformaldehído al 4%, y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. La agarosa solubilizada se desecha, y se añaden 0,5 mL de violeta cristal al 0,5% a cada pocillo. El número de placas se cuenta después de 15 minutos de incubación con el violeta cristal y se convierte en un título basado en los factores de dilución.

Propagación *in vitro* de PRRSV:

Se prefiere un título de PRRSV superior a 1×10^7 PFU/mL para el ensayo de proteínas y colesterol. La propagación de la cepa RESP de PRRSV en las células Marc-145 produce una muestra de virus concentrada que tiene un título $> 1 \times 10^8$ PFU/mL.

Deslipidación de PRRSV:

Los tratamientos con disolventes y simulados se realizan según el siguiente procedimiento. Se diluyen alícuotas de cien µL de la solución madre de PRRSV concentrada a aproximadamente 1×10^9 PFU/mL en 900 µL de PBS en tubos Eppendorf para alcanzar un título final de $1,0-5,0 \times 10^8$ PFU/mL. Se añade MBCD en PBS a la concentración deseada para el tratamiento con disolvente, o se añade un volumen igual de PBS para el tratamiento simulado. Los tubos Eppendorf se tapan después y se sellan con parafilm. Todas las muestras se aseguran en un agitador orbital de baño de aire de temperatura constante SHZ-82 (Changzhou Guohua Appliance Co., China) precalentado a 37°C. Las muestras tratadas con disolvente y simuladas se centrifugan a una velocidad de rotación orbital de 220 rpm a 37°C durante el tiempo deseado. Las muestras respectivas se centrifugan en una microcentrífuga durante 1 minuto y los sobrenadantes que contienen IFV se transfieren a tubos de ultracentrífuga. Los tubos se centrifugan a 100000 x g (centrífuga OPTIMA™ L-100XP; Beckman Coulter, Inc., Indianapolis IN) durante 30 minutos para sedimentar el PRRSV y se desechan los sobrenadantes. Los sedimentos de PRRSV se re-suspenden en 200 µL de PBS y se almacenan a -80°C hasta su posterior análisis.

Caracterización del PRRSV deslipidado:

El contenido de proteínas del PRRSV deslipidado y tratado de manera simulada se determina utilizando el ensayo BCA (PIERCE™ BCA Protein Assay Kit) según las instrucciones del fabricante. El contenido de colesterol se determina también utilizando un ensayo de colesterol (Amplex® Red Cholesterol Assay Kit, Life Technologies, Grand Island, NY) realizado según las instrucciones del fabricante. La infectividad *in vitro* se mide utilizando los mismos procedimientos que se indicaron anteriormente.

Dependencia de la concentración de MBCD:

En el primer experimento de deslipidación, el PRRSV se deslipida con MBCD 5, 10, 20, 30 y 50 mM durante 60 minutos a 37°C. Después de la ultracentrifugación, las muestras deslipidadas y tratadas de forma simulada se analizan para la infectividad *in vitro* en las células Marc-145, y se determinan los contenidos de proteínas y colesterol, utilizando los procedimientos indicados anteriormente. La infectividad, el contenido de proteínas, y el contenido de colesterol del PRRSV deslipidado se muestra en la TABLA 4.

Tabla 4

Tratamiento	Infectividad <i>in vitro</i> (PFU/mL)	Contenido de proteínas (mg/mL)	Contenido de colesterol (µg/mL)
Simulado	$1,6 \times 10^7$	4,46	11,64
MBCD 5 mM	$1,4 \times 10^7$	3,94 (88%) ^a	9,82 (84%) ^a

MBCD 10 mM	$7,0 \times 10^6$	4,00 (89%) ^a	4,66 (40%) ^a
MBCD 20 mM	$2,8 \times 10^6$	4,05 (90%) ^a	4,46 (38%) ^a
MBCD 30 mM	$1,2 \times 10^5$	4,36 (97%) ^a	4,00 (34%) ^a
MBCD 50 mM	$4,2 \times 10^4$	4,40 (98%) ^a	3,29 (28%) ^a

