

Q.F.



BT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-127737

54. TÍTULO

**INACTIVACION DE UN PATOGENO EN UNA MUESTRA MEDIANTE
UN TRATAMIENTO CON FORMALINA Y LUZ UV**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BAXTER INTERNATIONAL INC., y BAXTER HEALTHCARE S.A.

DOMICILIO

DEERFIELD, ILLINOIS 60015, U.S.A. y 8304, SUECIA respectivamente

74. APODERADO

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

SS-

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 08-12/737- -00000-0000

Fec: 2005-12-20 17:21:00 Dep. 2005 NUECH/ALX/0057

TÍT. 11 PATENTE DE

Evo: 3/0 FASE NACIONAL

Act 411 PRESENTACION

Folios: 100

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:****1**☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.**2****SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **BAXTER INTERNATIONAL INC.**
y **BAXTER HEALTHCARE S.A.**
sociedades constituidas y existentes bajo
las leyes del estado de Delaware, Estados
Unidos de América y Suiza.

Dirección: One Baxter Parkway
Deerfield
Illinois 60015
Estados Unidos de América

y

Hertistrasse 2
8304 Wallisellen
Suiza

Domicilio: Deerfield
Illinois 60015
Estados Unidos de América

y

8304 Wallisellen
Suecia

respectivamente.

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 38 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 438.019 T.P 31.929**4****INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Manfred REITER** ✓
Gebrueder-Lang-Grasse 11/17
1150 Vienna
Austria

3. **Noel BARRETT** ✓
Steinwandgasse 6A
3400 Klosterneuburg/Weidling
Austria

2. **Wolfgang MUNDT** ✓
Florianigasse 57/1/2/6
1080 Vienna
Austria

4. **Otfried KISTNER** ✓
Weyringergasse 27/16
1040 Vienna
Austria

5**PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/005691Fecha: 26 de mayo de 2005Publicación Internacional No. WO 2005/118000 A1Fecha: 15 de diciembre de 2005**6****Título (54)**

**INACTIVACIÓN DE UN PATÓGENO EN UNA MUESTRA MEDIANTE UN
TRATAMIENTO CON FORMALINA Y LUZ UV**

2

7

Clasificación Internacional (51) A61L 2/00

8

PrioridadSI ☒ NO ☐**(33) País de Origen**US**(32) Fecha**27 de mayo de 2004**(31) Número de Solicitud**60/575.310

9

Comprobante de pago No.: 06-94.103**Fecha: 11 de diciembre de 2006**

10

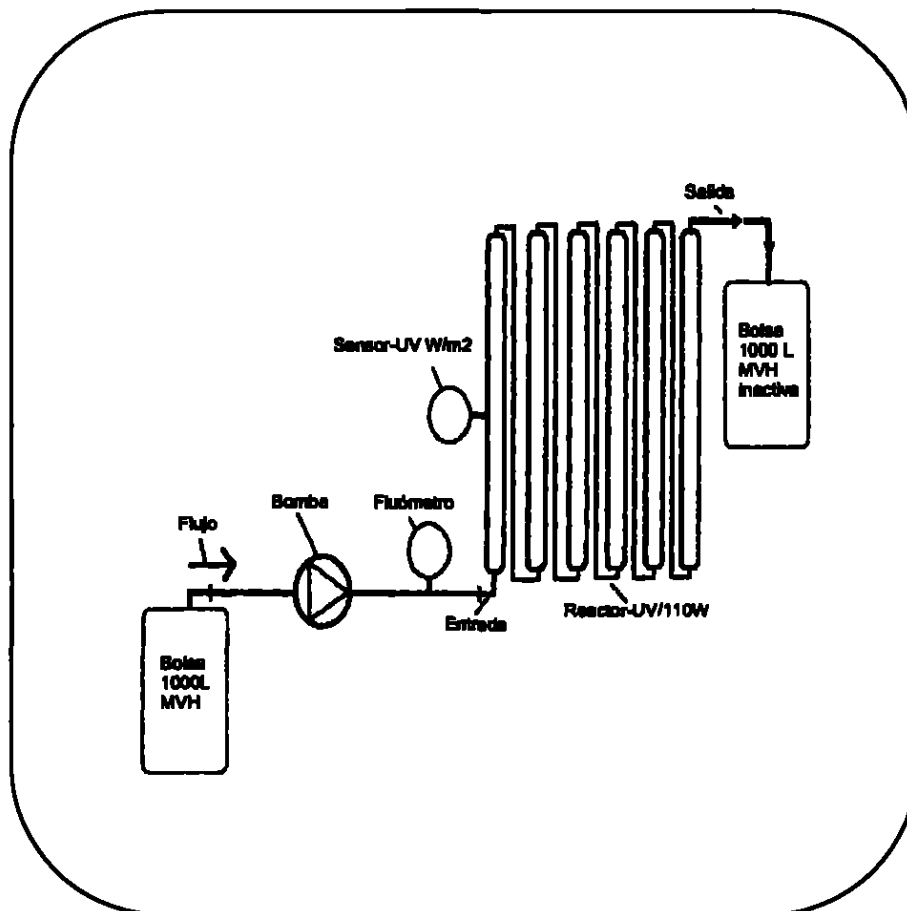
Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder de la sociedad **BAXTER INTERNATIONAL INC.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

3

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA : *Emilio Ferrero*
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/118000 A1
2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**

05213
08613

PODER

POWER OF ATTORNEY

5

Yo (nosotros), abajo firmado(s)
BAXTER INTERNATIONAL INC.

domiciliado(s) en
Deerfield, Illinois, E.E.U.U.

por el presente conferimos poder a
GERMAN CAVELIER tpa. 832
GONZALO PERDOMO tpa. 831
EMILIO FERRERO tpa. 31929
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa. 23555
Domiciliados en la Carrera 4a. No. 72-35,
Bogotá, Colombia

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas y de servicio; el depósito de nombres comerciales y enseñas; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) las acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y juicios que promovamos o se nos promuevan; y c) para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, desistir, cancelar, recibir, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy junio 16 de 1993
en Deerfield, Illinois 60015 E.E.U.U.

I (we), the undersigned BAXTER INTERNATIONAL INC.

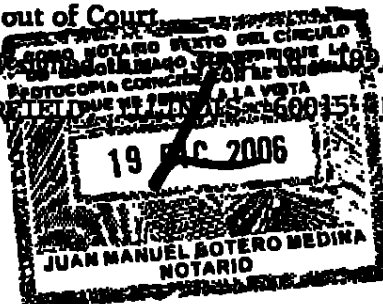
of Deerfield, United States of America, ...

hereby grant to Messrs. Cavelier,
GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO,
EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE
PAEZ.

Professional Cards Numbers: 832, 831, 31929,
and 23555 respectively. Domiciled at
Carrera 4a. No. 72-35, Bogotá, Colombia

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, collective and service marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us); and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys-in-fact in or out of Court.

Given and signed at
in Deerfield, Illinois 60015 E.E.U.U.



BAXTER INTERNATIONAL INC.,

A. Gerard Sieck
A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY *Mc*

Bernarda R. de Martinez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 603 Minjusticia 1991



Consulado General de Colombia

122 SOUTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 1441
CHICAGO, ILLINOIS 60603

TEL (312) 341-0658 FAX (312) 341-1980

No. 1610, 93

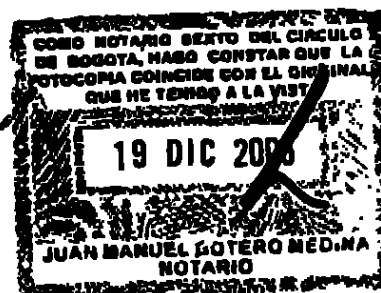
Chicago, JUN 28 1993

El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA que el señor Jiinda Tamuzi Hass quien autoriza el presente documento, ejercía legalmente, en la fecha allí expresada, las funciones de Secretaria del Condado y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este consulado.

El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
US\$ 6.00 (Seis dólares)
US\$ 15.00 (Quince dólares) APES
PAGADO DEFECTIVO
FONDO ROTATORIO

Maria Teresa Gonzalez
MARIA TERESA GONZALEZ
Encargada de Funciones Consulares



Ramona R. de Martinez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 653 Minjusticia 1991

No. 481652

Marta Elena Gonzalez

05 AFR 1999

[Signature]

NOTARIO

COMO NOTARIO SIENTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCIERDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

19 DIC 2008

JUAN MANUEL BOTEZOMEYNA
NOTARIO



LINDA LANUZI HESS
LAKE COUNTY CLERK
18 NORTH COUNTY STREET
WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Bernardo R. de Martins
Traductores e Interpretes Oficiais
Resolucao do Ministerio 1991

General Services 708/360-3610 • Elections 708/360-6628 • Tax Extension & Redemption 708/360-6657

STATE OF ILLINOIS)) SS
COUNTY OF L A K E)

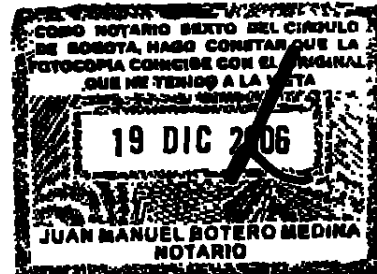
CERTIFICATE OF AUTHORITY

I, Linda Ianuzzi Hess, County Clerk of Lake County in the State of Illinois, which office is an office of record having a seal, certify that Mary H. Cross by whom the foregoing or annexed document was notarized, was, on the 26 day of June, 1990, appointed a Notary Public in and for the County of Lake, State of Illinois and that as such, full faith and credit is and ought to be given to this Notary's official attestations. In testimony whereof I have affixed my signature and the seal of this office this 17 day of June, 1993.

**Certification not valid unless the seal
of Lake County, Illinois is affixed.**

LINDA IANUZI HESS
LAKE COUNTY CLERK

113 204 12/84



CERTIFICADO NOTARIAL (CORPORACION)

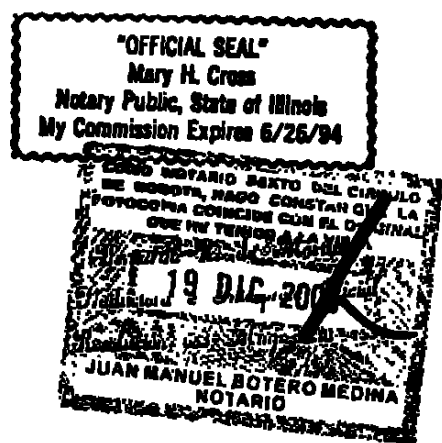
Estados Unidos de America
Condado de Lake
Estado de Illinois ss:
Hoy 16 de Junio de 1993
compareció A. Gerard Sleck a quien
conozco, quien, debidamente juramentado, declara
que el es SubSecretario
de BAXTER INTERNATIONAL INC.
la compañía, nombrada en el documento que ante-
cede, una corporación organizada conforme a las
leyes del Estado de Delaware
ubicada en la ciudad de Deerfield
Estado de Illinois, E.E.U.U. y
legalmente constituida para un periodo de dura-
ción que aún no ha terminado, que el declarante
está autorizado por dicha compañía para conferir
este poder y que el sello estampado por él al pie de
al poder, en nombre y en representación de la ex-
presada compañía, es el sello social de ella.
El suscrito Notario ha visto los estatutos de incor-
poración firmados en Deerfield
Estado de Illinois con fecha
oct. 1971 y certifica que de conformidad con
la legislación de dicho Estado la anterior declara-
ción juramentada es prueba suficiente de que los
hechos sobre que ella versa son ciertos o verdade-
ros, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of ILLINOIS ss:
County of LAKE
On this 16th day of June, 1993
personally came A. GERARD SLECK
known to me, who being by me duly sworn did de-
pose and say that he is the ASSISTANT SECRETARY
of BAXTER INTERNATIONAL INC.
the Company named within, a Corporation orga-
nized under the laws of the State of DELAWARE
domiciled at the City of DEERFIELD
State of ILLINOIS
of USA and legally constituted for a period of te-
nure not yet expired, that the deponent is authori-
zed by said Company to confer this Power of
Attorney, and that the seal affixed hereunto by the
deponent in the name and on behalf of said Cor-
poration is the Corporate seal thereof
The undersigned Notary Public has seen the Ar-
ticles of Incorporation of said Corporation executed
at DEERFIELD State of ILLINOIS
under date of OCT 19, 1971 and hereby certifi-
es that under the laws of said State the foregoing ac-
knowledgment is a sufficient proof that the facts
therein contained are true, which she attests.

Mary H. Cross
MARY H. CROSS, NOTARY PUBLIC



TRADUCCION OFICIAL No. 8.90.93 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un Poder escrito en inglés y español otorgado por la sociedad BAXTER INTERNATIONAL INC., a favor de los Doctores GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO Y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ).

Dado y firmado hoy 16 de junio de 1993, en Deerfield, Illinois, Estados Unidos de América, por el señor A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia y representación de la sociedad BAXTER INTERNATIONAL INC., expedido en la Ciudad de Deerfield, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, el 19 de octubre de 1993.

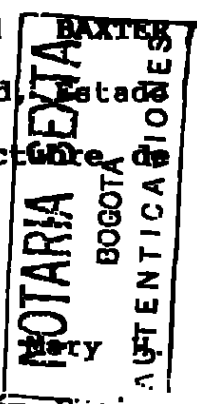
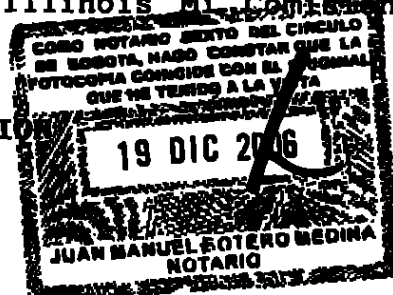
(Firmado), Mary H. Cross, Notario Público

(Sello Notarial en tinta que dice): "SELLO OFICIAL"

Cross, Notario Público, Estado de Illinois Mi Comisión Expira 6/26/94

LINDA IANUZI HESS

CERTIFICACION



ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE

18 NORTH COUNTY STREET

WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Servicios Generales 708/360-3610 * Elecciones 708/360-6628 *

Prórrogas y Redenciones de Impuestos 708/360-6657

ESTADO DE ILLINOIS)

) SS

CONDADO DE LAKE)

CERIFICADO DE AUTORIDAD

Yo, Linda Ianuzzi Hess, Escribano de Condado del condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990, Notario Público nombrado en y para el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy junio 17 de 1993.

(Firmado): LINDA IANUZI HESS

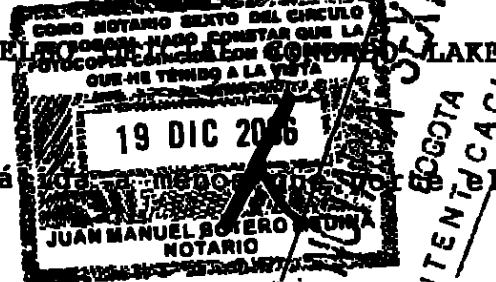
(Sello seco en relieve que dice): SE
ILLINOIS

(Impreso): Esta certificacion no es vá
sello del Condado Lake, Illinois.

(Impreso): 113-208 12/89

(En español): Legalización de la firma que antecede hecha por el CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS, bajo el No. 1610/93, de fecha junio 29 de 1993, firmada por la señora María Teresa González, Encargada de Funciones Consulares.

ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE



Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiun dólares.

(Sello Consular en tinta que dice): CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA * CHICAGO *

Legalización de la firma que antecede hecha por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA bajo el No. 481652 de fecha 5 de agosto de 1993, firmada por el señor Nelson Sánchez Torres, Jefe Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, agosto 9 de 1993

COLO 5873-702-001-4

BRM-27

No. 487876
MINISTERIO RELACIONES EXTERIORES
AREA LE NEGOCIOS GENERALES
HACE CONSTAR
Que el señor (a)
BERNARDO R. DE MARTINEZ
Cuya firma aparece al pie del presente documento, desempeña en esa fecha las funciones allí indicadas.
Sanción de Bogotá, D. C.
12 AGO. 1993
El suscrito Jefe de Legalizaciones no asume responsabilidad alguna por el contenido de este documento.

SANCHEZ TORRES
Jefe Legalizaciones

COPIO NOTARIO SEXTO
BOGOTA
ENCARGADO DE DAR
DOCUMENTO POR
C. No.
con la registrada en esta Notaría
SANTAFE DE BOGOTA D. C.



Bernardo R. de Martinez
Inductura de la Notaría Pública de Bogotá D.C.
Resolución
CONCEJO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
19 DIC 2006
ENCARGADO DE DAR
DOCUMENTO POR
C. No.
con la registrada en esta Notaría
SANTAFE DE BOGOTA D. C.

NOTARIA SEXTA
BOGOTA
AUTENTICACIONES

10 AGO. 1993

12

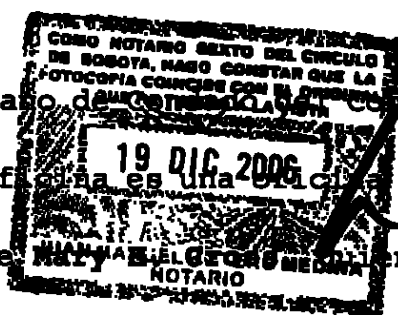
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.03/00 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

MODIFICACIÓN A LA TRADUCCIÓN OFICIAL No. 8.90.93. REALIZADA POR BERNARDA R. DE MARTÍNEZ CON FECHA 9 DE AGOSTO DE 1993.

Se modifica específicamente lo que se subraya en la siguiente transcripción de la parte de la traducción que corresponde al CERTIFICADO DE AUTORIDAD otorgado por el Escribano del Condado de Lake, la cual dice así: "Yo, Linda Ianuzzi Hess, Escribano de Condado del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990, Notario Público nombrado en y para todo el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy junio 17 de 1993".

PARA QUE AHORA SE LEA ASÍ:

Yo, Linda Ianuzzi Hess, Escribano del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, fue nombrada el 26 de junio de 1990 un Notario Público en y para todo el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, a todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy junio 17 de 1993.



(Al dorso) Legalización de la firma que antecede expedida por el
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 481652 del 5 de
agosto de 1993, firmada por el Jefe de Legalizaciones.

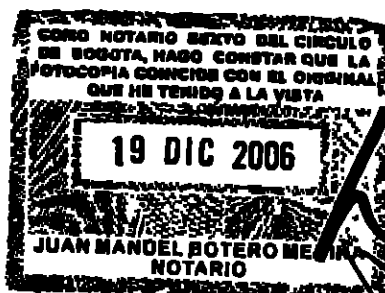
Es traducción fiel de la cual se deja copia en esta oficina para
su confrontación.

COLO WPCL 5873-702-001-4

MAR.13/00

Maria Elvira Martelo
TRADUCCION No. 08.03/00
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

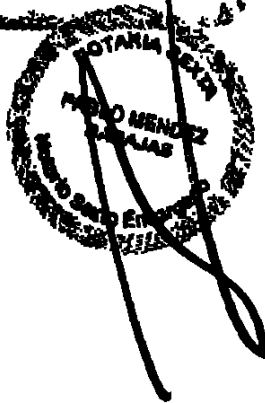
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
533930
ELVIRA MARTELO
FIRMA APOYADA EN EL
DEPARTAMENTO DE
JUSTICIA



1998 MAR 14
SANTAFÉ DE BOGOTÁ
OFICINA DE LEGALIZACIONES

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE
 BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FOTOCOPIA(S) DE

 COINCIDE(N) CON LA FORMA REGISTRADA POR
 EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTIAGO DE BOGOTA, 14 MAR 2007



SECRETARÍA
 NOTARIAL

110

7 11:29

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
 DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
 FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE ME TRUENO A LA VISTA
 19 DIC 2006
 JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
 NOTARIO

44

TELEFONO (57) (1) 2190100
TELEX: 45479 CAVE CO
1231740 4573 CAVE UC

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 49, No. 72-35
BOGOTA 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL CAVE
TELEFONO (57) (1) 2190100
CABLES: CAVELEVES

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BAXTER INTERNATIONAL INC.

