



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00180

(22) Data de depozit: 07/04/2022

(41) Data publicării cererii:
30/10/2023 BOPI nr. 10/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
MEDICO-MILITARĂ "CANTACUZINO",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.103,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ȚUCUREANU CĂTĂLIN,
STR.CETATEA HISTRIA NR.5, BL.MIIB8/15,
AP.22, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;

• ȘERBĂNESCU ANA DANIELA,
BD.CAMIL RESSU, BL.N1, SC.5, AP.206,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ONU ADRIAN, PIAȚA NAȚIUNILOR UNITE
NR.3-5, BL.A, AP.75, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• COSTACHE ADRIANA ZOE,
ȘOS.PANTELIMON, NR.258, BL.47, SC.1,
ET.4, AP.20, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• LAZĂR MIHAELA, STR.BANUL UDREA
NR.10, BL.H6, SC.2, ET.7, AP.58,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• IVANCIUC ALINA, STR.DRUMUL FERMEI
NR.117J, POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO

(54) PROCEDEU PENTRU ANALIZA GRADULUI
DE FRAGMENTARE A VIRUSULUI GRIPAL

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de analiză a gradului de fragmentare a virusului gripal cu aplicabilitate în dezvoltarea de noi șarje de vaccin antigripal inactivat și fragmentat cu caracter sezonier sau pentru răspuns pandemic. Metoda, conform invenției, constă în analiza dimensiunilor virale submicroscopice ale probelor native, necolorate și nefixate prin tehnica de microscopie de forță atomică, cu diferențierea între formele de re-agre-

gate virale și virusurile întregi și evaluarea cantitativă a numărului și distribuției pe dimensiuni a particulelor submicroscopice virale/agregatelor proteice prezente în probele analizate care permite obținerea unor informații suplimentare privind proprietățile candidaților de vaccin.

Revendicări: 2
Figuri: 9

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2022-01-180
Data depozit	07-04-2022

ANEXĂ	
Nr. A-2777	04 APR. 2022

DESCRIEREA INVENȚIEI

1. Domeniul tehnic la care se referă invenția:

Procedeul prezentat este unul dintre procedeele folosite în faza de dezvoltare a produselor farmaceutice ce constă în verificarea parametrilor fragmentării virusului gripal inactivat ce are avantajul că este mult mai robustă decât alte metode alternative.

2. Prezentarea stadiului tehnicii:

Vaccinurile gripale sunt vaccinuri a căror compoziție se schimbă anual, astfel fiind riguros standardizate. Bazele standardizării sunt date de recomandările Organizației Mondiale a Sănătății pentru fiecare tip de vaccin. Dată fiind necesitatea de a fabrica noi șarje vaccin ca răspuns la tulpinile probabile identificate, trebuie să fie aplicat un set unic de cerințe de reglementare la dezvoltarea, testarea și eliberarea în serie a vaccinurilor gripale atât cu caracter sezonier, cât și pentru răspuns pandemic.

Ca urmare, producătorii de vaccin folosesc recomandările OMS pentru producția și controlul calității vaccinurilor gripale și care au fost elaborate pentru prima dată în 1967 și revizuite ulterior în 1978, 1990, 2003 și 2005. Cea mai recentă revizuire ia în considerare utilizarea celulelor de mamifere pentru producție, utilizarea adjuvanților, dezvoltarea genetică inversă pentru generarea virusurilor vaccinale și niveluri crescute de planificare a pandemiei.

Detalii se află în documentul „Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated), WHO Technical Report Series No. 927, Annex 3 (<https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/ANNEX%203%20InfluenzaP99-134.pdf?ua=1>).

Sunt disponibile două tipuri de vaccin antigripal, un preparat inactivat (omorât) care se administrează prin injecție intra-musculară și unul atenuat, administrat oral în mod normal pe cale nazală.

În cazul vaccinului inactivat există trei tipuri, vaccinurile cu virus întreg, vaccinurile fragmentate și vaccinurile subunitare. În vaccinurile subunitare, componentele virusului relevante pentru apărarea organismului prin răspunsul imun, hemaglutinina (HA) și neuraminidaza (NA) sunt purificate și fac parte din compoziția vaccinului, celelalte componente virale fiind înlăturate.