Nota: ^a porcentaje en comparación con el tratamiento simulado

El título de la disolución madre de RESP de PRRSV de partida es $1,0 \times 10^8$ PFU/mL, de los cuales 0,1 mL se mezclan con 0,9 mL de PBS, junto con la cantidad apropiada de MBCD. Después de la agitación orbital a 220 rpm durante 60 minutos a 37°C, las muestras de virus se sedimentan por ultracentrifugación y se suspenden en un volumen final de 0,2 mL de PBS. El título de la muestra tratada de forma simulada es $1,6 \times 10^7$ PFU/mL (TABLA 4), lo que sugiere que más del 30% de la actividad viral se recupera después del tratamiento de forma simulada. El tratamiento con MBCD reduce la infectividad y el contenido de colesterol de una manera en gran medida dependiente de la concentración, mientras que el 88-98% del contenido de proteína total se recupera en todas las concentraciones de MBCD (véase TABLA 4). Después del tratamiento con MBCD 50 mM, el PRRSV deslipidado retiene aproximadamente el 28% de la cantidad inicial de colesterol en comparación con la muestra simulada, y la infectividad del PRRSV se reduce aproximadamente 380 veces, pero de nuevo no se elimina por completo.

Ensayo del paso ciego de una muestra de PRRSV deslipidado:

El título de una de las muestras de PRRSV deslipidado (MBCD 100 mM durante 90 minutos) está por debajo del límite de detección. Esto plantea la cuestión de si hay partículas de virus infecciosos en la muestra. Para abordar la cuestión de si tales partículas de virus infecciosas están presentes, se deslipida una nueva muestra con MBCD 100 mM durante 90 minutos y se somete al ensayo del paso ciego descrito a continuación. Mientras que una muestra de control de RESP de PRRSV tiene un título de $1,6 \times 10^6$ PFU/mL, no se detectan placas mediante el ensayo del paso ciego de la muestra de PRRSV deslipidada con MBCD 100 mM durante 90 minutos. La deslipidación con MBCD 100 mM durante 90 minutos probablemente inactiva el RESP de PRRSV por completo.

El ensayo del paso ciego se realiza según el siguiente procedimiento. Se transfieren cien μ L de la muestra de PRRSV deslipidado a cada pocillo de una placa de 6 pocillos que contiene las células Marc-145, preparada mediante el procedimiento anterior. Las placas se incuban durante 4 días a 37°C en CO₂ al 5%. Se realizan tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación para lisar las células, y los sobrenadantes que contienen el PRRSV se recolectan y centrifugan a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se transfieren cuatrocientos μ L del sobrenadante a un matraz de células Marc-145. Los matraces se incuban durante 4 días a 37°C y CO₂ al 5%. Se repiten los ciclos de congelación-descongelación, y los sobrenadantes se recogen de nuevo, se centrifugan y se transfieren a un matraz de células Marc-145 como antes. Los ciclos de congelación-descongelación se repiten una vez más, los sobrenadantes se recogen de nuevo y se centrifugan, y los sobrenadantes que contienen PRRSV se congelan a -80°C hasta su uso posterior. El título de PRRSV de las muestras finales recolectadas se determina utilizando células Marc-145 como anteriormente.

EJEMPLO 3

El objetivo de este estudio fue determinar la dependencia del tiempo para la inactivación de la cepa ND 99-14 de PRRSV mediante un método de deslipidación que utiliza metil- β -ciclodextrina (MBCD). La MBCD se adquirió en forma de polvo de CTD, Inc. (Alachua, FL). Una solución madre 300 mM se preparó añadiendo 1000 mL de agua a 280 g de MBCD para generar la solución madre.

Deslipidación del virus:

Los experimentos de cinéticas de inactivación se realizaron utilizando la cepa ND99-14 de PRRSV, descrita en la solicitud de Patente co-pendiente US Ser. No. 62/296,658, presentada el 18 de febrero de 2016. En general el método implica la adición de MBCD a una concentración final de 40 mM y un total de 72 horas de tiempo de incubación a temperatura ambiente con mezcla constante. La adición de MBCD se produce en dos etapas, 20 mM para empezar el proceso de inactivación, se añaden 20 mM adicionales de MBCD 24 horas después y se incuban 48 horas más a temperatura ambiente con mezcla constante. La temperatura ambiente está entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 25°C, y óptimamente entre aproximadamente 22°C y aproximadamente 24°C.