Poder conferido el: 16-06-93

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder conferido en el doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

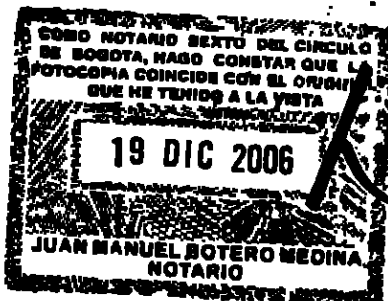
Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,


GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C. No. 2.877.924 de Bogotá



Acepto:


EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén

2e-780-2

07 APR 1964

domicilio(es) de: _____
 lugar(n) en el pueblo: _____
 contenido del mismo es: _____
 En constancia se firma con: _____

NOTARIA SEXTA
BOGOTÁ
AUTÉNTICACIONES

COMO GUERRERO SIENTO DEL CIRCULO
DE SUOCHA HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CORRESPONDIENTE AL
QUE ME TENIA A LA VISTA
19 DIC 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 December 2005 (15.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/118000 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61L 2/00,
2/10, A61M 1/36, C11D 7/26

(21) International Application Number:
PCT/RP2005/005691

(22) International Filing Date: 26 May 2005 (26.05.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/575,310 27 May 2004 (27.05.2004) US

(71) Applicants (for all designated States except US): BAX-
TER INTERNATIONAL INC. [US/US]; One Baxter
Parkway, Deerfield, IL 60015 (US). BAXTER HEALTH-
CARE S.A. [CH/CH]; Hertistrasse 2, 8304 Wallisellen
(CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): REITER, Man-
fred [AT/AT]; Gebrueder-Lang-Gasse 11/17, A-1150

Vienna (AT). MUNDT, Wolfgang [AT/AT]; Florianigasse
57/1/2/6, A-1080 Vienna (AT). BARRETT, Noel [IE/AT];
Stainwandgasse 6A, A-3400 Klosterneuburg/Weidling
(AT). KISTNER, Otfried [DE/AT]; Weyringurgasse
27/16, A-1040 Vienna (AT).

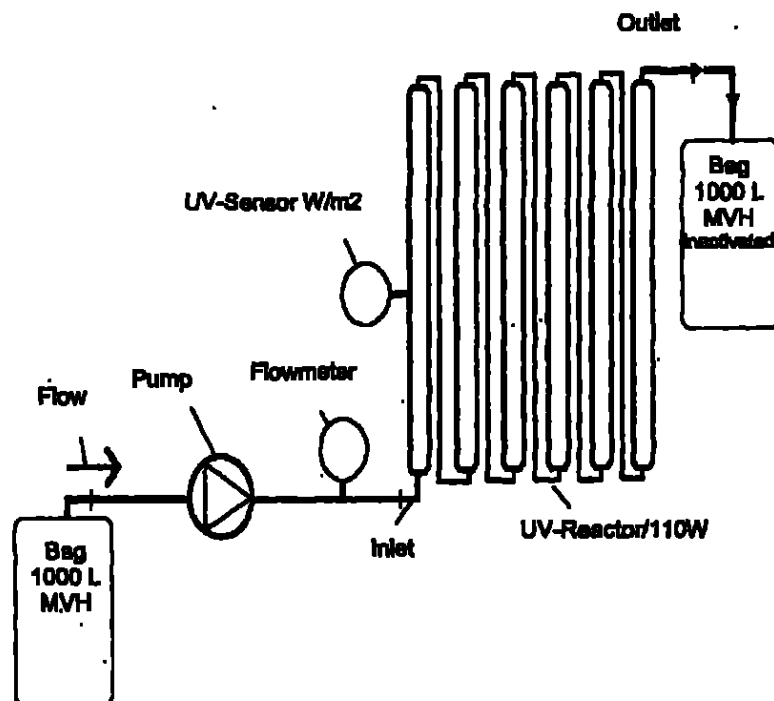
(74) Agent: PERREY, Ralf; Möller-Boré & Partner, Grafinger
Strasse 2, 81671 München (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,

[Continued on next page]

(54) Title: INACTIVATION OF A PATHOGEN IN A SAMPLE BY A TREATMENT WITH FORMALIN AND UV LIGHT



(57) Abstract: The present invention relates to a method for inactivating virus in a sample by treating a virus containing sample with an effective concentration of formalin and by treating the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus.

WO 2005/118000 A1

Description

INACTIVATION OF A PATHOGEN IN A SAMPLE BY A TREATMENT WITH FORMALIN AND UV LIGHT

FIELD OF THE INVENTION

[001] The present invention relates to a method for inactivating viruses by treating a virus containing sample with an effective concentration of formalin and by treating the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[002] Effective inactivation of pathogens in medical products has been a public health concern since it was discovered that previously unknown diseases can be spread quickly through the administration of therapies. Therefore, biotechnological products are coming under increasingly stringent standards intended to decrease the risk of transmitting agents by their use. Potential contaminants not only are a problem in the manufacture of blood products but also in the production of safe vaccines.

[003] One of the most critical steps in the production of vaccines against pathogens, in particular viral vaccines, is viral inactivation. In the case of virus inactivation, formalin is the most frequently used inactivating agent in the manufacture of vaccines. The formalin inactivation step has been validated with established analytical procedures. However, the introduction of highly stringent quality control tests such as mammalian cell culture tests, e.g., the Vero safety test, has demonstrated evidence of residual infectivity in some cases. In an effort to eliminate this residual infectivity mechanical disruption of aggregates and/or filtration turned out to be unsuccessful.

17

[004] As an alternative to formalin treatment, UV inactivation has been considered for integration into the manufacturing process. The use of ultraviolet irradiation-inactivation for human vaccines has been demonstrated before. Milzer et al. (Am. J. Pub. Health (1954) 44:26-33) and Wolf et al. (JAMA (1956) 161:775-81) have reported on immunogenicity results from studies in humans where they used UV inactivated poliomyelitis vaccine. Poliovirus is an unenveloped picornavirus, with a positive single stranded RNA genome in a single segment. As the viral genome is more susceptible to UV-damage than viral surface antigens, in the case of polio to viral capsid proteins, UV-inactivation was shown to have little negative effect on the biochemical characteristics or immunogenicity of the product. The targets for UV inactivation are primarily nucleic acids in contrast to proteins which are targeted by formalin. By combining formalin and UV-inactivation, scientists tried to overcome the limitations of isolated UV-inactivation or formalin-inactivation, respectively, when inactivating the particularly resilient poliovirus. See, e.g., McLean, et al., "Experiences in the Production of Poliovirus Vaccines," *Prog. Med. Virol.*, vol 1, pp. 122-164 (1958.)

[005] UV radiation technologies have a broad application range in food, pharmaceutical, cosmetics and beverage industry, and drinking water. UV disinfection is a physico-chemical process, wherein covalent bonds of the cyclic molecules of the purine and pyrimidine bases are disrupted by the excitation energy of the UV wavelength radiation, damaging the nucleic acids and the genetic information that they encode. Microorganisms such as bacteria and yeasts, etc., as well as viruses that are exposed to effective UVC (100 to 280 nm) radiation are inactivated within seconds. Consequently, successful disinfection depends on the reduction-equivalent irradiation dose. The mean microbicidal irradiation dose expressed in J/m² is measured in the irradiation zone using a biodosimeter. However, UV-inactivation alone is not suitable for producing safe and effective vaccine.

[006] Taylor et al. (J. Immunol. (1957) 79:265-75) describe the inactivation of poliomyelitis virus with a formalin and ultraviolet combination. Molner et al. (Am. J. Pub. Health (1958) 48:590-8) describe the formation of a measurable level of circulating antibodies in the blood of subjects vaccinated with ultraviolet-formalin inactivated poliomyelitis vaccine. Truffelli et al. (Appl. Microbiol. (1967) 15:516-27)

18

report on the inactivation of Adenovirus and Simian Virus 40 Tumorigenicity in hamsters by a three stage inactivation process consisting of formalin, UV light and β -propiolactone. Miyamae (Microbiol. Immunol. (1986) 30:213-23) describes the preparation of immunogens of Sendai virus by a treatment with UV rays and formalin. None of the concepts described above has ever been adopted for general use in vaccine production, although there has been an ever-present need for the production of safe and efficacious vaccines on an industrial scale. In addition, none of the cited studies employed a safety test for determining the residual infectivity of the "inactivated viruses" that is as sensitive as the Vero safety test used in the present study.

[007] Surprisingly, the inventors have found that a combination of formalin and UV inactivation steps can be utilized to fully inactivate virus in a bulk virus production in a high-volume throughput system for the manufacture of inactivated virus for vaccine preparation on an industrial scale. This has also been shown with a high-titer concentrated viral preparation as used in the examples, where no residual viral activity is detected using the very sensitive Vero cell culture test. The inventors have also surprisingly demonstrated that this method works particularly well for enveloped viruses, such as orthomyxoviruses, as compared to the unenveloped viruses, such as the polio picornavirus. This discovery has important implications for the rapid production of safe, highly immunogenic vaccines for emerging and rapidly changing viral diseases such as interpandemic and pandemic influenza strains.

19

SUMMARY OF THE INVENTION

[008] It is an object of the present invention to provide a method which allows a highly efficient and safe inactivation of a virus contained in a sample while retaining a high antigenicity and immunogenicity of the inactivated virus. Particularly, the method of the present invention utilizes a formalin inactivation step in concert with a UV inactivation step in a high-volume throughput system to produce high-antigen content, safe bulk viral preparation for use in vaccine manufacture.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[009] According to one aspect of the invention, the object is solved by providing a method for inactivating a virus contained in a sample, comprising the steps of (i) treating the sample with an effective concentration of formalin, and (ii) subjecting the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus, wherein step (i) is performed prior to step (ii) or vice versa. Preferably, the flow rate of the sample through the apparatus is from about 50 litres per hour to about 1000 litres per hour.

[010] In another preferred aspect of the method for inactivating the virus to be inactivated is an enveloped virus or an enveloped RNA virus, respectively, and the enveloped virus or the enveloped RNA virus, respectively, is wholly inactivated.

[011] According to another aspect it is provided a method for inactivating a virus contained in a sample, comprising the steps of (i) treating the sample with an effective concentration of formalin, and (ii) subjecting the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus comprising a UV lamp and a thin layer chamber in the apparatus that is substantially perpendicular to the diameter of the UV lamp, wherein step (i) is performed prior to step (ii) or vice versa, wherein the sample is passed through the thin layer chamber of the apparatus in step (ii).

[012] In a preferred embodiment of the invention the sample is treated with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus after it has been treated with an effective concentration of formalin. Although the inventors are not bound by any theory, it is thought that the cross-linking effects of the formalin on the surface

20

molecules of the virion stabilizes the virus for the rigors of the high-volume fluid dynamics of the UV inactivation flow-through apparatus.

[013] The method of inactivating according to the invention is effective and safe as has been demonstrated in Example 2 and 4 (A). Moreover, the method of inactivating allows producing vaccines with high antigenicity and immunogenicity which elicit a protective immune response as shown in Example 4 (B).

[014] The term "sample" as used herein includes any sample containing a pathogen or a part thereof such as any fluids, e.g. biological fluids or solutions originating from a cell culture process for preparing biological, medical, or pharmaceutical products such as blood products or vaccines. It may be a sample comprising a biological fluid, such as blood or plasma. It may also be a fluid containing harvested components of a cell culture (e.g., cell or culture media fraction of the culture). In a preferred embodiment the sample is a fluid used in the manufacture of a therapeutic agent e.g. in the production of a vaccine, in which the inactivated virus or a portion thereof is the therapeutic agent. In particularly preferred embodiments, cell components are separated from the sample prior to the inactivation method, for example by filtration or centrifugation.

[015] In a preferred embodiment of the present application the virus is produced from a harvest of a cell culture, consisting of the supernatant and the cells, which is further used for the preparation of a medical product, e.g. a vaccine. In a further embodiment of the present invention the cells of said cell culture have been infected with the pathogen. The cells may be primary cells or any cultured cell line suitable for producing the virus. Examples of cells which may be used include mammalian cells (e.g., CHO, BHK, VERO, HELA cells), avian cells (e.g. chicken embryo fibroblasts, or continuous cell lines from an avian) and insect cells (e.g., Sf9 cells.) In preferred embodiments of the invention, the cells and cell debris from the cell culture production of the viral bulk are separated from the viral bulk prior to the chemical (formalin) inactivation step and/or the UV irradiation inactivation step.

[016] In the present invention, the viruses to be inactivated are enveloped or unenveloped DNA or RNA viruses, with single or double(DNA) stranded genomes,

sense or antisense, continuous or segmented. The viruses may be selected from the group consisting of baculoviruses, poxviruses, adenoviruses, papovaviruses, parvoviruses, hepadnaviruses, coronaviruses, flaviviruses, togaviruses, astroviruses, picornaviruses, retroviruses, orthomyxoviruses, filoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses, arenaviruses, and bunyaviruses. In preferred embodiments of the invention, the viruses are selected from the group of enveloped viruses, including, flaviviruses, togaviruses, retroviruses, coronaviruses, filoviruses, rhabdoviruses, bunyaviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, arenaviruses, hepadnaviruses, herpesviruses, and poxviruses. As demonstrated in Examples 6 and 7, the inactivation methods of the invention are particularly effective on enveloped viruses such as influenza and Ross River viruses, as compared to unenveloped polio and adenoviruses. In other preferred embodiments of the invention, the viruses are selected from the group of enveloped RNA viruses, including, flaviviruses, togaviruses, retroviruses, coronaviruses, filoviruses, rhabdoviruses, bunyaviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and arenaviruses. In one particularly preferred embodiment, the virus is selected from the orthomyxoviruses, for example, an influenza virus strain: influenza virus strains may have varying combinations of hemagglutinin and neuraminidase surface proteins. In another particularly preferred example, the virus is selected from the togaviruses, for example an alphavirus such as the Ross River Virus (RRV.) Another preferred group of viruses for use as the bulk viral solution are the coronaviruses, including the virus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Another group of preferred viruses are the flaviviruses, including Japanese Encephalitis, tick borne encephalitis (TBE), Dengue fever virus, yellow fever virus, and hemorrhagic fever virus. Another preferred group of viruses are the poxviruses, including orthopoxviruses (such as vaccinia or modified vaccinia Ankara viruses), and avipoxviruses.

[017] Parts of an inactivated viral pathogen are also encompassed by the present invention. In a preferred embodiment of the present application said parts can serve as an epitope in an immunogen. This epitope may be used to elicit an immune response against the pathogen. In a preferred embodiment of the present application parts of a pathogen are used as a vaccine against the pathogen. In an especially preferred embodiment said parts of a pathogen are split virions, which may be inactivated before or after being split.

[018] Within the meaning of the present invention the method of inactivating according to the invention is considered safe, or wholly inactivated, when the inactivated virus produced using the method passes a mammalian cell culture test, for example, the safety test described in detail in Example 2. As demonstrated these tests are more sensitive than the other tests utilized, e.g., the egg test. Preferred pass/fail criteria of the safety test are detailed in Example 1 and 2.

[019] In a preferred embodiment of the present application the virus titer reduction due to the inactivation of the virus in the sample is at least about 1×10^5 , in a more preferred embodiment, at least about 1×10^7 in a more preferred embodiment at least about 1×10^{10} , and in a most preferred embodiment at least about 1×10^{14} .

[020] In a preferred embodiment of the present invention, the sample is treated with an effective concentration of formalin for about 12 to about 96 hours. In more preferred embodiments, the sample is treated with an effective concentration of formalin for about 24 to about 48 hours, and more preferably for about 24 to about 30 hours.

[021] In an especially preferred embodiment of the present invention, the sample is treated with an effective concentration of formalin for about 24 to about 24.5 hours.

[022] In a further embodiment the step of treating the sample with an effective concentration of formalin is carried out at about 10 to about 40 °C. In an especially preferred embodiment of the present application the step of treating the sample with an effective concentration of formalin is carried out at about 32 °C.

[023] A preferred embodiment of the present invention includes the treatment of the sample with an effective concentration of formalin, wherein the effective concentration of formalin ranges preferably from about 0.01% to about 1% (w/w), preferably from about 0.01% to about 0.1% more preferably between about 0.025 % and about 0.1% which corresponds to about 92 mg/l and about 368 mg/l formalin respectively when using a 37% formalin solution for adjusting the effective concentration.

[024] In the present application the term "UV light" means ultraviolet radiation having a wavelength of 100 to 400 nm. The UV light may be selected from the group consisting of UVC (100 to 280 nm), UVB (280 to 320 nm), and UVA (320 to 400 nm). Photosensitizing agents like those which intercalate into the DNA and are activated by UV light, e.g. psoralens, may be used to enhance the inactivating effect of the UV radiation. In a preferred embodiment of the present invention the UV light is UVC having a wavelength of about 100 to about 280 nm. In a more preferred embodiment of the present invention the UV light has a wavelength from about 240 to about 290 nm. In an especially preferred embodiment of the present invention about 85% or more of the UV light have a wavelength of about 254 nm.

[025] The UV light emission may be a continuous form of UV light emission, e.g. mercury lamp technology, or pulsed UV light, e.g. monochromatic laser technology. The desired UV intensity may be generated by combining two or more lamps. In a preferred embodiment the UV light is emitted continuously by a lamp of about 110 W. In a preferred embodiment illustrated in the examples, the UV lamp has a length of about one meter, as does the lamp used in the examples (950 mm.)

[026] The subject matter of the invention encompasses any effective dose of UV light, i.e. any dose of UV light which safely inactivates a given virus when combined with a formalin treatment as described above. The effective dose may depend on a variety of factors which are generally known in the field, e.g. the physical parameters of the UV inactivation chambers such as size and diameter of the lamp and the chamber, distance between the virus containing medium and the UV light source, light absorption and reflection properties of the material of the chamber. By the same token, the wavelength and intensity of the UVC light as well as the contact time the virus is exposed to the UV light is also critical for the effective dose. Furthermore, the effective dose is also influenced by the virus itself, the medium containing the virus and their light absorption properties. Preferably, the effective dose is sufficient for killing at least 99.99% of virus contained in the sample, more preferably inactivating the virus to a level where no active virus is detected in a mammalian cell culture test, preferably the test according to Example 2, or wholly inactivated. In a preferred embodiment using UVC light a sample containing the virus is exposed to an effective

24

dose ranging from about 5 to about 200 mJ/cm². In a preferred embodiment the effective dose is in the range of about 20 to about 100 mJ/cm², and in other preferred embodiments the effective dose is in the range of about 40 to about 90 mJ/cm². As a comparison, the effective dose for killing 99.99% of pathogens present in drinking water is about ≥ 40 mJ/cm². In a preferred embodiment, the effective dose reduces an initial virus titer by 1×10^5 . In bulk vaccine inactivation, the effective dose should be sufficient to eliminate any residual live virus which may be present after the initial chemical (formalin) inactivation step. As illustrated in the examples, this may be determined by very sensitive mammalian cell culture infection tests, such as the Vero cell culture test described.

[027] Further preferred embodiments of the invention and in particular of the UV light chamber are provided in the examples.

[028] In a further preferred embodiment of the present invention the contact time of the sample with the UV light is in the range of about 1 to about 20 seconds, preferably from about 1.4 to about 14 seconds. The contact time is preferably calculated based on a sample which is approximately 1 mm thick along the tangent to the light source, and the wattage of the UV lamp of about 110 W. As one of skill in the art will appreciate, thicker sample depths and lesser energy (wattage) light sources would increase the exposure time and *vice versa*. In a more preferred embodiment of the present application the contact time of the sample with the UV light is about 1.4 to about 7 seconds and in an especially preferred embodiment of the present application the contact time of the sample with the UV light is about 2.8 to about 4.2 seconds.

[029] In order to test whether a given set-up of the method according to the invention employing a given UV light dose effectively inactivates a pathogen according to the invention, one should test the inactivated virus for residual viral activity. This may be accomplished by using a mammalian cell culture test, for example the Vero safety test preferably applying the criteria detailed in Examples 1 and 2.

25

[030] According to the present invention the treatment of the sample with an effective dose of UV light is carried out in a flow-through apparatus, preferably as specified in Table 1 and Fig. 1.