În vaccinurile fragmentate, virusul este disociat parțial printr-un agent care extrage o parte dintre lipidele care asigură stabilitatea particulei virale iar ca rezultat se obțin fragmente mai mici. În funcție de mărimea, compoziția și forma acestor fragmente vaccinurile pot avea eficiență diferită. În multe cazuri vaccinurile fragmentate sunt mai eficiente decât cele subunitare deoarece conțin și alte componente virale ce stimulează răspunsul imun înăscut potențându-l ulterior pe cel dobândit în urma vaccinării.

În general, vaccinurile gripale sezoniere sunt trivalente (mai nou tetravalente), conținând un amestec de tulpini gripale A și B considerate ca cele mai probabile să circule în

sezonul următor. Acestea, din rațiuni de siguranță, nu sunt virusuri înalt patogene, fiind tulpini virale reasortante care să producă randamente ridicate fără a fi patogene pentru om. Tulpinile reasortante au glicoproteinele de suprafață (HA și NA) ale virusului potențial circulant în sezonul următor pe baza predicțiilor OMS, dar proteinele interne sunt ale unei tulpini de producție standardizate provenite din tulpina inițială A (A/Puerto Rico/8/1934 H1N1). Astfel se elimină o mare parte din riscurile asociate manipulării tulpinilor patogene. Virusul este cultivat în embrioni de pui sau culturi de celule pentru producerea de vaccinuri.

Aceste tulpini reasortante se produc după predicție în câteva centre din lume iar Organizația Mondială a Sănătății analizând situația epidemiologică mondială de două ori pe an recomandă noi tulpini vaccinale dacă situația o impune.

Cu privire la dozaj în ultimii 20 de ani au existat multe studii clinice pentru vaccinuri, fragmentate și subunitare. Acest lucru a condus la opinia general acceptată că o doză de vaccin care conține 15 ug de hemaglutinină din fiecare tip de tulpină per doză, ar urma să stimuleze producerea de anticorpi cu rol de a inhiba legarea hemaglutininei gripale de celule, conferind astfel un grad adecvat de imunitate indivizilor vaccinați. (Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Morbidity and Mortality Weekly Report, 1999, 48:1–28.).

Ca urmare se poate afirma că vaccinul gripal, față de alte vaccinuri, este foarte bine reglementat fiind definit dozajul, criteriile de eficiență și metodele de testare pentru cantitatea de hemaglutinină pe doza.

În schimb pentru partea tehnologică nu sunt definite reglementări. Acestea sunt generice, de exemplu pentru fragmentare este definit gradul de fragmentare de peste 50%. În cazul vaccinurilor fragmentate care sunt produse prin fragmentarea virusului prin extracția lipidelor, condițiile de fragmentare, concentrația substanțelor chimice precum și metodele de testare utilizate vor trebui aprobate de autoritatea națională de reglementare la depunerea dosarului produsului (document tehnic comun) sau la modificările ulterioare ale dosarului.

Fragmentarea virusului gripal înseamnă ruperea particulelor virale cu extragerea unei părți din lipidele componente, astfel se crede că se reduc efecte adverse asociate utilizării preparatelor bazate pe virus întreg inactivat. O bună parte din specialiști consideră totuși că efectele adverse descrise în literatură s-au datorat mai degrabă contaminării cu endotoxina decât faptul că virusul era întreg. Totuși vaccinul bazat pe fragmentarea virusului inactivat reprezintă o categorie de vaccinuri descrise în farmacopee și reprezintă marea majoritate a vaccinurilor sezoniere antigripale existente pe piață. Acestea, tradițional fragmentate cu eter, sunt acum fragmentate de cei mai mulți producători cu detergenți blânzi. Cu toate acestea metodele de fragmentare trebuie optimizate pentru că detergentul principal folosit în fragmentare de o parte dintre producători este Triton X-100 care nu mai este acceptat în Uniunea Europeană.

3. Prezentarea problemei tehnice pe care o rezolvă invenția;

Problemele tehnice care sunt abordate de procedeul folosit țin de analiza particulelor submicronice. Un virus gripal are dimensiunea medie de 100 nm iar fragmentele lui sunt bineînțeles mai mici. Astfel de fragmente sunt în zona 30-60 nm.