Una solución madre 300 mM de la solución de MBCD se añadió inicialmente al virus a una concentración final de 20 mM añadiendo 567 mL de disolución de MBCD a 8,5 L de la solución madre del virus. El virus se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente con mezcla a 50 rpm. 30 mL del virus se recogieron a 0 horas, 15 minutos, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas después de la adición de MBCD. Las alícuotas para cada punto de tiempo se almacenaron a 4°C y -70°C hasta su uso posterior.

Después de 24 horas de recoger la muestra, el virus se transfirió a un nuevo recipiente. Se añadieron 20 mM adicionales de MBCD (se añadieron 650 mL de MBCD a 9,75 L de la solución madre del virus) para llegar a una

concentración final de 40 mM. El virus se incubó durante 48 horas adicionales a temperatura ambiente. 30 mL del virus se recogieron a las 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 y 96 horas después de la primera adición de MBCD. Las alícuotas para cada punto de tiempo se almacenaron a 4°C y -70°C hasta su uso posterior.

Medición del virus:

- 5 Se añadieron diluciones en serie de diez veces (10^{-1} - 10^{-9}) de virus inactivado y virus inactivado simulado a células MARC 145 cultivadas en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 96 horas para permitir que el virus vivo infectara las células. La replicación del virus se determinó mediante la observación del efecto citopático (CPE) debido a la infección por virus de las células MARC 145. Cada pocillo que contenía una dilución de virus se valoró como positivo o negativo con respecto al CPE y los números resultantes de pocillos positivos o negativos para cada dilución se utilizaron para determinar el TCID₅₀/mL utilizando el cálculo Reed-Muench TCID₅₀. El virus inactivado simulado se trató con los mismos medios y condiciones de temperatura que el virus inactivado sin la adición del agente inactivante.

- 15 Se realizaron tres pasos ciegos consecutivos de virus inactivados e inactivados simulados, así como un control de solo el medio utilizando células MARC 145 cultivadas en matraces T-225. Las muestras inactivadas y de control se añadieron a un cultivo de 2 días de células MARC 145 y se incubaron durante 7 días a 37°C y CO₂ al 5% (3 mL de muestra en 27 mL de medio). Los matraces se inspeccionaron visualmente para detectar la presencia de CPE. Cada matraz se puntuó como positivo (+) o negativo (-) con respecto al CPE y se registró. Los sobrenadantes de los matraces se recogieron y se añadieron a un nuevo conjunto de matraces T-225 que contenían cultivos de 2 días de células MARC 145 y se incubaron durante 7 días a 37°C y CO₂ al 5%. El proceso anterior se repitió dos veces para obtener observaciones de CPE durante 3 pasos de virus consecutivos.

- 25 Los títulos de virus de PRRS se determinaron para todos los puntos de tiempo recogidos durante el período de incubación de 96 horas utilizando muestras almacenadas a dos temperaturas diferentes como se muestra. 0 indica que el título fue indetectable o indeterminado mediante el ensayo de determinación PRRS Live VirusTCID₅₀. Los resultados presentados en la Tabla 5 demostraron que 40 mM añadidos en un proceso de dos etapas fueron capaces de inactivar el virus de PRRS con un título de al menos 8 log₁₀ TCID₅₀/mL. Los títulos más altos demostraron una inactivación incompleta con MBCD 20 mM, pero el virus fue indetectable después de la segunda adición de MBCD para llevar la concentración a 40 mM. Los resultados también mostraron que el tiempo fue un factor que contribuyó menos a la inactivación. Los tiempos de incubación más prolongados a una concentración determinada de MBCD no aumentaron el nivel de inactivación. Una concentración 20 mM de MBCD redujo el virus vivo en aproximadamente 2,5 logs después de 15 minutos de incubación y el nivel de virus vivo detectado permaneció constante durante 24 horas. Una segunda adición de MBCD 20 mM a las 24 horas de la incubación inactivó el virus a niveles indetectables en la siguiente muestra recolectada de punto de tiempo (30 horas). También se observaron diferencias en la viabilidad en presencia de MBCD 40 mM a diferentes temperaturas de almacenamiento. Las muestras de los puntos de tiempo con virus vivo detectable tenían al menos 100 veces menos virus cuando se almacenaban a -70°C versus a 4°C.