[031] In a preferred embodiment of the present invention the flow-through apparatus contains a thin layer chamber. The minimum thickness of the chamber should allow sufficient flow of the bulk viral solution to allow for reasonable swift processing, and to prevent the disruption of virus for whole inactivated virus vaccines. Thus, preferably, the thin layer is at least about 0.1 mm thick for the production of whole inactivated virus. Also, due to the absorbance of the UV radiation by the bulk viral solution, and the need to ensure sufficient irradiation of all virus in the solution, the maximum thickness should not allow any virion to pass through the apparatus without being sufficiently irradiated. Thus, the thin layer should not be thicker than about 1 cm thick. The thin layer is preferably from 0.5 mm to 3 mm thick, and more preferably about 1 mm so that the maximum distance between the UV lamp and the pathogen to be inactivated is less than about 1 mm. Alternatively, the sample may be passed through the lamp parallel to the length of the lamp, so that the sample is irradiated from the outer diameter, rather than the inner diameter, of the sample chamber. Similarly, a lamp within a sample chamber within a lamp (or circle of lamps) could be used as a configuration, irradiating the sample chamber from both the internal and external diameters. In addition, the chamber is preferably designed so that the flow of the sample through the chamber is not strictly laminar, but rather is turbid. This will assist in mixing the virus through the sample medium, ensuring even exposure to the UV radiation.

[032] In another preferred embodiment of the present application the flow-through apparatus contains an UV inactivation chamber, wherein the UV lamp has a diameter of about 30 mm and the chamber surrounding the UV lamp through which the sample flows has a diameter of about 32 mm. In a preferred embodiment of the present application the chamber has a total volume of about 92 ml.

[033] The sample to be irradiated can be passed through the apparatus. In a preferred embodiment the sample is cooled while passing the UV irradiation chamber. In a further preferred embodiment of the present invention the sample

28

passing the UV irradiation chamber has a temperature of about 2 to about 32°C, more preferably of about 2 to about 8°C.

[034] Preferably, the flow-rate of the sample in the flow-through apparatus is in the range from about 50 to about 1000 litres per hour, more preferably about 230 to about 480 litres. In an especially preferred embodiment flow-rate of the sample in the flow-apparatus is in the range from about 230 to about 250 litres per hour, more preferably about 240 litres per hour. These preferred flow rates, exemplified in the examples, allow for the economical large scale UV processing of the bulk viral solution.

[035] In a preferred embodiment, the contact time depends on the length of the sample chamber in which the sample is exposed to the UV radiation, and the flow rate of the sample through the chamber. Thus, the effective dose which can be simply adjusted by increasing the number of UV-lamps arranged in the flow-through apparatus, increasing the effective length of the sample chamber exposed to UV radiation. Alternatively, using a same number of longer lamp-chambers will increase the effective dose, as using a larger number of shorter lamp-chambers may be equivalent to the same effective dose.

[036] In a further preferred embodiment of the present application the step of subjecting the sample to an effective dose of UV light in a flow-through apparatus is repeated in a cyclic or serial manner. It may be repeated for about 2 to about 10 times. In a preferred embodiment of the present application the step of subjecting the sample to an effective dose of UV light in a flow-through apparatus is repeated for about 2 to about 5 times and in a more preferred embodiment of the present application it is repeated for about 2 to about 3 times. An added benefit to using multiple lamp chambers in serial, or recirculated flow through the same lamp, is that the sample may be more thoroughly mixed between chambers or cycles to ensure even exposure of the virus to the UV radiation.

[037] After the virus in the sample has been inactivated, the inactivated virus may then be purified for use in various applications, including vaccine and other pharmaceutical compositions. According to another preferred embodiment of the

27

Invention, the method of inactivation further comprises a step of purifying the inactivated virus in the sample to pharmaceutical purity and formulating the purified virus into a pharmaceutical composition for used as a vaccine. Purification may be accomplished by means known in the art, including, but not limited to, filtration or diafiltration, chromatography (e.g., size exclusion, ion exchange, immunoaffinity, and the like,) or centrifugation. Alternatively, the virus may be purified prior to inactivation by the methods of the invention.

[038] According to another preferred embodiment of the invention, the method of inactivation further comprises a purification step, i.e the sample is subjected to a purification step to remove residual formalin in the sample. Such purification is useful if levels of formalin remain which are higher than pharmaceutically acceptable levels. The inactivated virus, after optional purification steps, may then be formulated into a pharmaceutical composition. Formulations may optionally include carriers (e.g., physiological saline or buffers), excipients, stabilizers (e.g., albumin, saccharides, and/or amino acids,) salts, and/or adjuvants (e.g., alum). Alternatively, the inactivated virus may be further modified for pharmaceutical use, e.g., by encapsulation in liposomes.

[039] The present invention will be further illustrated in the following examples, without any limitation thereto. Having described the invention in detail, it will be apparent that modifications and variations are possible without departing the scope of the invention defined in the appended claims.

FIGURES

[040] Figure 1 shows an UV thin layer chamber which may be used for the UV inactivation step of the present invention.

[041] Figure 2 shows an UV inactivation system equipped with an UV sensor. The UV sensor and flowmeter are optional features. In a further embodiment of the present application the pump and/or the flowmeter may be installed at the outlet tube.

[042] Figure 3 shows an UV inactivation system utilizing several UV thin layer chambers (UV reactor) connected to each other for the repeated subjecting of the sample to an effective dose of UV light in a flow-through apparatus. The number of UV thin layer chambers may vary between about 2 and about 10. The UV sensor and flowmeter are optional features. In a further embodiment of the present application the pump and/or the flowmeter may be installed at the outlet tube. A continuous UV generator with serially connected inactivation chambers may be used in a large scale manufacturing process, thus allowing high throughput of a sample.

EXAMPLES

Example 1: Principle of the standard egg safety test

[043] A standard egg safety test was used to test for residual infectivity of inactivated Influenza strains. A monovalent bulk product, i.e. a purified virus antigen after sucrose gradient centrifugation and ultra-diafiltration, is injected into 10 eggs (0.2 ml/egg). After incubating for 3 days at 32°C, the eggs are harvested, pooled, and again injected into 10 eggs (0.2 ml/egg). After another incubation step for 3 days at 32°C, the eggs are harvested, pooled, and tested for hemagglutinin (HA).

[044] The HA-test is based on the fact that Influenza viruses can bind erythrocytes using their surface protein hemagglutinin. The test is carried out in a sterile environment. A suspension of Influenza viruses with a defined HA titer serves as a positive control and a 0.9% NaCl solution serves as a negative control. 50 µl of a 1:2 dilution in 0.9% NaCl of a sample to be tested are given into one well of a 96-well plate. To each well 50 µl of a solution containing chicken erythrocytes is added. Subsequently, the plates are incubated for 30 to 45 minutes at room temperature. Then the hemagglutination is visually determined, wherein, if five wells containing the same sample do not show any hemagglutination, the sample passed the HA test.

Example 2: Principle of the standard Vero safety test

[045] The standard Vero safety test is a highly stringent quality test for the residual infectivity of inactivated influenza strains. The test is also applicable to other viruses.

A monovalent bulk product, i.e. purified virus antigen after sucrose gradient centrifugation and ultra-diafiltration, is added to 5 Roux flasks (4 ml/flask). After incubating for 7 days at 32°C in Vero culture medium, the cell cultures are harvested, pooled and added to 5 Roux flasks (10 ml/flask). After another incubation step for 7 days at 32°C, the cell cultures are harvested, pooled, and tested for hemagglutinin (HA) as described in Example 1.

Example 3: Formalin Inactivation

[046] The first inactivation step with formalin is carried out on a cell-free, infectious monovalent virus harvest, i.e. a bioreactor harvest after clarification via centrifugation. After the collection at 30 to 34°C the monovalent virus harvest is treated with about 0.9 to about 1.1 U/ml Benzonase at 30 to 34°C for 4 to 8 hours. Then it is treated with ≤ 92 mg/l formalin for 24 to 24.5 hours at 32 ± 2 hours.

Example 4: Inactivation experiments with a 65 Watt UV lamp

[047] A number of inactivation experiments with formalin-inactivated viruses are carried out using an inactivation chamber with a 65 W UV lamp and a thin layer chamber. Although full inactivation of monovalent virus harvest can be demonstrated when using flow rates of 100 liter per hour for three cycles, this setup did not allow the on-line measurement of the UV signal. The Vero cell culture medium used for Influenza production contains various organic compounds being responsible for absorption of the UV signal. Therefore, the system, is equipped with a 110 W lamp allowing a continuous monitoring of the UV signal during monovalent virus harvest treatment.

Example 5: Inactivation experiments with a 110 Watt UV lamp

[048] Formalin treated monovalent Influenza Panama harvest is used as a model substrate for the inactivation studies. For continuous inactivation with thin layer UV technology a WEDECO VISA system (Germany) equipped with a VISA lamp (110 W/4 V) is used. The UV thin layer chamber is a stainless steel 1.4435 device with a 30 mm diameter quartz tube (cf. Table 1). A calibrated UV sensor allows on-line

control of the UV signal. The UV thin layer chamber is operated at a flow rate of 240 $\pm$ 10 liter per hour at ambient temperature. The flow rate conditions are controlled by a calibrated flowmeter (cf. Fig. 2).

Table 1**Characteristics of the UV inactivation chamber.**

UV lamp	110 W
length of lamp	950 mm
Ø UV lamp	30 mm
Ø chamber surrounding the UV lamp	32 mm
thin layer	1 mm
total volume / chamber	92 ml
contact time / chamber	1.4 seconds

[049] The monovalent harvest is exposed to 10 UV cycles. After each cycle 20 liter of the UV treated monovalent harvest is removed and further purified by sucrose gradient purification using continuous ultracentrifugation conditions with an extended 42% sucrose gradient in 20 mM Tris-buffer and a defined purified monovalent harvest (PMVH) from 48% to 36% sucrose using a Sorvall CC40 centrifuge without preclarifier (Hitachi Koki Co, LTD., Tokyo, Japan).

Table 2

Overview of ultracentrifugation runs of formalin and UV treated Influenza Panama.

Ultracentrifugation Run	Inactivation Conditions
UZ-INF-45-03	no UV
UZ-INF-48-03	240 l/hour, 1 cycle
UZ-INF-52-03	240 l/hour, 2 cycles
UZ-INF-51-03	240 l/hour, 3 cycles
UZ-INF-50-03	240 l/hour, 4 cycles
UZ-INF-49-03	240 l/hour, 5 cycles
UZ-INF-58-03	240 l/hour, 7 cycles
UZ-INF-57-03	240 l/hour, 10 cycles

(A) Antigen yield and purity

[050] Influenza antigen yield and purity are compared based on hemagglutinin content (HA), total protein and Vero-protein (host cell protein). The purified virus is compared on the basis of the HA/protein ratio, host cell protein/HA ration and virus safety (cf. Table 3). For all UV treated harvests no viral growth can be detected. In contrast, purified virus derived from standard formalin inactivation process (no UV radiation applied) can be amplified in Vero cell culture. Although a slight reduction in the HA/protein ratio can be seen after cycle 7 and 10, no significant difference of formalin and double inactivated product is detected with respect to antigen purity measured as HA/protein and host cell protein/HA ratio.

Table 3

**Sucrose gradient purified Panama virus after formalin and UV treatment.
Comparison of HA/protein ratio, host cell protein/HA ratio and safety after 0 to 10 UV
cycles.**

Number of UV Cycles	Contact Time (s)	HA/Protein ratio	Host cell protein/HA ratio	Vero safety
0	0 (no UV)	0.85	0.04	failed
1	1.4	1.09	0.04	passed
2	2.8	0.88	0.04	passed
3	4.2	0.91	0.04	passed
5	7.0	0.83	0.04	passed
7	9.8	0.60	0.02	passed
10	14	0.58	0.03	passed

[051] Further studies are carried out to characterize the effect of UV inactivation on antigenicity and immunogenicity in guinea pigs and mice by hemagglutinin inhibition (HAI) analysis.

(B) Antigenicity

[052] Antigenicity is analysed by HAI assay against Panama specific antisera. Although increased UV contact time results in slight loss of HA, no negative effect is shown for the HAI titer (cf. Table 4).

Table 4

**Sucrose gradient purified Panama virus after formalin and UV treatment.
Comparison of antigenicity based on HA and HAI titer with Panama specific antisera
after 0 to 10 UV cycles.**

Number of UV Cycles	Contact Time (s)	HA (μg/ml)	HAI titer
0	0 (no UV)	211	640
1	1.4	209	640
2	2.8	200	640
3	4.2	196	640
5	7.0	191	640
7	9.8	177	640
10	14	154	640

(C) Immunogenicity

[053] Immunogenicity is analysed by immunizing guinea pigs and mice with different aliquots of the Purified Monovalent Virus Harvests followed by a booster three weeks after the first immunization. The sera of the immunized animals are collected and pooled after three and six weeks and analysed by HAI assay against egg-derived and Vero-derived antigens. Immunogenicity tested in guinea pigs and mice after 3 and 6 weeks give very promising results, no significant difference can be seen for the double inactivated virus versus standard formalin treated virus (cf. Table 5).

39

Table 5

Sucrose gradient purified Panama virus after formalin and UV treatment (0 to 10 cycles). Comparison of the immunogenicity tested in guinea pigs and mice. A) after 3 weeks, B) after 6 weeks. HAI with egg- and Vero-derived Influenza antigen.

A

Number of UV Cycles	Contact Time (s)	Guinea pigs		Mice	
		HAI titer after 3 weeks		HAI titer after 3 weeks	
		Egg	Vero	Egg	Vero
0	0 (no UV)	160	320	320	1280
1	1.4	160	320	320	1280
2	2.8	160	640	320	1280
3	4.2	160	320	320	1280
5	7.0	160	320	320	1280
7	9.8	160	320	320	1280
10	14	160	640	320	1280
control	-	40	20	80	80

B

Number of UV Cycles	Contact Time (s)	Guinea pigs		Mice	
		HAI titer after 6 weeks (Booster)		HAI titer after 6 weeks (Booster)	
		Egg	Vero	Egg	Vero
0	0 (no UV)	1280	1280	1280	2560
1	1.4	1280	2560	640	1280
2	2.8	1280	1280	640	1280
3	4.2	640	1280	1280	2560
5	7.0	1280	2560	1280	2560
7	9.8	640	1280	1280	2560
10	14	1280	2560	1280	2560
control	-	160	80	160	40

35

[054] The results summarized in Table 4 and Table 5 show that the UV treatment does not result in significant differences in HAI titers demonstrating that the antigenicity and thus immunogenicity of the product is not affected.

[055] In all double inactivation experiments total safety can be demonstrated even after 1 cycle of UV treatment. The detailed investigations in laboratory and final scale demonstrated the effectiveness of the UV irradiation step when combined with formalin treatment. The immunological characterization of the purified virus antigen after UV treatment yields results comparable to those obtained with non UV untreated product. No negative effect on the biochemical characteristics nor immunogenicity of the viral product can be detected.

Example 6: Virus titer reduction with formalin and/or UV inactivation

[056] The virus titer reduction by the combined treatment of the sample with an effective concentration of formalin and an effective concentration of UV light in a flow-through apparatus is tested with different viruses. The formalin inactivation was carried out at 32°C for 24 hours with a final formalin concentration of 0.025% (w/v). The UV inactivation in the flow-through apparatus is carried out for 3 cycles at a flow rate of 240 l/hour. The contact time of the sample with the UV light per cycle is 1.4 seconds.

Table 6

Virus titer reduction with formalin and/or UV inactivation.

Virus	Virus Type	Measured Virus Titer Reduction after Formalin Treatment (log reduction)	Measured Virus Titer Reduction after UV Treatment (log reduction)	Calculated Virus Titer Reduction after Formalin and UV Treatment (log reduction)
Influenza New Caledonia	A/H1N1/20/99	≥7.4	≥7.3	≥14.7
Influenza Panama	A/H3N2/2007/99	≥8.4	≥6.7	≥15.1

Influenza Shangdong	B/7/97	≥ 6.7	≥ 7.2	≥ 13.9
Pollo	Type 1	3.0	4.9	7.9
Adeno	Type 5	3.1	2.5	5.6

[057] The results show that by a combined formalin- and UV- treatment of viruses a drastic reduction of the respective virus titers is obtained.

Example 7: UV-Inactivation of a Ross River Virus (RRV) Candidate Vaccine

[058] Ross River Virus (RRV) is a mosquito borne alphavirus which causes a disease in humans known as epidemic polyarthritis (EPA). Symptoms include arthritis, particularly in the knees and in the small joints of the hands and feet, often accompanied by fever, rash and other non-specific constitutional changes. Arthritis symptoms commonly last 30 – 40 weeks and 25% of patients still have residual symptoms 1 year after onset. It is endemic in Australia, with more than 8000 cases each year, and throughout the Pacific region. In 1979/80 epidemics of Ross River Virus infection also occurred in Fiji, Samoa, the Cook Islands and New Caledonia. There is currently no vaccine existing.

(A) RRV Inoculation of Serum-free Microcarrier Based 1200 Liter Vero Cell Fermenter Cultures and Formalin Inactivation

[059] 1200 liter fermenter cultures of microcarrier based serum-free Vero cells were inoculated with Ross River production virus. The cultures were incubated for 3 days at 37°C. Samples were drawn every day for titration. At day 3, when 100% of the cells were destroyed by CPE (cytopathic effect) virus was harvested. After separation of cell debris and microcarriers from the infectious virus harvest and a first filtration step (1.2 μm /0.2 μm), benzonase was added for degradation of nucleic acids (DNA/RNA). Formalin inactivation was carried out with 0.1% (w/v) formalin end concentration for eight days. A second and a third filtration step were carried out after two hours and 24 hours, respectively. Benzonase was added a second time at 24 hours for removal of residual nucleic acids. Samples were drawn for virus titration =

tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀/ml) in Vero cells and safety tests on C6-36 cells and Vero cells according to Table 7.

[060] One day after inoculation of a 1200 liter fermenter with RRV, a virus titer of log TCID₅₀/ml of 5.8 could be demonstrated, which rose to 7.8 (day 2), 8.1 (day 3 before harvest) and 8.0 after virus harvest. After separation, first filtration and benzonase addition, virus titers dropped to 7.5, 7.2, and 7.4, respectively. After formalin addition, titers were determined after removal of the cytotoxic formalin suspension by centrifugation and resuspension of the virus pellet (Table 7, column: TCID₅₀/ml TL 100). 15 minutes after formalin was added to the virus harvest, titers dropped dramatically to 1.6. 12 h after formalin inactivation, no more virus titer could be demonstrated.

[061] 24 hours after onset of formalin inactivation samples were submitted to safety tests on C6-36 cells and Vero cells. Whereas after 24 h and 26 h after inactivation 1 positive (CPE) and 4 negative samples could be demonstrated on Vero cells, 4 positive and 1 negative sample were obtained with the much more sensitive C6-36 cell line. From day 2 onwards, all samples were negative on Vero cells. The C6-36 cell line still showed CPE with 1 sample on days 2 and 3, and 4 negative samples, respectively. On days 4 and 5 all samples tested negative on C6-36 cells, but on days 6 and 7 one sample again showed CPE. After day 8 no more positive samples could be shown on neither Vero cells nor C6-36 cells.

78

Table 7 Safety Results of a Ross River Virus Harvest of a 1200 Liter Fermenter

Sample	TCID ₅₀ /ml	TCID ₅₀ /ml TL100	Safety C8-38	Safety Vero
Infection day 1	5.8	n.d	n.d	n.d
Infection day 2	7.9	n.d	n.d	n.d
Infection day 3	8.1	n.d	n.d	n.d
Harvest	8.0	n.d	n.d	n.d
after Separator	7.8	n.d	n.d	n.d
after 1 Filtration (1.2 µm / 0.2 µm)	7.2	n.d	n.d	n.d
after Benzonase addition	7.4	n.d	n.d	n.d
Formalin 0 h (15 minutes)	n.d	1.8	n.d	n.d
Formalin 1 h	n.d	1.4	n.d	n.d
Formalin 2 h (before 2. filtration)	n.d	1.4	n.d	n.d
Formalin 3 h (after 2 filtration)	n.d	1.7	n.d	n.d
Formalin 6 h	n.d	1.1	n.d	n.d
Formalin 12 h	n.d	< 0.2	n.d	n.d
Formalin 18 h	n.d	< 0.2	n.d	n.d
Formalin 24 h (before 3 filtr before 2 Benzonase add)	n.d	< 0.2	4 positive 1 negative	1 positive 4 negative
Formalin 28 h (after 3 Filtr after 2 Benzonase add)	n.d	< 0.2	4 positive 1 negative	1 positive 4 negative
Formalin day 2	n.d	< 0.2	1 positive 4 negative	5 negative
Formalin day 3	n.d	< 0.2	1 positive 4 negative	5 negative
Formalin day 4	n.d	< 0.2	5 negative	5 negative
Formalin day 5	n.d	< 0.2	5 negative	5 negative
Formalin day 6	n.d	< 0.2	1 positive 4 negative	5 negative
Formalin day 7	n.d	< 0.2	1 positive 4 negative	5 negative
Formalin day 8	n.d	< 0.2	5 negative	5 negative

(B) Transfection and Infection Experiments with RRV RNA

[062] The results of the above mentioned safety tests raised suspicion, that genomic RRV RNA might be released during the inactivation procedure. This in turn could lead to incorporation of genomic RRV RNA into the respective cells. Although benzonase treatment should lead to complete degradation of RNA, liposome formation or other mechanisms like masking of the genomic RRV RNA with protein debris, could explain the escape strategy of intact RNA.