Există câteva probleme în detecția particulelor în zona aceasta de dimensiune. În primul rând acestea nu pot fi văzute la microscop pentru ca rezoluția este limitată de fenomenul de difracție. Astfel pentru două puncte ce pot fi vizualizate distinct, rezoluția este definită de relația lui Abbe:

$$\text{Rezoluția} = \lambda / 2NA$$

unde apertura numerică $NA = n \cdot \sin(\theta)$ este definită de indicele de refracție al mediului unde este obiectul a cărui imagine se colectează (n ; de obicei aer, apă, ulei de imersie) înmulțit cu sinusul unghiului prin care intra lumina în diafragmă obiectivului ($\sin(\theta)$). λ reprezintă lungimea de undă

Alfel spus în zona spectrală în care ochiul uman poate vedea cu o sensibilitate maximă, $\lambda = 550$ nm (lumină verde), rezoluția este limitată la 200 nm. Există deasemenea alte modele care dau valori ceva mai mici față de relația lui Abbe (Rayleigh, Sparrow) dar îmbunătățirea nu permite estimarea formelor și dimensiunilor submicronice. Există sisteme moderne bazate pe folosirea de lumina structurată care permit depășirea limitei teoretice. Totuși îmbunătățirea nu este suficientă pentru a putea efectua analize la scara sutelor de nanometri.

Soluția general adoptată pentru a compensa această barieră este folosirea microscopelor electronice unde în loc de lumina sunt folosite fascicule de electroni a căror lungime de undă asociată este mult mai mică. Calculând lungimea de undă din relația lui de Broglie se obține

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2 \cdot e \cdot m \cdot U}}$$

unde h este constanta lui Plank, e este sarcina elementară, m masa electronului iar U tensiunea de accelerare a fluxului de electroni ducând la lungimi de undă sub nanometrice.

Calculul arată că în condițiile acestea lungimile de undă sunt de o zecime de nanometru chiar la tensiuni de câțiva zeci de volți și substanțial mai mici la tensiuni mari, de ordinul kV ceea ce permite o rezoluție la scara atomică. În schimb proba trebuie ținută în vid înaintat pentru a permite circulația liberă a electronilor, ceea ce înseamnă ca ea trebuie să fie complet uscată. În plus deoarece calitatea imaginii depinde foarte mult de capacitatea de absorbție a fluxului de electroni proba este accentuată în zonele în care nu există material de analizat cu o substanță ce conține metale grele (Os, Va, Ru, Ur), uneori radioactive, fiind denumită colorație negativă. Ca urmare este o diferență relativ mare între proba reală și imaginea ei prin microscopie electronică. Proba trebuie prelucrată și ținută în vid procedee prin care este radical modificată, și nu în ultimul rând microscopul electronic sunt relativ scumpe, necesită utilități deosebite, întreținere și personal calificat.

În plus chiar dacă rezoluția teoretică este impresionantă la aceste dimensiuni, vibrația moleculară dată de agitația termică face ca entitățile mici din probă să nu-și păstreze poziția și ca urmare imaginea să nu fie perfect definită ceea ce limitează din nou acuratețea.

Un alt procedeu de analiza a particulelor sau a fragmentelor este sedimentarea, viteza de sedimentare depinzând de masa și forma structurilor de analizat. Aceste proprietăți sunt

incluse în coeficientul de sedimentare al unei particule care este definit ca raportul dintre viteza de sedimentare (V_t) a unei particule și accelerația aplicată (a) care duce la sedimentare:

$$s = \frac{v_t}{a} \text{ pentru o particulă sferică.}$$

Coeficientul de sedimentare se poate calcula ca fiind $s = \frac{m}{6\pi\eta r}$ unde m este masa particulei, r este raza ei iar η este coeficientul de sedimentare sau, ținând cont de formula masei $s = \frac{2\rho_d r^2}{9\pi\eta}$ unde ρ_d este densitatea relativă a particulei, adică diferența dintre densitatea particulei și cea a mediului în care se află.