Tabla 5

Hora	Puntuación de las muestras a 4°C	Puntuación de las muestras a -70°C
0,25	5,8 ^a	3,3
4	5,8	nd
8	5,9	2,8
12	5,6	3,2
16	5,6	3,2
20	5,6	3,4
24	5,6	3,6
30	0	0
36	0	0
42	0	0
48	0	0
56	0	0

64	0	0
72	0	0
84	0	0
96	0	0

^a Log₁₀ TCID₅₀/mL

EjemPlo 4

El objetivo de este estudio fue evaluar la seguridad y eficacia de las vacunas experimentales de PRRSV inactivado en un estudio de exposición de vacunación. Se evaluó la capacidad de las vacunas para reducir las lesiones pulmonares y los niveles de viremia. Las características de las vacunas de interés incluyeron la temperatura de almacenamiento, el número de dosis (1 versus 2) y la adición del adyuvante. El estudio se realizó en las instalaciones de BSL-2 de Veterinary Resources, Inc., Cambridge, Iowa. Los ensayos de laboratorio se realizaron en Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory, Ames, Iowa and South Dakota State University Veterinary Diagnostic Laboratory, Brookings, South Dakota. Se inscribieron en el estudio sesenta (60) cerdos destetados clínicamente sanos de aproximadamente 3 semanas de edad que eran seronegativos al PRRSV. Los cerdos se clasificaron por la disminución del peso corporal y se formaron 10 bloques de 6 animales cada uno. Los cerdos se asignaron al azar a uno de los seis grupos de tratamiento (10 cerdos por grupo). Los grupos de tratamiento incluyeron un grupo de control no vacunado (T01) y cinco grupos vacunados con vacunas experimentales de PRRSV inactivado. Las vacunas se inactivaron por medio de deslipidación utilizando metil-β-ciclodextrina (MBCD). Las vacunas de los grupos T02 y T03 no contenían adyuvante y se almacenaron a 2-8°C (T02) o -20°C (T03). Las vacunas de los grupos T04 y T05 contenían el adyuvante MONTANIDE™ Gel 01 (Seppic) y se administraron una vez (T04) o dos veces (T05). La vacuna del grupo T06 contenía el adyuvante MONTANIDE™ IMS 1313 VG N PR (Seppic) y se administró dos veces.

Los cerdos se alimentaron ad libitum con dietas de inicio medicadas (CTC/DENAGARD®) (NRC, 2012) a través de comederos de carga superior. Los cerdos tuvieron acceso a agua potable limpia ad libitum a través de bebederos de tetina. Todos los cerdos del estudio fueron tratados con EXCEDE® 10 días después de la vacunación (DPV). Además, todos los cerdos fueron tratados con una sola dosis de VITAL E®-500 y otro tratamiento de EXCEDE® 21 DPV. Todos los medicamentos se administraron según las instrucciones de la etiqueta.

Vacunas

La cepa SD 11-21 de PRRSV (nivel de paso 84) se utilizó como antígeno en el estudio actual. SD 11-21 es una cepa de campo que se adaptó para el crecimiento en cultivo celular a través de 84 pasos a través de la línea de células MARC-145, así como tres rondas de purificación de placa y centrifugación en gradiente de sacarosa, como se describe en la solicitud de patente co-pendiente US Ser. No. 62/296,658, presentada el 18 de febrero de 2016. El paso 85 (p85) se produjo en un biorreactor de un solo uso BioBLU de 5 L (Eppendorf, Hamburgo, Germany) sembrado con MARC-145 unido a micro-vehículos HILLEX II (Pall Corporation, Port Washington, NY) en medios OPTI-MEM (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementados con suero bovino fetal al 2% (Sigma, St. Louis, MO) y 50 µg/mL de gentamicina (Life Technologies, Grand Island, NY). El título de la solución madre del virus p85 recolectado fue 7,3 log₁₀ TCID₅₀ como se determinó mediante el ensayo de titulación del virus descrito en el Ejemplo 3.