[063] RRV genomic RNA was isolated from gradient purified virions. Via RT-PCR the number of particle equivalents could be determined. In a first experiment (Table 8, No. 1) particle equivalents (genomic RNA) were diluted in tenfold steps in both transfection medium (i.e. transfection) and regular medium (i.e. infection). With both mixtures C6-36 cells and Vero cells were inoculated. After a medium exchange, cell cultures were incubated for several days. Samples of the respective supernatants were used for virus titration and HA determination. Infection experiments with genomic RNA were carried out several times (Table 8, No's. 1-5).

[064] The transfection experiments showed positive results in TCID₅₀ on both C6-36 cells and Vero cells. Vero cell supernatants also exhibited HA-Titers. The infection of Vero cells with a high number of particle equivalents (10^8) showed a virus titer of 6,8 log TCID₅₀/ml and had an HA-titer of 128, but failed to infect C6-36 cells. Another infection experiment with genomic RRV RNA (No. 4) resulted in both infected C6-36 cells and Vero cells, with titers of 8.4 and 6.6 log TCID₅₀/ml, respectively. Infection attempts 2, 3 and 5 gave no positive results on Vero cells. Infection attempt No.3 gave a low titer of 1.6 log TCID₅₀/ml on C6-36 cells.

[065] Although not all attempts to infect cells with pure genomic RRV RNA showed positive results, it seems that genomic RNA at high concentrations is capable to infect cells randomly. All experiments using a liposomic transfection reagent showed positive results. Hence, protein masking of RNA or liposome formation mechanisms will explain the positive safety tests after formalin inactivation and benzonase degradation of free DNA/RNA in Table 7.

Table 8
Transfection and Infection Experiments with RRV RNA

No	Sample	Infect. PA*	RNA-Transfection (DMRIE-C)				RNA-Infection		
			C6-36		Vero		C6-36	Vero	
			log TCID ₅₀	HA	log TCID ₅₀	HA	log TCID ₅₀	log TCID ₅₀	HA
1	RNA-1	1 x 10 ⁶	7.4	neg	7.1	128	0.2	6.8	128
		1 x 10 ⁷	5.5	neg	7.1	64	0.2	neg	nd
		1 x 10 ⁸	7.6	neg	7.2	128	0.2	neg	nd
		1 x 10 ⁹	5.2	neg	5.6	128			
		1 x 10 ⁶	0.2	neg	0.2	neg			
2	RNA-1	1 x 10 ⁶					0.2	0.2	nd
3	RNA-1	1 x 10 ⁸	7.5	nd	4.6	nd	1.6	0.2	nd
4	RNA-2	1 x 10 ⁶	7.2	nd	4.2	nd	8.4	6.6	nd
	RNA-2	1 x 10 ⁷	7.0	nd	5.0	nd			
5	RNA-2	1 x 10 ⁸					0.2	0.2	nd

* PA. infectious particle equivalents
nd not done

24

(C) UV-Inactivation of Infectious RRV

[066] For the above mentioned considerations, small scale experiments were carried out to inactivate RRV by UV-irradiation. RRV PV supernatants were UV-irradiated for different amounts of time with two UV-Intensities: 2.1 mW/cm² (samples 1-10) and 3.3 mW/cm² (samples 11-20). Subsequently, these samples were submitted to virus titration, antigen-titration (EIA) and the hemagglutination titer was determined. Samples, which were irradiated for more than 3 minutes (No's. 6-10 and 14-19), were also submitted to safety testing on C6-36 cells (Table 9).

[067] Virus titers dropped after 10 minutes of UV-irradiation from 7.4 log TCID₅₀/ml (control, sample #1) to 1.5 log TCID₅₀/ml with both UV-Intensities. Hemagglutination remained stable for 15 minutes at an UV-intensity of 2.1 mW/cm² with an HA-titer of 9, but dropped to 8 at an UV-Intensity of 3.3 mW/cm². Antigen-titers (EIA) also remained stable for 15 minutes of irradiation, within a range between 640-1280. Safety tests, carried out with samples irradiated for 3 and 5 minutes at an UV-Intensity of 2.1 mW/cm² (sample No's. 6 and 7), still showed CPE in cell culture and gave virus titers of 8.2 and 8.6 log TCID₅₀/ml, respectively. Safety tests, carried out with samples irradiated for 2, 3 and 5 minutes at the higher UV-Intensity of 3.3 mW/cm² (sample No's. 6 and 7), still showed CPE in cell culture and resulted in virus titers of 8.2, 8.6 and 8.7 log TCID₅₀/ml, respectively. After 10 minutes of irradiation, all safety tests were negative.

[068] UV-irradiation at intensities of both 2.1 mW/cm² and 3.3 mW/cm² for more than 10 minutes inactivated RRV preparations completely. Antigenicity, as shown in HA- and EIA-Tests, remained undamaged at both irradiation intensities for 15 minutes. After 30 minutes, the antigenicity was affected.

Table 9
UV Inactivation of Infectious Virus

No	Sample	Treatment	Time (seconds)	TCID ₅₀ /ml	HA	EIA	UV-Intensity mW/cm ²	UV Total mJ/cm ²	Safety C8-38 TCID ₅₀ /ml
1	RRV PV/Sp5/5714/98	starting material		7.4	9	640		0	n.d
2	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 5 cm 30 s	30	4.4	9	640	2.1	63	n.d
3	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 5 cm 60 s	60	3.7	9	640	2.1	126	n.d
4	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 5 cm 90 s	90	1.7	9	640	2.1	189	n.d.
5	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 5 cm 2 min	120	1.8	9	640	2.1	252	n d.
6	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml, 5 cm 3 min	180	3.2	9	1280	2.1	378	+ (8.2)
7	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 5 cm 5 min	300	1.5	9	1280	2.1	630	+ (8.6)
8	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml, 5 cm 10 min	600	1.5	9	1280	2.1	1260	(0.2)
9	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 5 cm 15 min	900	1.5	9	640	2.1	1890	(0.2)
10	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 5 cm 30 min	1800	1.5	7	320	2.1	3780	(0.2)
11	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 30 s	30	3.8	9	640	3.3	99	n.d
12	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 60 s	60	3.0	9	640	3.3	198	n.d
13	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 90 s	90	1.7	9	640	3.3	297	n.d
14	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 2 min	120	2.2	9	640	3.3	396	+ (8.2)
15	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 3 min	180	1.8	8	640	3.3	594	+ (8.6)
16	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml, 3 cm 5 min	300	1.5	8	1280	3.3	990	+ (8.7)
17	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 10 min	600	1.5	8	640	3.3	1980	(0.2)
18	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 15 min	900	1.5	7	640	3.3	2970	(0.2)
19	RRV PV/Sp5/5714/98	4 ml 3 cm 30 min	1800	1.5	2	180	3.3	5940	(0.2)
20	positive control			7.2	9				n.d

W/O 2005/118000

PC1/EP2005/005691

(D) UV-Inactivation of a Formalin Inactivated 1200 Liter Fermenter Harvest

[069] An aliquot of a formalin treated 1200 liter fermenter virus harvest was UV-irradiated with 3 cycles at a flow rate of 300 l/h, 3 cycles at 150 l/h and 3 cycles at 75 l/h. A second aliquot of a formalin treated 1200 liter fermenter virus harvest was UV-irradiated with 10 cycles at a flow rate of 300 l/h, but this time after diafiltration, to remove high concentrations of small remaining proteins. HA-titers, antigen-EIA-titers, virus titers and safety (CPE) were determined after each run (Table 10).

[070] Virus titers in the first experiment (without diafiltration) dropped after 1 cycle of UV-irradiation at a flow velocity 150 l/h from 6.13 log TCID₅₀/ml below the detection limit. Safety tests also showed no CPE. However, after 3 cycles of UV-irradiation at a flow rate 150 l/h, safety tests in cell culture showed positive results and were also positive in virus titration (6.7 log TCID₅₀/ml). 3 cycles of UV-irradiation at a flow rate 75 l/h remained negative in both virus titration and safety tests. In the second experiment safety tests and virus titration remained negative after 5 and more irradiation cycles. In the first experiment all irradiation doses did not influence HA- and EIA-titers with 11 and 1:320, respectively. In the second experiment all HA- and EIA-titers were 10 and 1:320, respectively, with the exception of 6 irradiation cycles, which resulted in an EIA-titer of 1:640.

[071] Double inactivation of a fermenter harvest of RRV with formalin and five or more cycles of UV-irradiation at a flow rate of 300 l/h is sufficient to completely destroy infectivity without damaging antigenicity.

Table 10
UV Inactivation of a RRV 1200 Liter Fermenter Harvest

Sample	HA-Titer	AG-EIA-Titer	TCID ₅₀ (after C6-36 Passage)	Safety Final Readout/ CPE
RRV F07-31 Harvest+Formaldehyd starting material	11	1:320	6.13	++++
RRV F07-31 Ultrafiltrate	4	1.60	7.04	+
RRV F07-31 Diafiltrate starting material	11	1 320	5.95	++++
RRV F07-31 Harvest+Formalin 1x UV 300/h	11	1 320	6.29	++++
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 2x UV 300/h	11	1 320	5.71	++++
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 3x UV 300/h	11	1 320	6.31	++++
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 1x UV 150/h	11	1 320	6.21	
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 2x UV 150/h	11	1 320	6.21	
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 3x UV 150/h	11	1 320	6.70	++++
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 1x UV 75/h	11	1:320	6.21	
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 2x UV 75/h	11	1 320	6.21	
RRV F07-31 Harvest+ Formalin 3x UV 75/h	11	1:320	6.21	-
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 1x UV 300/h	10	1:320	6.71	++++
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 2x UV 300/h	10	1:320	6.71	++++
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 3x UV 300/h	10	1 320	6.82	++++
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 4x UV 300/h	10	1:320	2.82	+
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 5x UV 300/h	10	1:320	0.21	
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 6x UV 300/h	10	1:640	0.21	
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 7x UV 300/h	10	1:320	0.21	-
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 8x UV 300/h	10	1:320	0.21	
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 9x UV 300/h	10	1:320	0.21	
RRV F07-31 Harvest+Formalin Diafiltrated 10x UV 300/h	10	1:320	0.21	

W/O 20MS/18000

29

PCT/EP20MS006591

(E) Efficacy of Double Inactivated RRV Candidate Vaccine Preparations**Effective Dose (ED₅₀), Protective Dose (PD₅₀) and ELISA Titers in Immunized Mice**

[072] A formalin-inactivated and a double-inactivated (formalin + UV-irradiation) RRV candidate vaccine was adjusted to 10 µg per dose, and then diluted in 4 fold steps. Each dilution was injected into a group of 10 mice. After 3 weeks the mice were boosted with the corresponding amount of the vaccine. Blood samples were drawn at week 3, before the booster, and at week 6, 3 weeks after the booster. The sera were analyzed by a RRV antibody ELISA. The effective dose 50 (ED₅₀), this is the antigen dose which is sufficient to induce seroconversion in 50% of the immunized mice, was then calculated.

[073] At week 3, before the booster, the ED₅₀ of the formalin-inactivated group was 635 ng and of the group with the formalin and UV double inactivation 202 ng. After the booster, the ED₅₀ values were 33 ng and 10 ng, respectively. The analysis of the ELISA titers, however, demonstrated that the group with the double inactivation had even higher antibody titers, for example at week 3, 9 mice with an ELISA titer of 1,000 against 16 mice with 1,000 in the double inactivation group, and no mouse with 10,000 in the formalin group against 4 mice with 10,000 in the double inactivation group. After the booster, again the titers of the double inactivation group were higher: 8 mice in the formalin group compared to 11 mice in the double inactivation group with 100,000, and additional 4 mice with an ELISA titer of 1 million in the double inactivation group (Table 11).

[074] At week 6, 3 weeks after the booster, the mice were infected intravenously with 10⁶ TCID₅₀/ml (tissue culture infective dose 50) of live Ross River Virus (strain T48). At day 1, 2, 3 and 4 p.i. blood samples were taken and the TCID₅₀ of the serum was subsequently determined. The protective dose 50 (PD₅₀), this is the antigen dose at which 50% of the infected mice showed no viremia, was calculated. The PD₅₀ of 78 ng was identical for both antigen preparations, the formalin-inactivated as well as the double-inactivated (formalin + UV-irradiation) antigen.

46

- 31 -

Table 11

Effective Dose (ED₅₀), Protective Dose (PD₅₀) and ELISA Titers in Immunized Mice.

ED₅₀			PD₅₀
Inactivation	Week 3	Week 6 (Booster)	Week 6
Formalin	635 ng	33 ng	78 ng
Formalin + UV	202 ng	10 ng	78 ng

ELISA-Titer

Week	Inact.	<10¹	10¹	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶	10⁷	10⁸	N
3	Form.	35	8	8	9	0	0	0	0	0	60
	Form. + UV	27	7	6	16	4	0	0	0	0	60
6	Form.	14	7	5	15	11	8	0	0	0	60
	Form. + UV	8	7	9	7	14	11	4	0	0	60

[075] The residual infectivity found primarily in the very sensitive C6-36 cell line after formalin treatment alone, is most probably caused by infectious RRV RNA. The introduction of a second additional virus inactivation step (UV-irradiation), affecting the genome of the virus after the formalin treatment, resulted in fully inactivated and safe RRV candidate vaccine preparations without affecting immunogenicity and efficacy in a mouse model.

Claims

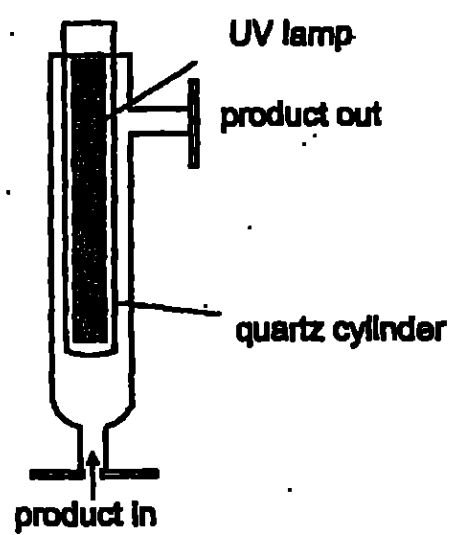
1. A method for inactivating a virus contained in a sample, comprising the steps of (i) treating the sample with an effective concentration of formalin, and (ii) subjecting the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus, wherein step (i) is performed prior to step (ii) or vice versa, wherein the flow rate of the sample through the apparatus is from about 50 litres per hour to about 1000 litres per hour.
2. A method for inactivating an enveloped virus contained in a sample, comprising the steps of (i) treating the sample with an effective concentration of formalin, and (ii) subjecting the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus, wherein step (i) is performed prior to step (ii) or vice versa, wherein the enveloped virus is wholly inactivated.
3. A method for inactivating an enveloped RNA virus contained in a sample, comprising the steps of (i) treating the sample with an effective concentration of formalin, and (ii) subjecting the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus, wherein step (i) is performed prior to step (ii) or vice versa, wherein the enveloped virus is wholly inactivated.
4. A method for inactivating a virus contained in a sample, comprising the steps of (i) treating the sample with an effective concentration of formalin, and (ii) subjecting the sample with an effective dose of UV light in a flow-through apparatus comprising a UV lamp and a thin layer chamber in the apparatus that is substantially perpendicular to the diameter of the UV lamp, wherein step (i) is performed prior to step (ii) or vice versa, wherein the sample is passed through the thin layer chamber of the apparatus in step (ii).

5. The method of any of claims 1 to 4, wherein the virus titer reduction due to the inactivation of the virus in the sample is at least about 1×10^5 , or at least about 1×10^7 , or at least about 1×10^{10} , or at least about 1×10^{14} .
6. The method of any of claims 1 to 5, wherein the step of treating the sample with an effective concentration of formalin is carried out for about 12 to about 96 hours.
7. The method of any of claims 1 to 6, wherein the effective concentration of formalin is about 0.01 to about 0.1%.
8. The method of any of claims 1 to 7, wherein the UV light is UVC with a wavelength of about 100 to about 280 nm.
9. The method of any of claims 1 to 8, wherein the dose of UV light is about 5 to about 200 mJ/cm^2 .
10. The method of any of claims 1 to 9, wherein the contact time of the sample with the UV light is about 1 to about 20 seconds.
11. The method of any of claims 1 to 10, wherein the flow-rate in the flow-through apparatus is about 50 to about 1000 liter per hour.
12. The method of any of claims 1 to 11, wherein the flow-through apparatus contains a thin layer chamber.
13. The method of any of claims 1 to 12, wherein the flow of the sample through the thin layer chamber is turbid.
14. The method of claim 12 or 13, wherein the thin layer of the thin layer chamber has a thickness of about 1 mm.

15. The method of any of claims 1 to 14, wherein the step of subjecting the sample to an effective dose of UV light in a flow-through apparatus is repeated for about 2 to about 10 times.
16. The method of any of claims 1 to 15, wherein the sample is selected from the group consisting of biological fluids or solutions originating from a cell culture process for preparing biological, medical, or pharmaceutical products.
17. The method of any of claims 1 to 16 further comprising the step of subjecting the sample to a purification step to remove residual formalin in the sample.
18. The method of any of claims 1 to 17 further comprising purifying the inactivated virus in the sample to pharmaceutical purity, and formulating the purified inactivated virus into a pharmaceutical composition for use as a vaccine.