Vedem astfel că acest coeficient de sedimentare depinde de dimensiunea particulei dar și de densitatea ei. Ca urmare, sedimentarea poate fi folosită ca tehnică dacă densitățile particulelor de comparat sunt apropiate. În plus acest coeficient este cu atât mic cu cât dimensiunea particulei este mai mică iar pentru sedimentarea lor sunt necesare câmpuri de forță sunt mari, de zece sau de mii de ori față de accelerația gravitațională (simpla atracție a pământului). Aceasta presupune plasarea în câmp de forțe centrifugale mare realizabil cu o ultracentrifuga. Practic de multe ori în analiza prin folosirea unui mediu de sedimentare în gradient se pot separa particule cu proprietăți diferite. Problema este că uneori, la echilibru, separarea depinde mai mult de densitate decât de dimensiune sau formă. Aceasta este o limitare a metodei întrucât uneori fragmentele virale au aceeași densitate cu virusul inițial (m/v).

Există și alte metode de estimare a dimensiunii particulelor precum împrăștierea dinamică a luminii care poate oferi informații dar acestea sunt oarecum limitative în situația în care proba conține detergent cum este în cazul probelor de virus gripal fragmentat.

Alte metode de analiza a dimensiunii particulelor precum cromatografia de excludere sterică sunt limitate la tipul de materialele ce pot fi utilizabile ca suport cromatografic.

4. Expunerea invenției

Prezenta invenție se referă la un nou procedeu de analiză a fragmentării virusurilor gripale din candidații de vaccin bazată pe microscopie de forță atomică după absorbția probelor pe suport de sticlă funcționalizat.

5. Prezentarea modului în care poate fi exploată industrial

Prin acest procedeu se poate optimiza și fundamenta dezvoltarea unui vaccin gripal de tip vaccin gripal inactivat și fragmentat cu metode îmbunătățite.

6. Prezentarea avantajelor invenției în raport cu stadiul tehnicii

Pentru elaborarea prezentei invenții s-au evaluat posibilitățile de utilizare a tehnicilor de evaluare a fragmentării virusului gripal care să ia în considerare un număr suficient de mare de evenimente dar să și definească profile caracteristice care să permită verificarea corectitudinii, cu putere statistică. Optimizarea proceselor de etalare a componentelor probei este realizată cu ușurință prin legarea electrostatică de substratul probei.

Utilizarea noului sistem permite analiza probelor native, necolorate și nefixate. Prin aceasta se asigură un bun control al dimensiunii particulelor de analizat.

Ca urmare, procedeul propus este foarte eficient în special datorită robusteții lui. Procedeul propus are avantajul utilizării unei metode simple de analiză, este economic și practic.

7. Prezentarea detaliată a obiectului invenției.

Microscopia de forță atomică este curent folosită la vizualizarea unor structuri virale în studiile de virologie modernă. Este un instrument folosit mai ales în studiile de virologie fundamentală, rezoluțiile apropiindu-se de cele de microscopie electronică. Prin aceste studii au fost documentate o largă serie de modificări structurale, dintre cele mai spectaculoase fiind legate de structura capsidului viral. Ceea ce este remarcabil pentru acest tip de tehnică este că probele pot fi analizate în aer (uscate) sau în lichid. Probele nu trebuie să fie fixate ca cele pentru microscopie electronică iar analizele nu se fac în vid. Ca urmare tehnica este nedistructivă și poate fi aplicată inclusiv structurilor moi.

Microscopia de forță atomică a fost inventată de Gerg Bininig, laureat al premiului Nobel în 1986 pentru tehnica microscopiei de scanare prin efect tunel, care în același an publică un articol ce descrie principiile microscopiei de forță atomică. Ceea ce au observat și propus autorii a fost un nou sistem bazat pe observațiile de la studiile de microscopie de scanare prin efect tunel unde au constatat că se poate detecta mișcarea și se poate măsura deplasarea unui sistem de tip grindă în consolă (cantilever beam în engleză) care are atașată o masă extrem de mică, forțele fiind de $10^{-18}N$, suficiente pentru a detecta interacțiunea cu atomi și molecule individuale și care poate sesiza deplasări de $10^{-4}A$. Ei explicau plastic în articol că "a fost o practică obișnuită de a folosi deplasarea arcurilor ca o măsură a forței iar metodele anterioare s-au bazat pe câmpuri electrostatice, câmpuri magnetostatice, optice unde și raze X." Ca urmare s-a dezvoltat un nou tip de microscop din clasa celor cu sonda de scanare bazat pe interacția cu atomi și a căror forțe sunt suficiente pentru determinarea profilului suprafețelor. Principiul este remarcabil de simplu, partea de complexitate fiind legată de achiziția și prelucrarea informației.