En una botella de 1L, se añadieron 19,7 mL de la solución madre de MBCD 300 mM (Sigma, St. Louis, MO) a 300 mL de la solución madre del virus SD 11-21. La mezcla se incubó a temperatura ambiente con mezcla constante a 50 rpm durante 24 horas. Después de 24 horas de incubación se añadieron 9,8 mL adicionales de la solución madre de MBCD y la mezcla se incubó a temperatura ambiente con mezcla constante a 50 rpm durante 24 horas adicionales. La concentración final de MBCD fue 30 mM con un total de 48 horas de incubación a temperatura ambiente. Se preparó también una solución madre de virus inactivado simulado añadiendo una cantidad equivalente de agua en lugar de MBCD, los tiempos de incubación y mezcla fueron idénticos a los del virus inactivado. El virus inactivado simulado se utilizó como control para los ensayos de medición del virus. Después del tratamiento, el virus inactivado simulado estaba presente a 6,5 log₁₀TCID₅₀/mL, mientras que no se detectó virus vivo en la solución de virus inactivado con MBCD. Las disoluciones madres del virus se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

Las vacunas se formularon para incluir un estabilizador y un conservante. Se utilizó un medio de suero reducido OPTI-MEM® I como diluyente de la mezcla. Los adyuvantes incluyeron formulaciones comerciales de MONTANIDE™ Gel 01 (Seppic) y MONTANIDE™ 1313 VG N PR (Seppic). El producto de control fue una preparación comercial (Corning Cellgro, Mediatech Inc. de solución salina tamponada con fosfato (PBS)). Las vacunas sin adyuvante contenían virus deslipidado, Estabilizador B al 25%, 25 µg/mL de gentamicina como un conservante, y diluyente de mezcla. Las vacunas con adyuvante contenían un 20% del adyuvante indicado. El Estabilizante B contenía 2,5% de D-manitol (Sigma), 1,2% de gelatina de tipo A (Fisher, Pittsburgh, PA), 1% de

hidrosilato de caseína amina NZ (Sigma), un 5% de sacarosa (Sigma) y 6,2% de trehalosa (Fisher) en agua ultrapura (Life Technologies) a pH 7,0-7,2.

Vacunación y exposición

5 Cada uno de los 60 cerdos inscritos en el estudio se vacunó el día 35 antes de la exposición. A los cerdos en T01-T05 se les inyectó su tratamiento asignado como una dosis intramuscular de 1,0 mL en el lado derecho del cuello. A los cerdos en T06 se les inyectó 1,5 mL. Los cerdos en T01-T03 y T05 y T06 se vacunaron otra vez 14 días después (-21 días antes de la exposición) de la misma manera. En 0 DPC, el material de la exposición se preparó por descongelación de las alícuotas congeladas de la cepa NADC-20 inmediatamente antes de la exposición. El título se determinó que era $1,26 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml después de la dilución en Minimum Essential Medium Eagle con sales de Earle y L-glutamina (MEM) de Mediatech, Inc. Cada cerdo fue restringido físicamente para la exposición con la cabeza orientada hacia arriba. Se utilizó una jeringa sin cierre luer de 3 ml para administrar una dosis de 2 ml por vía intranasal, con aproximadamente 1 ml por fosa nasal.

Resultados

15 A las 14 DPC, los animales se sacrificaron de forma humanitaria según los procedimientos del sitio. Los pulmones se extirparon y puntuaron por el investigador del estudio que no conocía el tratamiento. Cada uno de los siete lóbulos pulmonares se examinó tanto visualmente como por palpación en busca de lesiones características macroscópicas atribuidas al PRRSV. La cantidad de lesión/consolidación en cada lóbulo pulmonar se puntuó como un valor real entre 0 y 100% del lóbulo. La puntuación de cada lóbulo se introdujo en una fórmula ponderada para calcular el porcentaje de pulmón con lesiones. El porcentaje de pulmón total con lesiones se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: Porcentaje de pulmón total con lesiones = $\{(0,10 \times \text{apical izquierdo}) + (0,10 \times \text{cardiaco izquierdo}) + (0,25 \times \text{diafragmático izquierdo}) + (0,10 \times \text{apical derecho}) + (0,10 \times \text{cardiaco derecho}) + (0,25 \times \text{diafragmático derecho}) + (0,10 \times \text{intermedio})\}$.