~~50~~
50

1/3

**Figure 1**

51

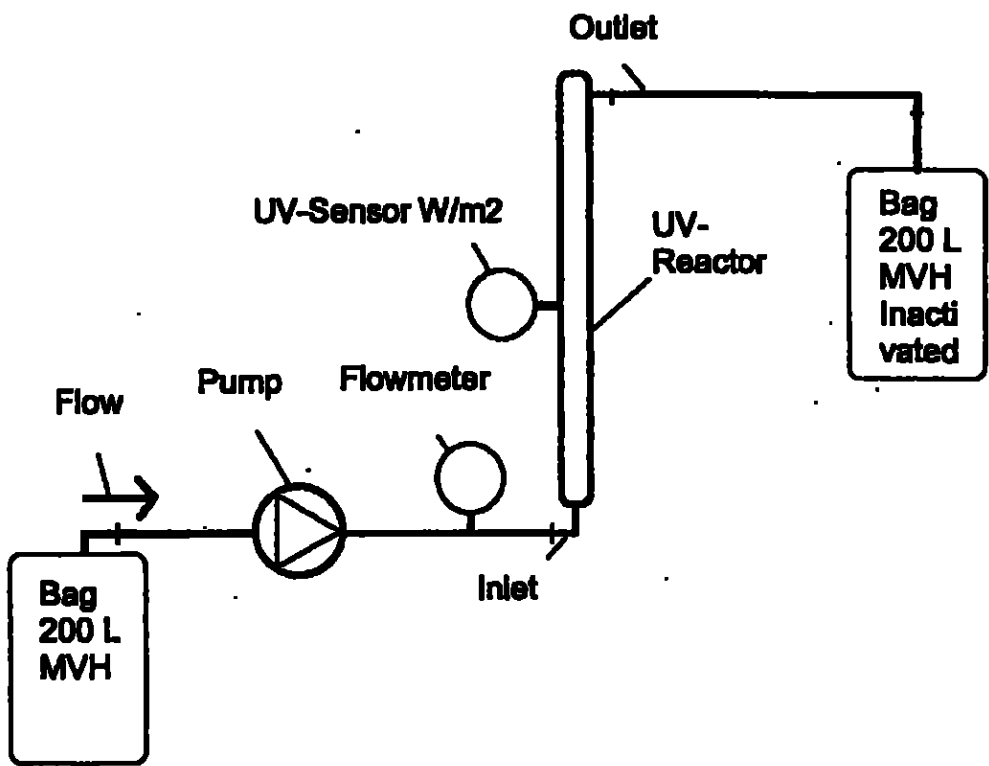


Figure 2

32

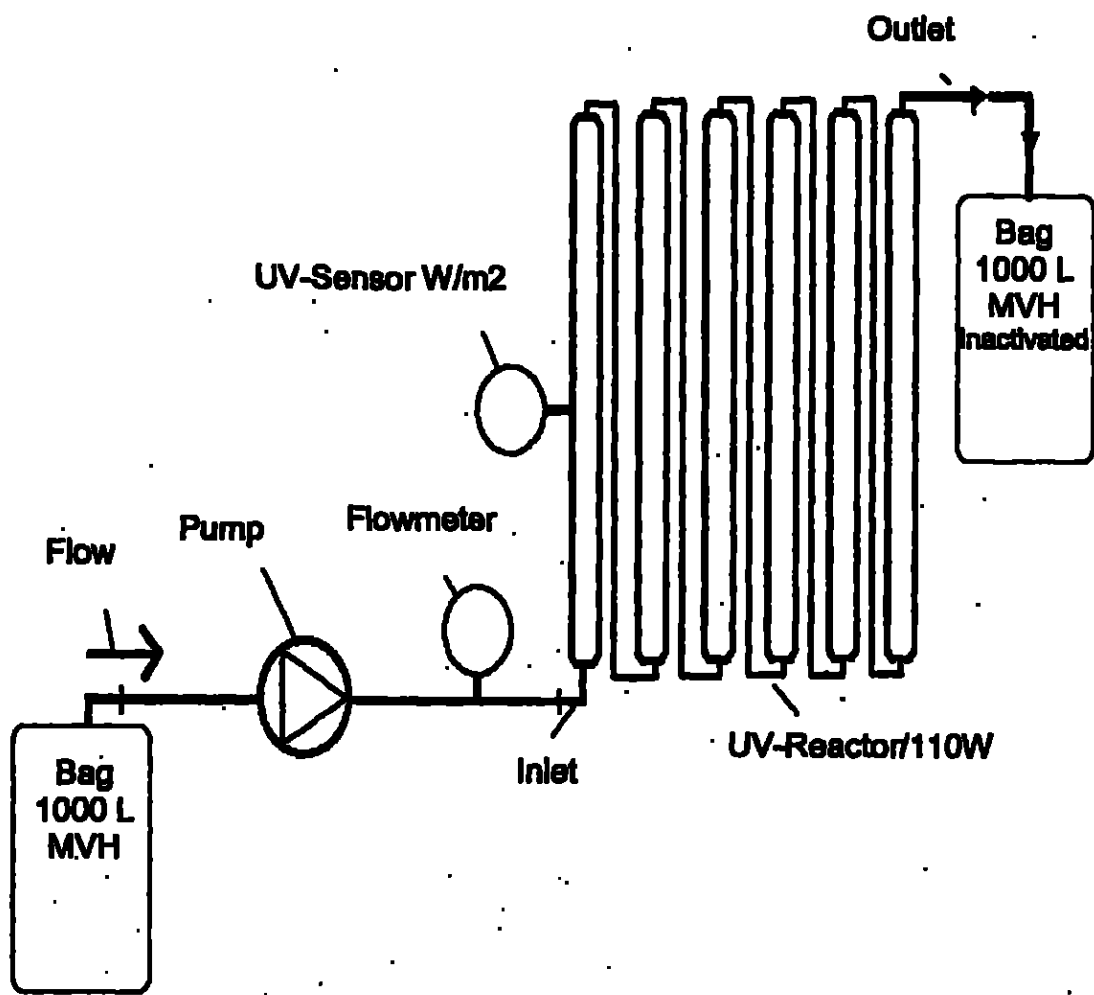


Figure 3

**INACTIVACIÓN DE UN PATÓGENO EN UNA MUESTRA MEDIANTE UN
TRATAMIENTO CON FORMALINA Y LUZ UV**

CAMPO DE LA INVENCION

[001] la presente invención se relaciona con un método para inactivar virus al tratar una muestra que contiene virus, con una concentración efectiva de formalina y al tratar la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato a través de flujo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[002]. La inactivación efectiva de patógenos en productos médicos ha sido una preocupación de salud pública desde que se descubrió que las enfermedades previamente conocidas se podrían esparcir rápidamente a través de la administración de terapias. Por lo tanto, los productos biotecnológicos están llegando bajo en los estándares crecientemente exigentes destinados a disminuir el riesgo de transmitir agentes por su uso. Los contaminantes potenciales no solamente son un problema en la elaboración de los productos de la sangre sino también en la producción de vacunas seguras

[003] Una de las etapas más críticas en la producción de vacunas contra patógenos en particular vacunas virales, es la inactivación viral. En el caso de la inactivación de virus, la formalina es el agente inactivante más frecuentemente utilizado en la elaboración de vacunas. La etapa de inactivación de formalina se ha validado con procedimientos analíticos establecidos. Sin embargo, la introducción de ensayos de control de calidad altamente exigentes tal como los ensayos de

84
54

cultivo en células de mamífero, por ejemplo, el ensayo de seguridad Vero, ha demostrado evidencia de infectividad residual en algunos casos. En un esfuerzo por eliminar esta irrupción mecánica de infectividad residual de agregados y/o filtración se cambio a ser no exitosa.

[004] Como una alternativa al tratamiento con formalina, la inactivación UV se ha considerado para la integración en el proceso de elaboración. El uso de inactivación por irradiación ultravioleta para vacunas humanas ha sido demostrado anteriormente. Milzer et al. (Am. J. Pub. Health (1954) 44: 26-33) y Wolf et al. (JAMA (1958) 161: 775-81) Han reportado sobre inmunogenicidad de resultados en estudios en humanos donde ellos utilizaron vacuna de poliomielitis inactivada con UV. El poliovirus es un picomavirus descubierto, con un genoma de ADN de hebra simple positiva en un cemento simple. Como el genoma viral es más susceptible a daño por UV que los antígenos de superficie viral, en el caso de proteínas de cápsido viral te de polio, la inactivación con UV ha mostrado que tiene poco efecto negativo sobre las características bioquímicas o la inmunogenicidad del producto. Los blancos para la inactivación UV son principalmente los ácidos nucleicos en contraste a las proteínas que son el blanco de la formalina. Al combinar la inactivación con formalina y UV, los científicos ensayaron solucionar las limitaciones de la inactivación con UV o la inactivación con formalina aislada, respectivamente, cuando se inactivaban los poliovirus particularmente resistentes. Ver, por ejemplo, Malean, et al., "Experiences in the Production of Poliovirus Vaccines", *Prog. Med. Virol.*, vol 1, pp. 122-164 (1958).

[005] Las tecnologías con radiación UV tienen un amplio rango de aplicación e la industria de alimentos, farmacéuticos, de cosméticos y bebidas, y del agua de bebida. La desinfección con UV es un proceso físico químico, en

donde los enlaces covalentes de las moléculas cíclicas de las bases de purina y pirimidina son irumpidas por la energía de excitación de la radiación con longitud de onda UV, dañando los ácidos nucleicos y la información genética que ellos codifican. Los microorganismos tales como las bacterias y las levaduras, etc., así como también los virus que son expuestos a radiación UVC efectiva (100 a 280 nm) son inactivados en segundos. Consecuentemente, la desinfección exitosa depende de la dosis de irradiación equivalente para la reducción. La dosis de irradiación microbiana media expresada en J/m² se mide en la zona de irradiación utilizando un biodosímetro. Sin embargo, la inactivación UV sola no es Adecuada para producir vacunas seguras y efectivas.

[006] Taylor et al. (J. Immunol. (1957) 79: 265-75) describe la inactivación de virus de poliomielitis con una combinación de formalina y ultravioleta. Molner et al. (Am. J. Pub. Health (1958) 48: 590-8) describe la formación de un nivel medible de anticuerpo circulante en la sangre de sujetos vacunados con vacuna de poliomielitis inactivada con ultravioleta-formalina Trufelli et al. (Appl. Microbiol. (1967) 15: 516-27) reportan sobre la inactivación de Adenovirus y la Tumorigenicidad de Virus 40 de Simio en Hámster mediante un proceso de inactivación de tres etapas que consiste de formalina, luz UV y β-propiolactona. Miyamae (Microbiol. Immunol. (1986) 30: 213-23) describe la preparación de inmunógenos de virus Sendai mediante el tratamiento con rayos UV y formalina. Ninguno de los conceptos descritos anteriormente ha sido adoptado nunca para uso general en producción de vacunas, aunque ha existido siempre la necesidad latente de producción de vacunas seguras y eficaces a escala industrial. Además, ninguno de los estudios citados empleó un ensayo de seguridad para determinar la infectividad residual de los "virus inactivados" que es tan sensible como el ensayo de seguridad Vero utilizado en los estudios presentes.

[007] Sorprendentemente, los inventores han encontrado que una combinación de etapas de inactivación con formalina y UV se puede utilizar para inactivar completamente los virus en una producción de virus en masa en un sistema con rendimiento de alto volumen para la elaboración de virus inactivados para preparación de vacunas a una escala industrial. Esto también se ha mostrado con una preparación viral concentrada de alto título como la utilizada en los ejemplos, donde ninguna actividad viral residual se detectó utilizando el muy sensible ensayo de cultivo de célula Vero. Los inventores han demostrado de manera sorprendente que este método trabaja particularmente bien para virus recubiertos, tales como los ortomixovirus, comparado con los virus no recubiertos, tal como el picornavirus de polio. Este descubrimiento tiene implicaciones importantes para la producción de vacunas seguras altamente inmunogénicas para enfermedades virales emergentes que rápidamente cambiantes tales como las sepas de influenza interpandémica y pandémica.

RESUMEN DE LA INVENCION

[008] Es un objeto de la presente invención suministrar un método que permita una inactivación altamente eficiente y segura de un virus contenido en una muestra aunque reteniendo una antigenicidad e inmunogenicidad altas del virus inactivado. Particularmente, el método de la presente invención utiliza una etapa de inactivación con formalina en concepto con una etapa de inactivación UV en un sistema de rendimiento de alto volumen para producir una preparación viral en masa segura con contenido de antígeno alto para uso en elaboración de vacuna.

57

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[009] De acuerdo con un aspecto de la invención, el objeto se resuelve al suministrar un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra a una dosis efectiva de luz UV en un aparato a través del flujo, en donde la etapa (1) se desarrolla antes de la etapa (ii) o viceversa. Preferiblemente, la tasa de flujo de la muestra a través del aparato es de aproximadamente 50 litros por hora a aproximadamente 1000 litros por hora.

[010] En otro aspecto preferido del método para inactivar el virus para a ser inactivado es un virus recubierto o un virus ARN recubierto, respectivamente, y el virus recubierto o el virus ARN recubierto respectivamente, es completamente inactivado.

[011] De acuerdo con otro aspecto se suministra un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva del uso UV en un aparato a través del flujo que comprende una lámpara UV y una cámara de capa delgada en el aparato que es adecuadamente perpendicular al diámetro de la lámpara UV, en donde la etapa (i) se desarrolla antes de la etapa (ii) o viceversa, o en donde la muestra es pasada a través de una cámara de capa del aparato en la etapa (ii).

[012] En una modalidad preferida de la invención la muestra es tratada con una dosis efectiva de luz UV en un aparato a través de flujo después de que esta ha sido tratada con una concentración adecuada de formalina. Aunque los

inventores no están ligados por ninguna teoría, se cree que los efectos reticulantes de la formalina sobre las moléculas de superficie del virión estabilizan el virus para los rigores de las dinámicas de fluido de alto volumen del aparato de flujo pasante para el alcohol y la activación UV.

[013] El método de inactivación de acuerdo con la invención es efectivo y seguro como se ha demostrado en el ejemplo 2 y 4 (A). Más aún, el método para inactivar permite producir vacunas con alta antigenicidad e inmunogenicidad que eliciten una respuesta inmune protectora como se muestra en el ejemplo 4 (B).

[014] El término "muestra" como se utiliza aquí e incluye cualquier muestra que contiene un patógeno o una parte de este tal como cualquier fluido, por ejemplo, fluidos biológicos o soluciones que se originen de un proceso de cultivo de células para prepara productos biológicos, médicos, o farmacéuticos tales como productos o vacunas de sangre. Esta puede ser una muestra que comprende un fluido biológico, tal como sangre o plasma. También puede ser un fluido que contiene componentes cosechados de un cultivo de célula (por ejemplo célula o fracción de medio de célula de cultivo). En una modalidad preferida la muestra es un fluido utilizado en la elaboración de un agente terapéutico por ejemplo en la producción e una vacuna, en la cual el virus inactivado o una porción de este es el agente terapéutico. En modalidades particularmente preferidas, los componentes de célula son separados de la muestra antes del método de inactivación, por ejemplo mediante filtración o centrifugación.

[015] En una modalidad preferida de la presente solicitud, el virus es producido de una cosecha de un cultivo de célula, que consiste del sobrenadante y las células, que es además utilizado para la preparación de un producto médico,

por ejemplo, una vacuna. En una modalidad adicional de la presente invención las células de dicho cultivo de células han sido infectadas con el patógeno. Las células pueden ser células primarias o cualquier línea de célula cultivada adecuada para producir el virus. Ejemplos de células que se pueden utilizar incluyen células de mamífero (por ejemplo células CHO, BHK, VERO, HELA), células de ave (por ejemplo fibroblastos de embriones de pollo, o líneas de células continua de un ave) y células de insecto (por ejemplo células Sf9). En modalidades preferidas de la invención, las células y los desechos de célula provenientes de la producción del cultivo de célula de la masa viral son separados de la masa viral antes de la etapa de inactivación química (formalina) y/o la etapa de inactivación con radiación UV.

[016] En la presente invención, los virus a ser inactivados son virus ADN o ARN, recubiertos o descubiertos, con genomas de hebra simple o doble (ADN), consentido o contrasentido, continuos o segmentados. Los virus se pueden seleccionar del grupo que consiste de baculovirus, poxvirus, adenovirus, papovavirus, parvovirus, hepadnavirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, astrovirus, picornavirus, retrovirus, ortomixovirus, filovirus, paramixovirus, rabdovirus, arenavirus, y buniavirus. En modalidades preferidas de la invención, los virus son seleccionados del grupo de virus recubiertos, que incluyen, flavivirus, togavirus, retrovirus, coronavirus, filovirus, rabdovirus, buniavirus, ortomixovirus, paramixovirus, arenavirus, hepadnavirus, herpesvirus, y poxvirus. Como se demostró en el ejemplo 6 y 7. Los métodos de inactivación de la invención son particularmente efectivos sobre los virus recubiertos tales como los virus de influenza y Ross River, comparados con los del polio no recubiertos o los adenovirus. En otras modalidades preferidas de la invención, los virus se seleccionan del grupo de virus ARN recubiertos, que incluyen, flavivirus, togavirus,

retrovirus, coronavirus, filovirus, rabdovirus, bunyavirus, ortomixovirus, paramixovirus, y arenavirus. En una modalidad particularmente preferida, los virus se seleccionan de los ortomixovirus, por ejemplo, una sepa de virus de influenza. Las sepas de virus de influenza pueden tener combinaciones variantes de proteínas de superficie de hemaglutinina y neuraminidasa. En otro ejemplo particularmente preferido, el virus se selecciona del togavirus, por ejemplo un alfavirus tal como el Virus Ross River (RRV). Otro grupo preferido de virus para uso como solución viral en masa son los coronavirus, que incluyen los virus asociados con síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Otro grupo de virus preferidos son los flavivirus, que incluyen el virus de Encefalitis Japonesa, el de encefalitis producida por garrapata (TBE), virus de la fiebre del Dengue, virus de la fiebre amarilla, y virus de la fiebre hemorrágica. Otro grupo preferido de virus son los poxvirus, que incluyen ortopoxvirus (tal como los virus vacunales o los virus Ankara vacunales), y avipoxvirus.

[017] Partes de un patógeno viral inactivado también están comprendidos por la presente invención. En una modalidad preferida de la presente solicitud dichas partes pueden servir como un epítipo en un inmunógeno. Este epítipo se puede utilizar para elicitación de una respuesta inmune contra el patógeno. En una modalidad preferida de la presente solicitud las partes de un patógeno son utilizadas como una vacuna contra el patógeno. En una modalidad especialmente preferida dichas partes de un patógeno son viriones fraccionados, que pueden ser inactivados antes o después de ser fraccionados.

[018] Dentro del alcance de la presente invención el método de inactivar de acuerdo con la invención es considerado seguro, o completamente inactivado, cuando el virus inactivado producido utilizando el método pasa un ensayo de

cultivo de célula de mamífero, por ejemplo, el ensayo de seguridad descrito en detalle en el ejemplo 2. Como demostraron estos ensayos son más sensibles que otros ensayos utilizados, por ejemplo, el ensayo de huevo. Los criterios preferidos de pasar/fallar del ensayo de seguridad son detallados en el ejemplo 1 y 2.

[019] En una modalidad preferida de la presente solicitud la reducción del título del virus debido a la inactivación del virus en la muestra es al menos aproximadamente 1×10^5 , en una modalidad más preferida, al menos aproximadamente 1×10^7 en una modalidad más preferida al menos aproximadamente 1×10^{10} , y en una modalidad más preferida al menos aproximadamente 1×10^{14} .

[020] En una modalidad preferida de la presente invención la muestra se trata con una concentración efectiva de formalina durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas. En modalidades más preferidas, la muestra se trata con una concentración efectiva de formalina durante aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas, y más preferiblemente durante aproximadamente 24 a aproximadamente 30 horas.

[021] En una modalidad especialmente preferida de la presente invención, la muestra se trata con una concentración efectiva de formalina durante aproximadamente 24 a aproximadamente 24.5 horas.

[022] En una modalidad adicional la etapa de tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina es llevada a cabo a aproximadamente 10 a aproximadamente 40°C. En una modalidad especialmente preferida de la presente

solicitud la etapa de tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina se lleva a cabo a aproximadamente 32°C.

[023] una modalidad preferida de la presente invención incluye el tratamiento d la muestra con una concentración efectiva de formalina, donde la concentración efectiva de formalina varía preferiblemente desde aproximadamente 0.01% a a aproximadamente 1% (p/p), preferiblemente de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.1% más preferiblemente entre aproximadamente 0.025% y aproximadamente 0.01% que corresponde a aproximadamente 92 mg/l y aproximadamente 368 mg/l de formalina respectivamente cuando se utiliza una solución de formalina al 37% para ajustar la concentración efectiva.

[024] En la presente solicitud el término "luz UV" significa radiación ultravioleta que tiene una longitud de onda de 100 a 400 nm. La luz UV se puede seleccionar del grupo que consiste de UVC (100 a 280 nm), UVB (280 a 320 nm), y UVA (320 a 400 nm). Los agentes fotosensibilizantes como aquellos que se intercalan en el ADN y son inactivados por la luz UV, por ejemplo psoralenos, se pueden utilizar para mejorar el efecto inactivante de la radiación UV. En una modalidad preferida de la presente invención la luz UV es UVC que tiene una longitud de onda de aproximadamente 100 a aproximadamente 280 nm. En una modalidad preferida de la presente invención la luz UV tiene una longitud de onda de aproximadamente 240 a aproximadamente 290 nm. En una modalidad especialmente preferida de la presente invención aproximadamente el 85% o más de la luz UV tiene una longitud de onda de aproximadamente 254 nm.