Un dispozitiv AFM se bazează pe un cantilever, sistemul de tip grindă în consolă a cărui denumire engleză acceptată în tehnica AFM o vom folosi în continuare de mici dimensiuni. Acesta este construit de obicei din siliciu sau nitru de siliciu, mărimea sa este în zona micrometrilor: lungimea - de ordinul unor sute de microni, lățime de ordinul unor zeci de microni și grosimea de ordinul micronilor. Tipul de material din care este făcut determină constantele de oscilație (modulul lui Young). La capătul său este plasată o mică piramidă, un vârf mic și ascuțit de ordinul zecilor de microni, lungimea și înălțimea variind în funcție de tipul cantileverului. Condiția este ca vârful să fie ascuțit, raza de curbura în vârf trebuind să fie sub 10 nm. Poziția cantileverului este evidențiată cu sistem optoelectronic în care o rază laser este trimisă spre cantilever, iar poziția razei reflectate este detectată cu un senzor bazat pe fotodiode. Suprafața probei este scanată pe direcția planului atât pe axa X cât și pe axa Y iar

deviația cantileverului este detectată cu sistemul descris, astfel încât în urma prelucrării semnalului să se obțină o imagine a topografiei obiectului scanat. Scanarea se realizează folosind un cristal piezoelectric care definește pozițiile x - y . Aceasta presupune contactul dintre vârful cantileverului și probă iar pentru instrumentul AFM, tehnic se spune că este operat în modul de contact. De fapt vârful sondei trece peste suprafața pe care nu o atinge de fapt într-un sens fizic, ci interacționează prin un complex de forțe atomice foarte aproape de ea.

Deoarece de multe ori acest sistem este dezavantajos ca sensibilitate și flexibilitate la aparatele moderne, cantileverul este plasat pe un sistem piezoelectric care oscilează cu frecvența de rezonanță a acestuia. Acest lucru permite scanarea obiectului doar prin atingeri repetate fără a fi în contact permanent iar modul de lucru se numește de contact intermitent (tapping). Mai mult, informațiile sunt primite și prin oscilația comună a cantileverului și mediului, aceste frecvențe pot fi modulate, permițând ajustarea poziției pe înălțime. Mai mult, la acesta oscilație comună se schimbă faza semnalului ceea ce permite înregistrarea unei imagini de fază.

„Imaginea de fază” în AFM se referă la înregistrarea semnalului în general în analizele cu contact intermitent. Schimbarea de fază poate fi considerată o „întârziere” în oscilația cantileverului pe măsură ce se deplasează în apropierea eșantionului. Imaginea rezultată seamănă oarecum cu contrastul de fază din microscopia clasică.

Semnalul de fază este sensibil la variațiile de compoziție, aderență, viscoelasticitate, precum și la alți factori. Ca urmare, contrastul de fază este văzut într-o mare varietate de materiale cu proprietățile diferite, dar reflectă și diferențe topometrice (diferențe de înălțime și înclinație). Acest lucru se datorează faptului că faza este într-adevăr o măsură a disipării energiei la contactul dintre vârf și probă, care depinde de o serie de factori, inclusiv caracteristici precum viscoelasticitate, aderență și, de asemenea, de profilul zonei de contact. În ciuda complicațiilor implicate în interpretare, contrastul de fază este una dintre cele mai frecvent utilizate tehnici pentru caracterizarea „mecanică” și a compoziției suprafețelor eșantionului.