25 Además, los porcentajes del pulmón total con lesiones se transformaron utilizando la raíz cuadrada del arcoseno, antes de un análisis adicional. Los datos transformados se analizaron mediante un modelo lineal mixto que incluía el efecto fijo del tratamiento (el procedimiento MIXED en SAS) y el efecto aleatorio del bloque.

30 Los resultados del análisis estadístico de las puntuaciones de las lesiones pulmonares se resumen en la Tabla 6. El efecto principal del tratamiento fue estadísticamente significativo ($P = 0,0003$). Las comparaciones con el grupo de control (T01) indicaron un porcentaje de participación pulmonar significativamente menor ($P < 0,05$) en los grupos con adyuvante de Gel 01 (T04 y T05). Además, la vacuna sin adyuvante administrada dos veces y almacenada a 2-8°C (T02) dio como resultado puntuaciones de lesión significativamente más bajas ($P < 0,05$) que un grupo similar tratado con una vacuna almacenada a -20°C (T03).

Tabla 6

Puntuaciones medias de las lesiones pulmonares – Participación pulmonar porcentual transformada por arcoseno (Efecto principal del tratamiento: $P = 0,0003$)

Grupo de tratamiento	Estimado ¹	Error estándar	Media ²
T01 (Placebo)	0,4760	0,1085	20,99
T02 (no adyuvante, 2 dosis)	0,2761	0,1105	7,43
T03 (PRRS inactivado almacenado a -70°C)	0,6338	0,1085	35,07
T04 (adyuvante Gel 01, dosis única)	0,1678	0,1085	2,79*
T05 (adyuvante Gel 01, 2 dosis)	0,2128	0,1141	4,46*
T06 (adyuvante 1313, 2 dosis)	0,3418	0,1085	11,24
T02 v T03	Valor de P =		0,0013
T04 v T05	Valor de P =		0,6692
T02 v T05	Valor de P =		0,5594

35 *T01 versus T04 y T05 significativamente diferentes a $P < 0,05$

¹ Medias no transformadas

² Medias retro-transformadas

Se recogieron muestras de sangre para la determinación de los niveles de viremia los días 35 y 21 antes de la exposición. Además, se recolectaron muestras de sangre para la determinación de los niveles de viremia a las 0, 3, 7, 10 y 14 DPC. Las muestras se analizaron para detectar la presencia de ácidos nucleicos virales del PRRS utilizando técnicas de qRT-PCR.

Los datos de serología y viremia se transformaron a unidades de log₁₀ antes de los análisis, dando una distribución no normal. Los valores transformados se analizaron utilizando un modelo mixto de medidas repetidas (el procedimiento MIXED). El modelo estadístico incluyó el tratamiento, el tiempo y la interacción del tratamiento por tiempo como efectos fijos. El bloqueo se incluyó en el modelo como un efecto aleatorio. Si la interacción del tratamiento por el tiempo fue significativa ($P < 0,05$), se evaluaron los efectos del tratamiento dentro del tiempo. Si la interacción no fue significativa, se evaluó el efecto principal del tratamiento. Se presentan las medias de mínimos cuadrados (retro-transformada) y los errores estándar.

El análisis de los valores de viremia se resume en la Tabla 7. No se observó viremia en ningún cerdo antes de la exposición al PRRSV confirmando que el virus de la vacuna estaba inactivado. Se excluyeron del análisis estadístico los momentos previos a la exposición. Después de la exposición, la interacción del tratamiento por día no fue significativa ($P = 0,0974$), por lo que se evaluó el efecto principal del tratamiento. El efecto del tratamiento fue significativo ($P = 0,0107$). Las comparaciones con el grupo de control (T01) indicaron niveles significativamente más bajos ($P < 0,05$) en todos los grupos de vacunas que recibieron adyuvante (T04, T05 y T06). Ninguno de los contrastes planificados previamente fue estadísticamente significativo.