[025] La emisión de luz UV puede ser una forma continua de emisión de luz UV, por ejemplo tecnología de lámpara de mercurio, o luz UV pulsada, por

ejemplo tecnología láser monocromática. La Intensidad UV deseada se puede generar al combinar 2 o más lámparas. En una modalidad preferida la luz UV es emitida continuamente por una lámpara de aproximadamente 110 W. En una modalidad preferida ilustrada en los ejemplos, la lámpara UV tiene una longitud de aproximadamente 1 metro, y como la lámpara utilizada en los ejemplos (950 mm).

[026] La materia objeto de la invención comprende cualquier dosis efectiva de luz UV, es decir cualquier dosis de luz UV que inactive de manera segura un virus dado cuando se combina con un tratamiento de formalina como se describió anteriormente. La dosis efectiva puede depender de una variedad de factores que son generalmente conocidos en el campo, por ejemplo, los parámetros físicos de las cámaras de inactivación UV, tal como el tamaño y el diámetro de la lámpara y la cámara, la distancia entre el medio que contiene virus y la fuente de luz UV, la absorción de luz y las propiedades de reflexión del material de la cámara. Por la misma razón, la longitud de onda y la intensidad de la luz UVC así como también el tiempo de contacto a que es expuesto el virus a la luz UV es bien crítico para la dosis efectiva. Adicionalmente, la dosis efectiva es también influenciada por el virus mismo, el medio que contiene el virus y sus propiedades de absorción de luz. Preferiblemente, la dosis efectiva es suficiente para matar al menos 99.99% de los virus contenidos en la muestra, más preferiblemente inactivar el virus a un nivel donde ningún virus activo es detectado en un ensayo de cultivo de célula de mamífero, preferiblemente el ensayo de acuerdo al Ejemplo 2, o completamente inactivado. En una modalidad preferida que utiliza luz UVC una muestra que contiene el virus es expuesta a una dosis efectiva que varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mJ/cm². En una modalidad preferida la dosis efectiva está en el rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mJ/cm², y en otras modalidades preferidas la dosis efectiva en el rango de

aproximadamente 40 a aproximadamente 90 mJ/cm². Como una comparación, la dosis efectiva para matar 99.99% de los patógenos presentes en el agua de bebida es de aproximadamente ≥ 40 mJ/cm². En una modalidad preferida, la dosis efectiva reduce un título de virus inicial en 1×10^5 . En inactivación de vacuna en masa, la dosis efectiva debe ser suficiente para eliminar cualquier virus vivo residual que pueda estar presente después de la etapa de inactivación química inicial (formalina). Como se ilustró en los ejemplos, esto se puede determinar mediante ensayos de infección de cultivo de célula de mamíferos muy sensibles, tales como el ensayo de cultivo de célula vero descrito.

[027] Modalidades adicionales preferidas de la invención y en particular la cámara de luz UV se suministran en los ejemplos.

[028] En una modalidad preferida adicional de la presente invención el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV está en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 segundos, preferiblemente de aproximadamente 1.4 a aproximadamente 14 segundos. El tiempo de contacto se calcula preferiblemente con base en una muestra que es de aproximadamente 1 mm de gruesa a lo largo de la tangente a la fuente de luz, y el wattage de la lámpara UV de aproximadamente 110 W. Como un experto en la técnica lo apreciará, la muestra más gruesa las fuentes de luz con profundidades de muestras más gruesas y energía menor (wattage) incrementaría el tiempo de exposición y viceversa. En una modalidad más preferida de la presente solicitud el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV es de aproximadamente 1.4 a aproximadamente 7 segundos y en una modalidad especialmente preferida de la presente solicitud el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV es de aproximadamente 2.8 a aproximadamente 4.2 segundos.

[029] Con el fin de ensayar si una configuración dada del método de acuerdo con la invención que emplea una dosis de luz UV dada inactiva efectivamente un patógeno de acuerdo con la invención, se debe ensayar el virus inactivado para actividad viral residual. Esto se puede lograr al utilizar un ensato d cultivo con célula de mamífero, por ejemplo el ensayo de seguridad Vero aplicando preferiblemente los criterios detallados en los Ejemplos 1 y 2.

[030] De acuerdo con la presente invención el tratamiento de la muestra con una dosis efectiva de luz UV se lleva a cabo en un aparato de flujo pasante, preferiblemente como se especifica en la Tabla 1 y en la Figura 1.

[031] En una modalidad preferida de la presente invención el aparato de flujo pasante contiene una cámara de capa delgada. El grosor mínimo de la cámara debe permitir flujo suficiente de la solución viral de masa para permitir el procesamiento rápido razonable, y para evitar la irrupción del virus para las vacunas de virus inactivadas completas. Así, preferiblemente, la capa delgada es al menos de aproximadamente 0.1mm de gruesa para la producción de los virus inactivados completos. También, debido a la absorbancia de la radiación UV mediante la solución viral en masa, y la necesidad de asegurar suficiente irradiación de todos los virus en la solución, el grosor máximo no debe permitir que ningún virión pase a través del aparato sin ser suficientemente irradiado. Así, la capa delgada no debe ser más gruesa de aproximadamente 1 cm de grueso. La capa delgada es preferiblemente de 0.5 mm a 3 mm de grueso, y más preferiblemente aproximadamente 1 mm de tal forma que la distancia máxima entre la lámpara UV y el patógeno a ser inactivado es de menos de aproximadamente 1 mm. Alternativamente, la muestra puede pasar a través de

b6

una lámpara paralela a la longitud de la lámpara, de tal forma que la muestra se irradia desde el diámetro exterior, en lugar del diámetro interior, de la cámara de la muestra, similarmente, una lámpara dentro de una cámara de muestra dentro de una lámpara (o círculo de lámpara) se podría utilizar como una configuración, irradiando la cámara de muestra tanto desde los diámetros interno como externo. Además, la cámara es preferiblemente diseñada de tal forma que el flujo de la muestra a través de la cámara no es estrictamente laminar, sino que en su lugar es turbio. Esto ayudará a mezclar el virus a través del medio de la muestra, asegurando a un la exposición a la radiación UV.

[032] En otra modalidad preferida de la presente solicitud el aparato de flujo pasante contiene una cámara de inactivación UV, en donde la lámpara UV tiene un diámetro de aproximadamente 30 mm y la cámara que circunda la lámpara UV a través de la cual la muestra fluye tiene un diámetro de aproximadamente 32 mm. En una modalidad preferida de la presente solicitud la cámara tiene un volumen total de aproximadamente 92 ml.

[033] La muestra a ser irradiada se puede pasar a través del aparato. En una modalidad preferida la muestra es enfriada aunque pasando la cámara de irradiación UV. En una modalidad preferida adicional de la presente invención la muestra que pasa la cámara de irradiación UV tiene una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 32°C, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8°C.

[034] preferiblemente, la tasa de flujo en la muestra en el aparato de flujo pasante está en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 litro por hora. Más preferiblemente aproximadamente 230 a aproximadamente 480

litros. En una modalidad especialmente preferida la tasa reflujo de las muestras en el aparato de flujo está en el rango de aproximadamente 230 a aproximadamente 250 litros por hora, más preferiblemente aproximadamente 240 litros por hora. Estas tasas de flujo preferidas, ejemplificadas en los ejemplos, permiten el procesamiento UV económico a gran escala de la solución viral en masa.

[035] En una modalidad preferida, el tiempo de contacto depende de la longitud de la cámara de muestra en la cual la muestra se expone a la radiación UV, y la tasa de flujo de la muestra a través de la cámara. Así, la dosis efectiva puede ser simplemente ajustada al incrementar el número de lámparas UV dispuestas en el aparato de flujo pasante, incrementando la longitud efectiva de la cámara de muestra expuesta a la radiación UV. Alternativamente, utilizando el mismo número de cámaras con lámparas más largas se incrementará la dosis efectiva, como utilizando un número mayor de cámaras con lámparas más cortas puede ser equivalente a la misma dosis efectiva.

[036] En una modalidad preferida adicional de la presente solicitud la etapa de someter la muestra a una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante se repite de una manera cíclica o serial. Esto se puede repetir durante aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces. En una modalidad preferida de la presente solicitud la etapa de someter la muestra a una dosis efectiva del uso UV de en un aparato de flujo pasante se repite durante aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces en una modalidad más preferida de la presente solicitud esta se repite durante aproximadamente 2 a aproximadamente 3 veces. Un beneficio agregado para utilizar cámaras con lámparas múltiples en serie o flujo recirculado a través de la misma lámpara, es que la muestra puede ser más

completa mente mezclada entre las cámaras o ciclos para asegurar aún la exposición del virus a la radiación UV.

[037] Después de que el virus en la muestra ha sido inactivado, el virus inactivado puede ser entonces purificado para uso en varias aplicaciones, que incluyen vacuna y otras composiciones farmacéuticas. De acuerdo con otra modalidad preferida de la invención, el método de inactivación comprende además la etapa de purificar el virus inactivado en la muestra para purificar hasta pureza farmacéutica formulando el virus purificado en una composición farmacéutica para ser utilizada como una vacuna. La purificación se puede lograr por medios conocidos en el arte, que incluyen pero no está limitado a, filtración o diafiltración, cromatografía (por ejemplo) exclusión de tamaño, intercambio de ión, inmuno afinidad, y similares), o centrifugación. Alternativamente, el virus se puede purificar antes de la inactivación mediante los métodos de la invención.

[038] De acuerdo con otra modalidad preferida de la invención, el método de inactivación comprende además una etapa de purificación, es decir, la muestra es sometida a una etapa de purificación para remover la formalina residual en la muestra. Tal purificación es útil si los niveles de formalina permanecen los cuales son mayores que los niveles farmacéuticamente aceptables. El virus inactivado, después de las etapas de la purificación opcionales, pueden ser entonces formulados en una composición farmacéutica. Las formulaciones pueden opcionalmente incluir vehículos (por ejemplo solución salina fisiológica o amortiguadores), excipientes estabilizadores (por ejemplo albúmina, sacáridos, y/o aminoácidos), sales, y/o adyuvantes (por ejemplo alumbre). Alternativamente, el virus inactivado puede ser además modificado para uso farmacéutico, por ejemplo, mediante encapsulación en liposomas.

[039] La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin ninguna limitación a estos. Habiendo descrito la invención en detalle, será evidente que son posibles modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención definida en las reivindicaciones finales.

FIGURAS

[040] La Figura 1 muestra una cámara de capa delgada UV que se puede utilizar para la etapa de inactivación UV de la presente invención

[041] La Figura 2 muestra un sistema de inactivación UV equipado con un sensor UV. El sensor UV y el fluómetro son características opcionales. En una modalidad adicional de la presente solicitud de una bomba y/o el fluómetro se puede instalar en el tubo de salida.

[042] La Figura 3 muestra un sistema de inactivación que utiliza varias cámaras de capa delgada UV (reactor UV) conectadas una a la otra para sometimiento repetido de la muestra a una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante. El número de cámaras de capa delgada UV puede variar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10. El sensor UV y el fluómetro son características opcionales. En una modalidad adicional de la presente solicitud la bomba y/o el fluómetro se pueden instalar en el tubo de salida. Un generador UV continuo con cámaras de inactivación conectadas en serie se pueden utilizar en un proceso de elaboración a gran escala, permitiendo así el alto rendimiento de una muestra.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Principio de ensayo de seguridad de huevo estándar.

[043] Un ensayo de seguridad de huevo estándar se utilizó para ensayar la efectividad residual de las tapas de influenza inactivadas. Un producto en masa monovalente, es decir, un antígeno de virus purificado después de la centrifugación con gradiente de sucrosa y ultra-filtración, se inyecta en 10 huevos (0.2) ml/huevos. Después de incubar durante 3 días a 32°C los huevos son cosechados, agrupados, y de nuevo inyectados en 10 huevos (0.2 ml/huevos). Después de otra etapa de incubación durante 3 días a 32°C, los huevos son cosechados, agrupados, y ensayados para hemaglutinina (ha).

[044] El ensayo HA está basado en el hecho de que los virus de influenza pueden unir eritrocitos y utilizan su hemaglutinina de proteína de superficie. El ensayo es llevado a cabo en un ambiente estéril. Una suspensión de los virus de influenza con un título HA definido sirve como control positivo y una solución de NaCl a 0.9% sirve como un control negativo. 50 µl de dilución 1:2 en NaCl 0.05 de una muestra a ser ensayada son dados en un pozo de una placa de 96 pozos. A cada pozo se agregan 50 µl de una solución que contiene eritrocitos de pollo. Subsecuentemente, las placas son encubadas durante 30 a 45 minutos a temperatura ambiente. Luego la hemaglutinación es visualmente determinada, en donde, si 5 pozos que contienen la misma muestra no muestran ninguna hemaglutinación, la muestra pasa al ensayo HA.

Ejemplo 2: Principio del ensayo de seguridad Vero estándar.

[045] El ensayo de seguridad Vero estándar es un ensayo de calidad altamente exigente para la efectividad residual de sepas de influenza inactivadas.

71

El ensayo también es aplicable a otros virus. Un producto de masa monovalente, es decir, un antígeno de virus purificado después de la centrifugación con gradiente de sucrosa y la ultra diafiltración. Se agrega a recipientes 5 Roux (4 ml/recipiente). Después de incubar durante 7 días a 32°C en un medio de cultivo Vero, los cultivos de célula son cosechados, agrupados y agregados a recipientes 5 Roux (10 ml/recipiente). Después de otra etapa de incubación durante 7 días a 32°C, los cultivos de célula son concentrados, agrupados, y ensayados para hemaglutinina (HA) como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Inactivación de formalina.

[046] La primer etapa de inactivación con formalina es llevada a cabo en una cosecha e virus monovalente infeccioso libre de célula, es decir, una cosecha de bioreactor después de clarificación por vía de centrifugación. Después de la recolección a 30 a 34°C la cosecha de virus monovalente es tratada con aproximadamente 0.9 a aproximadamente 1.1 U/ml de Benzonasa a 30 a 34°C durante 4 a 8 horas. Luego ésta es tratada con ≤ 92 mg/l de formalina durante 24 a 24.5 horas a 32 ± 2 horas.

Ejemplo 4: Experimentos de inactivación con una lámpara UV de 65 vatios.

[047] Un número de experimentos de inactivación con virus inactivados con formalina son llevados a cabo utilizando una cámara de inactivación con una lámpara UV de 65 W y una cámara de capa delgada. Aunque la inactivación completa de la cosecha de virus monovalente se puede demostrar cuando se utilizan tazas de flujo de 100 litros por hora durante 3 ciclos, esta configuración no permitió la medición en línea de la señal UV. En medio de cultivo de célula Vero utilizado para producción de influenza contiene varios compuestos orgánicos que son responsables de la absorción de la señal UV. Por lo tanto, el sistema, está

72

equipado con una lámpara de 110 W que permite un monitoreo continuo de la señal UV durante el tratamiento de cosecha de virus monovalente.

Ejemplo 5: Experimentos de inactivación con una lámpara UV de 110 vatios.

[048] La cosecha Panamá de Influenza monovalente tratada con formalina se utiliza como un sustrato modelo para los estudios de inactivación. Para la inactivación continua con una tecnología UV de capa delgada se utilizó un sistema WEDECO VISA (Alemania) equipada con una lámpara VISA (110 W/4 V). La cámara de capa delgada UV es un dispositivo 1.4435 de acero inoxidable con un tubo de cuarzo de 30 mm de diámetro (cf. Tabla 1). Un sensor UV calibrado permite el control en línea de la señal UV. La cámara de capa delgada UV es operada a una tasa de flujo de 240 ± 10 litros por hora a temperatura ambiente. Las condiciones de la tasa de flujo son controladas mediante un fluómetro calibrado (cf. Figura 2).

Tabla 1
Características de la cámara de inactivación UV

Lámparas UV	110 w
Longitud de la lámpara	950 mm
Ø de la lámpara UV	30 mm
Ø diámetro de la cámara que circunda la lámpara UV	32 mm
Capa delgada	1 mm
Volumen total/cámara	92 ml
Tiempo de contacto/cámara	1.4 segundos.

[049] La cosecha monovalente se expone a ciclos de 10 UV. Después de Cada ciclo 20 litros de cosecha monovalente tratada con UV se renueven y se purifican adicionalmente mediante purificación con gradiente de sucrosa que utiliza condiciones de ultracentrifugación continua con un gradiente de sucrosa del 42% extendido en un Tris-amortiguador con 20 mm de Tris-amortiguador y una cosecha

73

monovalente purificada definida (PMVH) de 48% a 36% de sucrosa que utiliza una centrífuga CC40 Sorvall sin prerclarificador (Hitachi Kaki Co, LTD., Tokio, Japan).

Tabla 2

**Revisión de los procedimientos de ultracentrifugación de formalina e
Influenza Panama tratada con UV.**

Procedimientos de ultracentrifugación	Condiciones de Inactivación
UZ-INF-45-03	No UV
UZ-INF-48-03	240 l/hora, 1 ciclo
UZ-INF-52-03	240 l/hora, 2 ciclo
UZ-INF-51-03	240 l/hora, 3 ciclo
UZ-INF-50-03	240 l/hora, 4 ciclo
UZ-INF-49-03	240 l/hora, 5 ciclo
UZ-INF-58-03	240 l/hora, 7 ciclo
UZ-INF-57-03	240 l/hora, 10 ciclo

(A) Rendimiento y pureza de antígeno

[050] El rendimiento y la pureza del antígeno de influenza son comparados con base en el contenido de hemaglutinina (HA), proteína total y proteína Vero (proteína de célula huésped). El virus purificado se compara sobre la base de la proporción de HA/proteína, la proporción de proteína de célula huésped/HA y la seguridad del virus (cf. Tabla 3). Para todas las cosechas tratadas con UV no se detectó crecimiento viral. En contraste, los virus purificados derivados de procesos de inactivación con formalina estándar (sin radiación UV aplicada) se pueden amplificar en un cultivo de célula Vero. Aunque una reducción ligera en la proporción HA/proteína se puede ver después del ciclo 7 y 10, ninguna diferencia significativa de la formalina y el producto doble inactivado se detecta con respecto a la pureza del antígeno medida como HA/proteína y la proporción de proteína de célula huésped/HA.

74

Tabla 3

Virus Panama purificado con gradiente de sucrosa después de tratamiento con formalina y UV.

Comparación de la proporción HA/proteína, proporción proteína de célula huésped/HA y seguridades después de ciclos de 0 a 10 UV.

Número de ciclos UV	Tiempo de contacto	Tasa HA/proteína	Tasa de proteína de célula huésped/HA	Seguridad Vero
0	0 (sin UV)	0.85	0.04	Falló
1	1.4	1.09	0.04	Pasó
2	2.8	0.88	0.04	Pasó
3	4.2	0.91	0.04	Pasó
5	7.0	0.83	0.04	Pasó
7	9.8	0.60	0.02	Pasó
10	14	0.58	0.03	Pasó

[051] Estudios adicionales son llevados a cabo para caracterizar el efecto de la inactivación UV sobre la antigenicidad y la inmunogenicidad en cerdos guinea y en ratones mediante análisis de inhibición de hemaglutinina (HAI).

(B) Antigenicidad

[052] La antigenicidad se analiza mediante ensayo HAI contra antisuero específico Panamá. Aunque los resultados de tiempo de contacto UV incrementados en pérdida ligera de HA, no se muestra ningún efecto negativa para el título del HAI (cf. Tabla 4).

15
75

Tabla 4

**Virus Panamá purificado con gradiente de sucrosa después de tratamiento
con formalina y UV.**

**Comparación de la antigenicidad con base en el título Ha y HAI con el
antisuero específico Panamá después de ciclos de 0 a 10 UV.**

Números de ciclos UV	Tiempo de contacto	HA (µg/ml)	Título HAI
0	0 (sin UV)	211	640
1	1.4	208	640
2	2.8	200	640
3	4.2	198	640
5	7.0	191	640
7	9.8	177	640
10	14	154	640

(C) Inmunogenicidad

[053] La inmunogenicidad se analiza al inmunizar los cerdos de guinea y los ratones con diferentes alícuotas de cosechas de virus monovalentes purificados seguidos por un refuerzo tres semanas después de la primera inmunización. El suero de los animales inmunizados es recolectado y agrupado después de tres y seis semanas y analizado mediante ensayo HAI contra antígenos derivados de huevo y derivados de Vero. La inmunogenicidad ensayada en cerdos de guinea y en ratones después de 3 y 6 semanas da resultados muy promisorios, ninguna diferencia significativa se puede ver para los virus inactivados dobles contra los virus tratados con formalina estándar (cf. Tabla 5).