Tabla 7. Viremia – Media geométrica de las copias genómicas de PRRSV/mL en 3, 7, 10 y 14 DPC (transformado a log₁₀) (efecto principal de tratamiento: $P = 0,011$; interacción del tratamiento por día: $P = 0,097$)

Tratamiento	Estimado ¹	Error estándar	Media geométrica ²
T01 (Placebo)	6,2508	0,1149	1781506
T02 (no adyuvante, 2 dosis)	5,9855	0,1211	967187
T03 (PRRS inactivado almacenado a -70°C)	6,2907	0,1149	1953141
T04 (adyuvante Gel 01, dosis única)	5,8753	0,1149	750379*
T05 (adyuvante Gel 01, 2 dosis)	5,7720	0,1211	591543*
T06 (adyuvante 1313, 2 dosis)	5,8878	0,1149	772251*
T02 v T03	Valor de P =		0,0733
T04 v T05	Valor de P =		0,5389
T02 v T05	Valor de P =		0,2182

*T01 versus T04, T05 y T06 significativamente diferentes a $P < 0,05$

¹ Medias no transformados de log 10

² Medias retro-transformadas

Conclusiones

La vacunación de cerdos con una o dos dosis de la vacuna con adyuvante Gel 01 inactivada con MBCD fue eficaz para reducir significativamente las lesiones pulmonares y los niveles de viremia en comparación con el grupo de control. Las lesiones pulmonares se redujeron numéricamente en cerdos vacunados con otras vacunas inactivadas con MBCD (T02 y T06) almacenadas a 2-8°C. Debido a la variación en las puntuaciones de las lesiones pulmonares, estas diferencias no fueron significativas al nivel $P < 0,05$. Todas las vacunas de MBCD que contenían un adyuvante (MONTANIDE™ Gel 01 o 1313) redujeron significativamente la viremia. En estudios futuros, puede ser necesario un tamaño de muestra más grande cuando se utilice la cepa NADC-20 como material de exposición para detectar diferencias biológicas significativas tanto en las lesiones pulmonares como en la viremia.

La temperatura de almacenamiento parece tener un impacto en la eficacia de la vacuna. El almacenamiento de la vacuna a -20°C tuvo un efecto negativo sobre la eficacia de la vacuna en comparación con la vacuna almacenada a 2-8°C.

La adición de una vacuna adicional 14 días después de la primera no mejoró aún más la eficacia de la vacuna en los cerdos vacunados con la vacuna inactivada con MCBBD con el adyuvante Gel 01.

La inclusión del adyuvante Gel 01 a la vacuna inactivada con MCBBD no afectó la eficacia de la vacuna.

- 5 Las vacunas inactivadas con MCBBD fueron seguras para los cerdos en crecimiento como lo demuestra la ausencia de reacciones sistémicas posteriores a la vacunación, lesiones en el lugar de la inyección y solo una respuesta febril transitoria (1 o 2 días) en los grupos con el adyuvante Seppic MONTANIDE™ Gel 01 después de la segunda vacunación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un virus envuelto inactivado que comprende:
mezclar una disolución que comprende un virus envuelto con una primera disolución de metil-β-ciclodextrina (MBCD) para obtener una primera mezcla;
- 5 incubar la primera mezcla durante un primer periodo de tiempo;
mezclar el virus envuelto de la primera mezcla con una segunda disolución de MBCD para obtener una segunda mezcla; e
incubar dicha segunda mezcla durante un segundo periodo de tiempo.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 en donde una concentración de MBCD en la primera mezcla es de al menos 5 mM a 100 mM.
3. El método de la reivindicación 1 en donde una concentración de MBCD en la primera mezcla es de al menos 20 mM a 40 mM.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde una concentración de MBCD en la segunda mezcla es de 10 mM a 100 mM.
- 15 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde una concentración de MBCD en la segunda mezcla es de 30 mM a 50 mM.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde el primer periodo de tiempo es de 15 minutos a 24 horas.
- 20 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde el primer periodo de tiempo es de 4 horas a 24 horas.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en donde el segundo periodo de tiempo es de 4 horas a 48 horas.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en donde el segundo periodo de tiempo es 24 horas, 36 horas, o 48 horas.
- 25 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde una temperatura de al menos uno del primer periodo de tiempo y el segundo periodo de tiempo es de 20°C a 25°C.
11. El método de la reivindicación 10 en donde la temperatura es de 22°C a 24°C.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el virus envuelto se aísla de la primera mezcla antes de la etapa de obtención de la segunda mezcla.
- 30 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el virus envuelto es un virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS).
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde al menos uno del primer periodo de tiempo y el segundo periodo de tiempo comprende además la agitación de la primera mezcla y/o la segunda mezcla.

35