16
76

Tabla 5

Virus Panama purificado con gradiente de sucrosa después de tratamiento con formalina y UV (0 a 10 ciclos). Comparación de la Inmunogenicidad ensayada en cerdos de guinea y ratones. A) después de 3 semanas, B) después de 6 semanas. HAI con antígeno de Influenza derivado de huevo y Vero.

A

Número de ciclos UV	Tiempos de Contacto	Cerdos de guinea Títulos HAI después de 3 semanas		Ratones Títulos HAI después de 3 semanas	
		Huevo	Vero	Huevo	Vero
0	0 (sin UV)	160	320	320	1280
1	1.4	160	320	320	1280
2	2.8	160	640	320	1280
3	4.2	160	320	320	1280
5	7.0	160	320	320	1280
7	9.8	160	320	320	1280
10	14	160	640	320	1280
control	-	40	20	80	80

B

Número de ciclos UV	Tiempos de Contacto	Cerdos de guinea Títulos HAI después de 6 semanas (Refuerzo)		Ratones Títulos HAI después de 6 semanas (Refuerzo)	
		Huevo	Vero	Huevo	Vero
0	0 (sin UV)	1280	1280	1280	2560
1	1.4	1280	2560	640	1280
2	2.8	1280	1280	640	1280
3	4.2	640	1280	1280	2560
5	7.0	1280	2560	1280	2560
7	9.8	640	1280	1280	2560
10	14	1280	2560	1280	2560
control	-	160	80	160	40

[054] Los resultados resumidos en la Tabla 4 y Tabla 5 muestran que el tratamiento UV no resulta en diferencias significativas en los títulos HAI que demuestran que la antigenicidad y así la inmunogenicidad del producto no se afecta.

ff

[055] En todos los experimentos de inactivación doble la seguridad total se puede demostrar aun después de un ciclo de tratamiento UV. Las investigaciones detalladas en laboratorio y la escala final demostraron la efectividad de la etapa de radiación UV cuando se combina con el tratamiento con formalina. La caracterización inmunológica del antígeno de virus purificado después del tratamiento UV produce resultados comparables a aquellos obtenidos con un producto no tratado con UV. Ningún efecto negativo sobre las características bioquímicas ni la inmunogenicidad del producto se pueden detectar.

Ejemplo 6: Reducción del título del virus con formalina y/o inactivación UV

[056] La reducción del título del virus mediante el tratamiento combinado de la muestra con una concentración efectiva de formalina y una concentración efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante se ensaya con diferentes virus. La inactivación de la formalina se llevó a cabo a 32°C durante 24 horas con una concentración de formalina final de 0.025% (p/v). La inactivación UV en el aparato de flujo pasante se lleva a cabo durante 3 ciclos a una tasa de flujo de 240 l/hora. El tiempo de contacto de la muestra con la luz UV por ciclo es de 1.4 segundos.

Tabla 6

Reducción del título del virus con formalina y/o inactivación UV.

Virus	Tipo de Virus	Reducción Título de Virus Medida después de Tratamiento con Formalina (reducción log)	Reducción del Título de Virus Medido después del Tratamiento UV (reducción log)	Reducción del Título de Virus Calculado después de Tratamiento con Formalina y UV (reducción log)
Influenza	A/H1N1/20/99	≥7.4	≥7.3	≥14.7

Nueva Caledonia				
Influenza Panamá	A/H3N2/2007/99	≥8.4	≥6.7	≥15.1
Influenza Shangdong	B/7/97	≥6.7	≥7.2	≥13.9
Polio	Tipo 1	3.0	4.9	7.9
Adeno	Tipo 5	3.1	2.5	5.6

[057] Los resultados muestran que mediante un tratamiento con formailina y UV combinados de los virus se obtiene una drástica reducción de los títulos de virus respectivos.

Ejemplo 7: Inactivación UV de una Vacuna Candidata de Virus Ross River (RRV).

[058] El Virus Ross River (RRV) es un alfavirus portado por los mosquitos que origina una enfermedad en humanos conocida como pollartritis epidémica (EPA). Los síntomas incluyen artritis, particularmente en las rodillas y en las articulaciones pequeñas de las manos y pies, a menudo acompañados por fiebre, rubor y otros cambios constitucionales no específicos. Los síntomas de la artritis comúnmente duran 30-40 semanas y 25% de los pacientes tienen síntomas residuales un año después del ataque. Es endémica en Australia, con más de 8000 casos cada año, y a través de la región Pacífica. En 1979/80 las infecciones epidémicas con Virus Ross River también ocurrieron en Fiji, Samoa, Islas Cook y Nueva Caledonia. No existe vacuna actualmente.

(A) Inoculación RRV de Microvehículo Libre de Suero con Base en Cultivos Fermentadores de Célula Vero de 1200 Litros e Inactivación de Formalina

[059] 1200 litros de cultivos fermentadores de microvehículo con base en células Vero libres de suero fueron inoculados con virus de producción Ross River. Los cultivos fueron incubados durante 3 días a 37°C. Las muestras fueron sacadas cada día para titulación. En el día 3, cuando el 100% de las células fueron destruidas por CPE (efecto citopático) el virus se cosechó. Después de la separación de los desechos de célula en microvehículos de la cosecha de virus infeccioso y la primera etapa de filtración (1.2 μ m/0.2 μ m), se agregó benzonasa para la degradación de los ácidos nucleicos (ADN/ARN). La inactivación de formalina se llevo a cabo con 0.1% (p/v) de concentración final de formalina durante ocho días. Una segunda y tercera etapa de filtración se llevó a cabo después de dos horas y 24 horas, respectivamente. Se agregó benzonasa una segunda vez a las 24 horas para la remoción de los ácidos nucleicos residuales. Las muestras fueron llevadas para titulación de virus = dosis infecciosa de cultivo de tejido 50 (TCID₅₀/ml) en células Vero y los ensayos de seguridad sobre las células C6-36 y las células Vero de acuerdo con la Tabla 7.

[060] Un día después de la inoculación de un fermentador de 1200 litros con RRV, un título de virus de log TCID₅₀/ml de 5.8 se podría demostrar, cuya elevación a 7.8 (día 2), 8.1 (día 3 antes de cosecha) y 8.0 después de la cosecha del virus. Después de la separación, la primer filtración y la adición de benzonasa, los títulos de virus cayeron a 7.5, 7.2, y 7.4 respectivamente. Después de la adición de formalina se determinaron los títulos después de la remoción de la suspensión de formalina citotóxica mediante centrifugación y re suspensión de glóbulos de virus (Tabla 7, columna: TCID₅₀/ml TL 100). 15 minutos después se agregó formalina a la cosecha de virus, los títulos cayeron dramáticamente a 1.6 12 horas después de la inactivación de formalina, no se pudo demostrar ningún título de virus más.

[061] 24 después del ataque de las muestras con inactivación de formalina se sometieron a ensayos de seguridad sobre células C6-36 y células Vero. Mientras que después de 24 h y 26 h después de la incubación se podrían demostrar 1 muestra positiva (CPE) y 4 muestras negativas sobre las células Vero, 4 muestras positivas y 1 muestra negativa se obtuvieron con la línea celular C6-36 más sensible. Desde el día 2 en adelante, todas las muestras fueron negativas sobre las células Vero. La línea celular C6-36 aun mostró CPE en las muestras negativas de los días 2 y 3, y 4 respectivamente. En los días 4 y 5 todas las muestras ensayadas resultaron negativas en las células C6-36, pero en los días 6 y 7 una muestra de nuevo mostró CPE. Después del día 8 no se pudieron mostrar más muestras positivas sobre las células Vero ni sobre las células C6-36.

Tabla 7 Resultados de Seguridad de un Virus Ross River C sechado de un Fermentador de 1200 Litros

Muestra	TCID ₅₀ /ml	TCID ₅₀ /ml TL 100	Seguridad C6-36	Segundad Vero
Día de infección 1	5 8	n d	n d	n d
Día de infección 2	7 8	n d	n d	n d
Día de infección 3	8 1	n d	n d	n d
Cosecha	8 0	n d	n d	n d
Después del Separador	7 5	n d	n d	n d
Después de 1 Filtración (1 2 µm/ 0 2 µm)	7 2	n d	n d	n d
Después de adición de Benzonasa	7 4	n d	n d	n d
Formalina 0 h (15 minutos)	n d	1 6	n d	n d
Formalina 1 h	n d	1 4	n d	n d
F malina 2 h(antes 2 filtración)	n d	1 4	n d	n d
Formalina 3 h(después 2 filtración)	n d	1 7	n d	n d
Formalina 6 h	n d	1 1	n d	n d
Formalina 12 h	n d	< 0 2	n d	n d
Formalina 18 h	n d	< 0 2	n d	n d
F malina 24 h (antes de 3 Filtr antes de 2 Benzonasa agregada)	n d	< 0 2	4 positivas 1 negativa	1 positivas 4 negativa
F malina 26 h (después 3 Filtr después 2 Benzonasa agregada)	n d	< 0 2	4 positivas 1 negativa	1 positivas 4 negativa
Formalina día 2	n d	< 0 2	1 positivas 4 negativa	5 negativa
Formalina día 3	n d	< 0 2	1 positivas 4 negativa	5 negativa
Formalina día 4	n d	< 0 2	5 negativa	5 negativa
Formalina día 5	n d	< 0 2	5 negativa	5 negativa
Formalina día 6	n d	< 0 2	1 positivas 4 negativa	5 negativa
Formalina día 7	n d	< 0 2	1 positivas 4 negativa	5 negativa
Formalina día 8	n d	< 0 2	5 negativa	5 negativa

✂

(B) Transfección y Experimentos de Infección con RRV ARN

[062] Los resultados de los ensayos de seguridad anteriormente mencionados generaron suspicacia de que el RRV ARN genómico pudiera ser liberado durante el procedimiento de inactivación. Esto a su vez podría conducir a la incorporación de RRV ARN genómico en las células respectivas. Aunque el tratamiento con benzonasa debe conducir a una degradación completa del ARN, la formación de liposoma u otros mecanismos tales como el enmascaramiento del RRV ARN genómico con desechos de proteína podrían explicar la estrategia de escape del ARN intacto.

[063] El ARN genómico RRV se aisló de los viriones purificados de gradiente. Por vía del RT-PCR el número de equivalente de partículas se podría determinar. En un primer experimento (Tabla 8, No. 1) los equivalentes de partícula (ARN genómicos) se diluyeron en etapas de diez veces tanto en medio de transfección (es decir transfección) como el medio regular (es decir infección). Con ambas mezclas fueron inoculadas células C6-36 y células Vero. Después de un medio de intercambio, los cultivos de células fueron incubados durante varios días. Las muestras de los respectivos sobrenadantes fueron utilizadas para titulación de virus y de terminación de HA. Los experimentos de infección con ARN genómico fueron llevados a cabo varias veces (Tabla 8, Nos. 1-5).

[064] Los experimentos de transfección mostraron resultados positivos en TCID₅₀ en ambas célula C6-36 y células Vero. Los sobrenadantes de célula Vero también exhibieron títulos Ha. La infección de las células Vero con un numero alto de equivalentes de partícula (10⁶) mostró un título de virus de 6,8 log TCID₅₀/ml y tuvo un título HA de 128, pero falló al infectar las células C6-36. Después del

experimento de infección con RRV ARN genómico (no. 4) resultó en ambas células C6-36 y células Vero infectadas, con títulos de 8.4 y 6.6 log TCID₅₀/ml, respectivamente. Los intentos de infección 2, 3 y 5 no dieron resultados positivos sobre las células Vero. El intento de infección No. 3 dio un título bajo de 1.6 log TCID₅₀/ml en las células C6-36.

[065] Aunque ningún intento de infectar células con RRV ARN genómico mostró resultados positivos, parece que el ARN genómico a altas concentraciones es capaz de infectar células aleatoriamente. Todos los experimentos que utilizan un reactivo de transfección liposómica mostraron resultados positivos. De esta manera, el enmascaramiento de proteína del ARN o los mecanismos de formación de liposoma explicara los ensayos de seguridad positivos después de la inactivación con formalina y la degradación con benzonasa del ADN/ARN libre en la tabla 7.

84

Tabla 8

Transfección y Experimentos de Infección con RRV ARN

No	Muestra	Infección PA*	Transfección ARN (DMRIE-C)				Infección ARN		
			C6-36		Vero		C6-36	Vero	
			Log TCID ₅₀	HA	Log TCID ₅₀	HA	Log TCID ₅₀	Log TCID ₅₀	HA
1	RNA-1	1 X 10 ⁵	7.4	neg	7.1	128	0.2	6.8	128
		1 X 10 ⁴	5.5	neg	7.1	64	0.2	Neg	n.d.
		1 X 10 ³	7.6	neg	7.2	128	0.2	Neg	n.d.
		1 X 10 ²	5.2	neg	5.6	128			
		1 X 10 ¹	0.2	neg	0.2	Neg			
2	RNA-1	1 X 10 ⁵					0.2	0.2	n.d.
3	RNA-1	1 X 10 ⁵	7.5	n.d.	4.6	n.d.	1.6	0.2	n.d.
4	RNA-2	1 X 10 ⁵	7.2	n.d.	4.2	n.d.	8.4	6.6	n.d.
	RNA-2	1 X 10 ⁴	7.0	n.d.	5.0	n.d.			
5	RNA-2	1 X 10 ⁵					0.2	0.2	n.d.

• PA equivalentes de partícula infecciosa

n.d. no hecho

84

(C) Inactivación UV de RRV Infeccioso

[066] Para las consideración anteriormente mencionadas, fueron llevados a cabo experimentos a pequeña escala para inactivar RRV mediante irradiación UV. Los sobrenadantes RRV PV fueron irradiados con UV durante diferentes cantidades de tiempo con dos intensidades UV: 2.1 mW/cm² (muestras 1-10) y 2.3 mW/cm² (muestras 11-20). Subsecuentemente, estas muestras fueron sometidas a titulación de virus, titulación de antígeno (EIA) y se determino del título de hemaglutinación seguido. Las muestras, que fueron irradiadas durante más de 3 minutos (Nos. 6-10 y 14-19), fueron sometidas a ensayos de seguridad sobre células C6-36 (Tabla 9).

[067] Los títulos de los virus cayeron después de 10 minutos de la irradiación UV de 7.4 log TCID₅₀/ml (control, muestra #1) a 1.5 log TCID₅₀/ml con ambas intensidades UV. La hemaglutinación permaneció estable durante 15 minutos a una intensidad UV de 2.1 mW/cm² con un título HA de 9, pero cayó a 8 a una intensidad UV de 3.3 mW/cm². Los títulos de antígeno (EIA) también permanecieron estables durante 15 minutos de irradiación, con un rango de 640-1280. Los ensayos de seguridad, llevados a cabo con muestras irradiadas durante 3 a 5 minutos a una intensidad UV 2.1 mW/cm² (muestras Nos 6 y 7) aun mostraron CPE en el cultivo de célula y dieron títulos de virus de 8.2 y 8.6 log TCID₅₀/ml, respectivamente. Los ensayos de seguridad, llevados a cabo con muestras irradiadas durante 2, 3 y 5 minutos a la intensidad UV mayor de 3.3 mW/cm² (muestras Nos. 6 y 7) mostraron a un CPE en el cultivo de célula y dieron como resultado títulos de virus en 8.2, 8.6 y 8.7 log TCID₅₀/ml, respectivamente. Después de 10 minutos de irradiación, todos los ensayos de seguridad fueron negativos.

[068] La irradiación UV a intensidades tanto de 2.1 mW/cm² como de 3.3 mW/cm² durante más de 10 minutos inactivo las preparaciones RRV completamente. La antigenicidad, como se mostró en los ensayos HA y EIA, permaneció sin daño a ambas intensidades de irradiación durante 15 minutos. Después de 30 minutos se afectó la antigenicidad.

Tabla 9
Inactivación UV de virus infeccioso

No Muestra Tratamiento			Tiempo (segundos)	TCID ₅₀ /ml	HA	EIA	Intensidad UV Mw/cm ²	Total UV mJ/cm ²	Segundad C8-36 TCID ₅₀ /ml
1 RRV PV/sp5/574/98 Maternal inicial			-	7.4	9	640	-	0	n.d.
2	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 30 s	30	4.4	9	640	2.1	63	n.d.
3	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 60 s	60	3.7	9	640	2.1	126	n.d.
4	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 90 s	90	1.7	9	640	2.1	189	n.d.
5	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 2 min	120	1.8	9	640	2.1	252	n.d.
6	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 3 min	180	3.2	9	1280	2.1	378	+ (8.2)
7	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 4 min	300	1.5	9	1280	2.1	630	+ (8.6)
8	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 10 min	600	1.5	9	1280	2.1	1280	- (0.2)
9	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 15 min	900	1.5	9	640	2.1	1890	- (0.2)
10	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 5 cm 30 min	1800	1.5	1	320	2.1	3780	- (0.2)
11	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 30 s	30	3.8	9	640	3.3	99	n.d.
12	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 60 s	60	3.0	9	640	3.3	198	n.d.
13	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 90 s	90	1.7	9	640	3.3	297	n.d.
14	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 2 min	120	2.2	9	640	3.3	396	+ (8.2)
15	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 3 min	180	1.6	8	640	3.3	594	+ (8.6)
16	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 4 min	300	1.5	8	1280	3.3	990	+ (8.7)
17	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 10 min	600	1.5	8	640	3.3	1980	- (0.2)
18	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 15 min	900	1.5	7	640	3.3	2970	- (0.2)
19	RRV PV/sp5/574/98	4 ml 3 cm 30 min	1800	1.5	2	180	3.3	5940	- (0.2)
20 Control positivo			-	7.2	9	-	-	-	n.d.

4



(D) Inactivación UV de una Cosecha de un Fermentador de 1200 Litros Inactivada con Formalina

[069] Una alícuota de una cosecha de virus en un fermentador de 1200 litros tratada con formalina fue irradiada con 3 ciclos a una tasa de flujo de 300 l/h, 3 ciclos a 1500 l/h y 3 ciclos a 75 l/h. Una segunda alícuota de una cosecha de virus en un fermentador de 1200 litros tratada con formalina fue irradiada con UV con 10 ciclos a una tasa de flujo de 300 l/h, pero este tiempo después de diafiltración, para remover altas concentraciones de proteínas pequeñas que permanecen. Los títulos HA, los títulos de antígeno EIA, los títulos de virus y la seguridad (CPE) se determinaron en cada procedimiento (Tabla 10).

[070] Los títulos de virus en el primer experimento (sin diafiltración) cayeron después de un ciclo de irradiación UV a una velocidad de flujo de 150 l/h de 6.13 log TCID₅₀/ml por debajo del límite de detección. Los ensayos de seguridad no mostraron CPE. Sin embargo, después de 3 ciclos de irradiación UV a una tasa de flujo de 150 l/h, los ensayos de seguridad y cultivo de célula mostraron resultados positivos y también fueron positivos en titulación de virus (6.7 TCID₅₀/ml). 3 ciclos de radiación UV a una tasa de flujo de 75 l/h permanecieron negativos tanto en titulación de virus como en ensayos de seguridad. En los segundos ensayos de seguridad del experimento y la titulación de virus permanecieron negativas después de 5 y más ciclos de irradiación. En el primer experimento todas las dosis de irradiación no influenciaron los títulos HA y EIA con 11 y 1:320, respectivamente. En el segundo experimento todos los títulos HA y EIA fueron de 10 y 1:320, respectivamente, con la excepción de 6 ciclos de irradiación, que dio como resultado un título EIA de 1:640.

[071] La inactivación doble de una cosecha de fermentador de RRV sin formalina y cinco o más ciclos de irradiación UV a una tasa de flujo de 300 l/h es suficiente para destruir completamente la infectividad sin dañar la antigenicidad.

Tabla 10
Inactivación UV de una Cosecha en un Fermentador de 1200 litros de RRV

Muestra	Título HA	Título AG-EIA	TCID ₅₀ (después del paso de C6-36)	Lectura Final de Seguridad CPE
C secha de F07-31 de RRV+matenal de partida Formaldehído	11	1 320	6 13	++++
Untrafiltrado F07-31 de RRV	4	1 80	7 04	+---
Matenal de Partda de diafiltrado F07-31 de RRV	11	1 320	5 95	++++
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 1xUV 300/h	11	1 320	6 29	++++
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 2xUV 150/h	11	1 320	5 71	++++
C secha F07-31 de RRV + Formalina 3xUV 150/h	11	1 320	6 31	++++
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 1xUV 150/h	11	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 2xUV 150/h	11	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 3xUV 150/h	11	1 320	6 70	++++
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 1xUV 75/h	11	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 2xUV 75/h	11	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina 3xUV 75/h	11	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 1xUV 300/h	10	1 320	6 71	++++
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 2xUV 300/h	10	1 320	6 71	++++
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 3xUV 300/h	10	1 320	6 82	++++
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 4xUV 300/h	10	1 320	2 82	+---
C secha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 5xUV 300/h	10	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 6xUV 300/h	10	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 7xUV 300/h	10	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 8xUV 300/h	10	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 9xUV 300/h	10	1 320	0 21	----
Cosecha F07-31 de RRV + Formalina diafiltrada 10xUV 300/h	10	1 320	0 21	----

8

(E) Eficacia de las Preparaciones de Vacuna Candidatas RRV Inactivadas Dobles
Dosis Efectiva (ED₅₀), Dosis Protectora (PD₅₀) y Títulos ELISA en Ratones
Inmunizados

[072] Una vacuna candidata de RRV inactivada con formalina e inactivada doble (formalina + irradiación UV) se ajustó a 10 µg por dosis, y luego se diluyó en etapas 4 veces. Cada dilución se inyectó en un grupo de 10 ratones. Después de 3 semanas los ratones fueron reforzados con la correspondiente cantidad de vacuna. Las muestras de sangre fueron llevadas en la semana 3 antes del refuerzo, y en la semana 6, tres semanas después del refuerzo. Los sueros fueron analizados mediante ELISA de anticuerpo RRV. La dosis efectiva 50 (ED₅₀), ésta es la dosis de antígeno que es suficiente para inducir seroconversión en el 50% de los ratones inmunizados, fue entonces calculada.

[073] En la semana 3, antes del refuerzo, el ED₅₀ del grupo inactivado con formalina fue de 635 ng y el grupo con la formalina y la inactivación doble con UV 202 ng. Después del refuerzo, los valores ED₅₀ fueron 33 ng y 10 ng, respectivamente. El análisis de los títulos ELISA, sin embargo, demostró que el grupo con inactivación doble tenía aun títulos de anticuerpo mayor, por ejemplo en la semana 3, 9 ratones con un título de ELISA de 1,000 contra 16 ratones con 1,000 en el grupo de inactivación doble, y ningún ratón con 10,000 en el grupo de formalina contra 4 ratones con 10,000 en el grupo de inactivación doble. Después del refuerzo, de nuevo los títulos del grupo de inactivación doble fueron mayores: 8 ratones en el grupo de formalina comparados con 11 ratones en el grupo de inactivación doble con 100,000, y 4 ratones adicionales con un título de ELISA de 1 millón en el grupo de inactivación doble (Tabla 11).

[074] En la semana 6, 3 semanas después del refuerzo, los ratones fueron infectados intravenosamente con 10^6 TCID₅₀/ml (dosis infectiva de cultivo de tejido 50) de los Virus vivos de Ross River (sepa T48). En el día 1, 2, 3 y 4, fueron tomadas muestras de sangre p.i. y se determinó subsecuentemente el TCID₅₀ del suero. La dosis protectora 50 (PD₅₀), esto es la dosis de antígeno en la cual el 50% de los ratones infectados no mostró viremia, se calculó. El PD₅₀ de 78 ng fue idéntico para ambas preparaciones de antígeno, el antígeno inactivado con formalina inactivada así como también el antígeno inactivado doble (formalina + irradiación UV).

Tabla 11

**Dosis Efectiva (ED₅₀), Dosis Protectora (PD₅₀) y títulos de ELISA en Ratones
Inmunizados**

ED ₅₀			PD ₅₀
Inactivación	Semana 3	Semana 6 (refuerzo)	Semana 6
Formalina	635 ng	33 ng	78 ng
Formalina + UV	202 ng	10 ng	78 ng

Título de ELISA

Semana	Inact.	<10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	N
3	Form.	35	8	8	9	0	0	0	0	0	60
	Form. + UV	27	7	6	16	4	0	0	0	0	60
6	Form.	14	7	5	15	11	8	0	0	0	60
	Form. + UV	8	7	9	7	14	11	1	0	0	60

[075] La infectividad residual encontrada primariamente en las líneas celulares C6-36 muy sensibles después de tratamiento con formalina sola, es más probablemente causada por RRV ARN infeccioso. La introducción de la segunda etapa de inactivación vial adicional (irradiación UV), afecta el genoma del virus después del tratamiento con formalina, dio como resultado preparaciones de vacuna candidatas RRV completamente inactivadas y seguras sin afectar la inmunogenicidad y eficacia en un modelo de ratón.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de la formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante, en donde la etapa (i) se desarrolla antes de la epata (ii) o viceversa en donde la taza de flujo de la muestra a través del aparato es de aproximadamente 50 litros por hora a aproximadamente 1000 litros por hora
2. Un método para inactivar un virus recubierto contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante, en donde la etapa (i) se desarrolla antes de la etapa (ii) o viceversa, en donde el virus recubierto es completamente inactivado.
3. Un método para inactivar un virus ARN recubierto en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante, en donde la etapa (i) es desarrollada antes de la etapa (ii) o viceversa, en donde el virus recubierto es completamente inactivado.
4. Un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz

UV en un aparato de flujo pasante que comprende una lámpara UV y una cámara de capa delgada en el aparato que es sustancialmente perpendicular al diámetro de la lámpara UV, en donde la etapa (i) se desarrolla antes de la etapa (ii) o viceversa, en donde la muestra es pasada a través de la cámara de capa delgada del aparato en la etapa (ii).

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la reducción del título de virus debido a la inactivación del virus en la muestra es de al menos 1×10^5 , o al menos aproximadamente 1×10^7 , o al menos aproximadamente 1×10^{10} , o al menos aproximadamente 1×10^{14} .
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa de tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina es llevada a cabo durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la concentración efectiva de formalina es de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1%.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la luz UV es UVC con una longitud de onda de aproximadamente 100 a aproximadamente 280 nm.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la dosis de luz UV es de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mJ/cm^2 .

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tiempo de contacto de la muestra con la luz UV es aproximadamente 1 a aproximadamente 20 segundos.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la tasa de flujo en el aparato de flujo pasante es de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 litros por hora.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el aparato de flujo pasante contiene una cámara de capa delgada.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el flujo de la muestra a través de la cámara de capa delgada es turbio.
14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde la capa delgada de la cámara de capa delgada tiene un grosor de aproximadamente 1 mm.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la etapa de someter la muestra a una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante se repite aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde se selecciona la muestra de un grupo que consiste de fluidos biológicos o soluciones que se originan de un proceso de cultivo de célula para preparar productos biológicos, médicos o farmacéuticos.

96

17.El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende además la etapa de someter la muestra a etapa de purificación para remover la formalina residual en la muestra.

18.El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 que comprende además purificar el virus inactivado en la muestra para pureza farmacéutica, y formular el virus inactivado purificado en una composición farmacéutica para uso como una vacuna.

INACTIVACION DE UN PATOGENO EN UNA MUESTRA MEDIANTE UN
TRATAMIENTO CON FORMALINA Y LUZ UV

RESUMEN

la presente invención se relaciona con un método para inactivar virus al tratar una muestra que contiene virus, con una concentración efectiva de formalina y al tratar la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato a través de flujo.

98

1/3

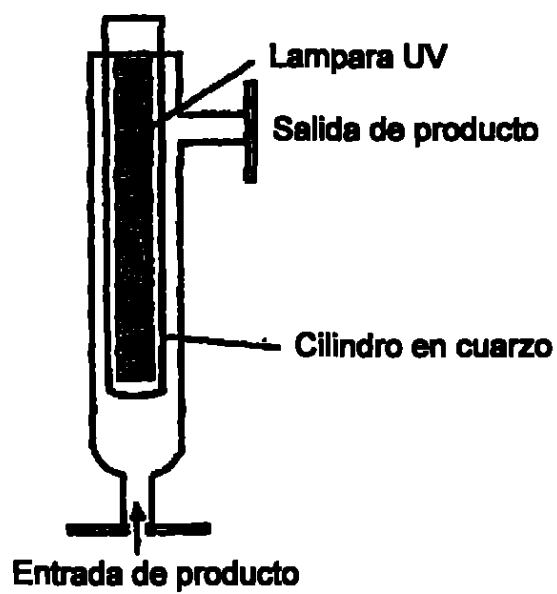


Figura 1

99

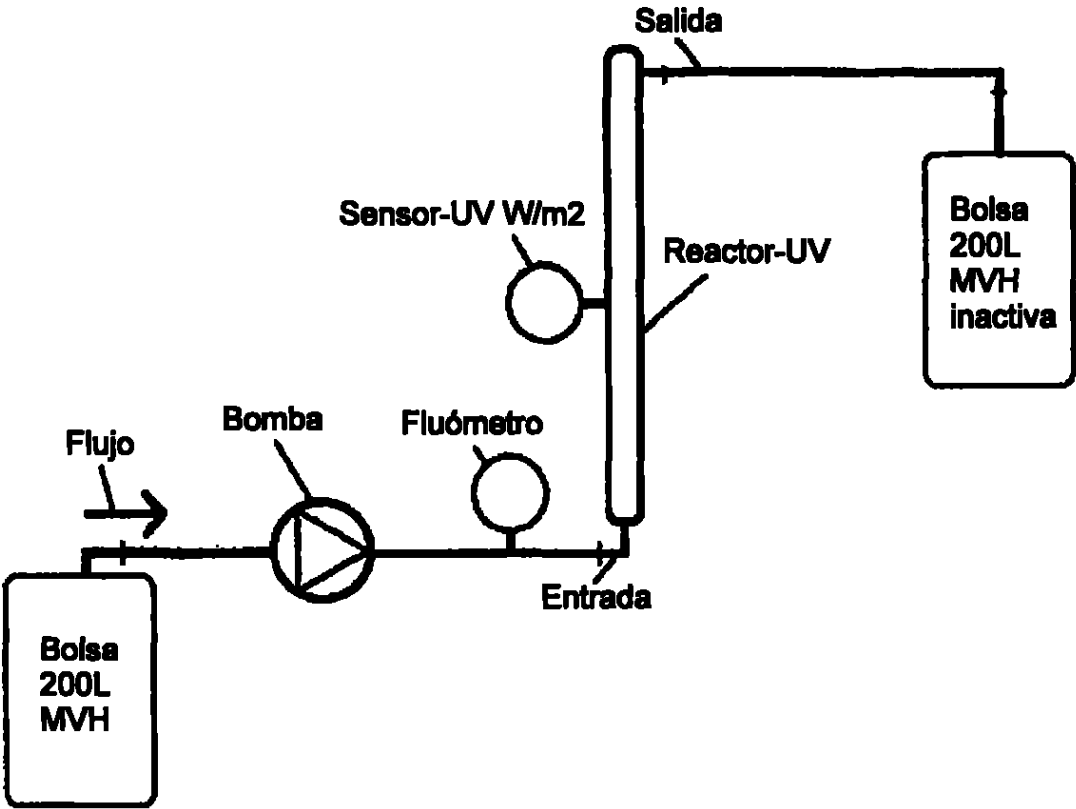


Figura 2

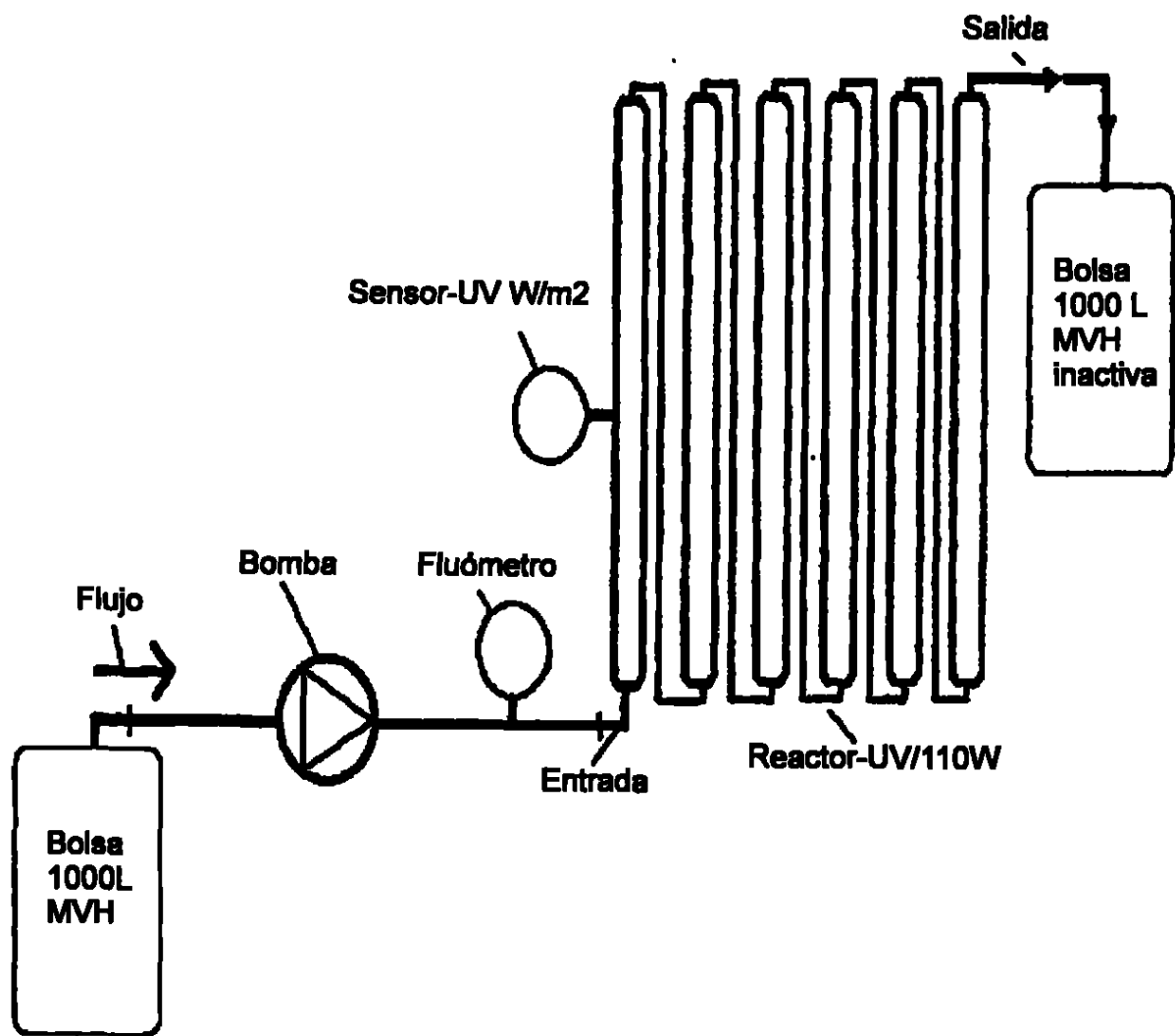


Figura 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/005691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61L2/00 A61L2/10 A61M1/36 C11D7/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L A61M C11D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 802 048 A (PARKE, DAVIS & COMPANY) 24 September 1958 (1958-09-24) page 1, line 11 - page 4, line 70; example 1	4-10, 12, 16-18
Y		1, 11, 13-15
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199627 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1996-266694 XP002337093 & SU 1 367 487 A1 (A MED POLYMYELITIS VIRAL ENCEPHELITIS) 27 October 1995 (1995-10-27) abstract ----- -/-	2, 3, 7, 16-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the International filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

21 July 2005

Date of mailing of the International search report

08/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jochheim, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/005691

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/096648 A1 (KAISER KLAUS ET AL) 25 July 2002 (2002-07-25) paragraphs '0001!, '0004! - '0007!, '0012!, '0037!; example 1	1,11
Y	US 5 247 178 A (URY ET AL) 21 September 1993 (1993-09-21) column 1, line 47 - column 2, line 14 column 3, lines 3-39	13-15
P,A	DARNELL M E R ET AL: "Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 121, no. 1, October 2004 (2004-10), pages 85-91, XP004551409 ISSN: 0166-0934 paragraphs '02.3!, '02.6!, '03.1!, '03.3!	1-18
A	US 3 926 556 A (BOUCHER ET AL) 16 December 1975 (1975-12-16) column 15, lines 16-31; claims; figure 11b	4,8-10, 12-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/005691

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 802048	A	24-09-1958	NONE		
SU 1367487	A1	27-10-1995	NONE		
US 2002096648	A1	25-07-2002	DE	10056096 A1	13-06-2002
			AU	1906602 A	21-05-2002
			CA	2428264 A1	16-05-2002
			CN	1486282 A	31-03-2004
			WO	0238502 A1	16-05-2002
			EP	1339643 A1	03-09-2003
			JP	2004512912 T	30-04-2004
US 5247178	A	21-09-1993	NONE		
US 3926556	A	16-12-1975	NONE		

24

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) 80/575,310 (32) 27/05/04 (33) US	(51) Int Cl: A61L 2/00 (71) Solicitante(s) BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A. (72) Inventor(es) MANFRED REITER Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27/12/2008 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 26/05/2005 No. de solicitud PCT/EP2005/005891	(87) Publicación Internacional Fecha: 15/12/2005 N° publicación: WO 2005/118000 A1
(54) Título: INACTIVACIÓN DE UN PATÓGENO EN UNA MUESTRA MEDIANTE UN TRATAMIENTO CON FORMALINA Y LUZ UV	

Reivindicación(es):

1. Un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de la formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante, en donde la etapa (i) se desarrolla antes de la etapa (ii) o viceversa en donde la tasa de flujo de la muestra a través del aparato es de aproximadamente 50 litros por hora a aproximadamente 1000 litros por hora
2. Un método para inactivar un virus recubierto contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante, en donde la etapa (i) se desarrolla antes de la etapa (ii) o viceversa, en donde el virus recubierto es completamente inactivado.
3. Un método para inactivar un virus ARN recubierto en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante, en donde la etapa (i) es desarrollada antes de la etapa (ii) o viceversa, en donde el virus recubierto es completamente inactivado.
4. Un método para inactivar un virus contenido en una muestra, que comprende las etapas de (i) tratar la muestra con una concentración efectiva de formalina, y (ii) someter la muestra con una dosis efectiva de luz UV en un aparato de flujo pasante que comprende una lámpara UV y una cámara de capa delgada en el aparato que es sustancialmente perpendicular al diámetro de la lámpara UV, en donde la etapa (i) se desarrolla antes de la etapa (ii) o viceversa, en donde la muestra es pasada a través de la cámara de capa delgada del aparato en la etapa (ii).

F R M A T O D E D I G I T A L I Z A C I O N
R E L A C I O N D E A N E X O S



Royal
Technologies S.A.
Mapa de Ruta 2004-2005

105

Expediente No		No de Folio
06127737		
Item	No de unidades	
1	CD	
2	DVD	
3	REVISTA	
4	LIBRO	
5	PERIODICO	
6.	DISQUETES	
7	SOBRE DE MANILA	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	✓
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO	
10	OTROS:	

Observaciones:

contiene Arte Final

fec
106

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-12/13/- 00000-0000
Pec: 2006-12-20 11/2110 Dep. 2006 NUESTRAS LEYES
TOL. 11 PATENTE Y
Evo: 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folio: 108

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 94,103
FECHA : DICIEMBRE 11 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55767475	11/12/2006	25,475,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SCH: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 13936 841 009 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

108

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	06 127737
	Solicitud internacional	PCT/EP2005/005691
	Fecha inicio fase nacional	27/12/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	861

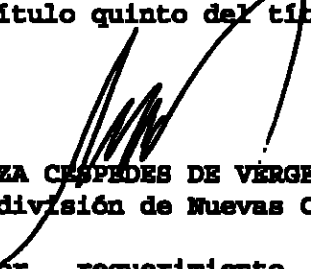
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VÉRGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa10

92