În modul de operare de contact, datele pot fi obținute fie ca informații privind "înălțimea" sau "deformarea", fie datele din ambele moduri pot fi obținute simultan. În modul "înălțime", suprafața eșantionului este menținută la o distanță constantă de vârful sondei de către sistemul de poziționare piezoelectric de mai jos, printr-un mecanism de feedback. Deviația cantileverului în acest caz este foarte mică. În modul "deformare", eșantionul este staționar și se colectează date reale de deformare date de acțiunea cantileverului. Acesta exercită o forță pe suprafața substratului de ordinul 10^{-9} - 10^{-12} N/m și se pot estima proporțiile materialului. Cu cât este mai mare forța dintre sondă și suprafață, cu atât sonda este mai sensibilă. Pe de altă parte, cu cât forța este mai mare, cu atât sonda poate perturba suprafața.

Cu privire la contribuția dimensiunii vârfului asupra formei imaginii se cunoaște că imaginea rezultată depinde de acesta. La achiziția informației pentru obținerea imaginii partea vârfului cantileverului care intră în contact cu obiectul începe să producă o deviere a cantileverului înainte ca vârful să ajungă de fapt la obiect. În mod similar, partea opusă a vârfului este încă în contact cu obiectul chiar și după ce vârful în sine a trecut. Astfel, deformarea totală implică o dimensiune laterală care este mai mare decât dimensiunea sa reală. Diferența dintre dimensiunile estimate și cele reale este dependentă de lățimea vârfului

cantileverului. Cu cât vârful este mai ascuțit, cu atât dimensiunile observate sunt mai precise și rezoluția este mai mare.

Cu toate că rezoluția laterală, limitată de lățimea vârfului cantilever, este de câțiva nanometri, rezoluția înălțimii este excepțională, de aproximativ 0,5 nm. AFM produce imagini tridimensionale, topologice, care descriu cu precizie caracteristicile de suprafață ale virusului sau materialului biologic studiat. Pe de altă parte apar modificările de fază datorate nu numai diferențelor de înălțime, ci și modificărilor naturii interacțiunilor atomice agregate, ca măsură a proprietăților fizice sau chimice ale suprafeței eșantionului, determinând o imagine de fază. Cele două imagini, cea topografică și cea de faza pot evidenția proprietăți diferite.

Operarea cu modul de contact intermitent într-un mediu lichid prezintă unele complicații din cauza dinamicii fluidelor, ca urmare proba de studiat trebuie fixată sau trebuie folosite preparate ce o fac să adere ferm la suprafața substratului care poate fi sticlă, mică, plastic sau orice alt material dur. Pentru a realiza acest lucru, poate fi necesar să fie tratat substratul cu diferiți reactivi, cum ar fi poli-l-lizină, pentru a induce aderența probelor.

Cu privire la dimensiunea imaginii zonele câmpurilor de scanare pot varia între 20 nm și 150 μm^2 , cu rezoluții verticale de o fracțiune de nanometru. Ca urmare acest procedeu oferă detalii topografice precise pe o gamă de dimensiuni utile pentru analiza virusurilor și fragmentelor virale. Rezoluția laterală variază în funcție de caracteristicile vârfului și de deformabilitatea specimenului dar și de structura vârfului. Vârfulurile disponibile în comerț au raze de curbură în intervalul de 5-20 nm și oferă rezoluție la fracțiuni din aceste dimensiuni.

Un parametru fundamental pentru particulele de virus este diametrul lor, iar AFM poate oferi măsuri ale acestora ca virusuri hidratate, cât și ca particule uscate, ceea ce oferă, de asemenea, o estimare a gradului de contracție pe care îl suferă ca urmare a deshidratării. Din cauza rezoluției laterale ce depinde de dimensiunea vârfului este oarecum nepractic să se măsoare dimensiunile liniare direct de către AFM. Este mai sigur să se măsoare înălțimile obiectelor la care rezoluția este bună.

Pentru particulele sferice și cilindrice simetrice, măsurătorile dau valori precise pentru diametrele lor, iar măsurătorile individuale sunt de obicei însoțite de erori mai mici de 5%. Prin efectuarea măsurătorilor pentru un număr semnificativ de particule în câmp și folosind diferite direcții de scanare, se pot obține statistici bune și se pot calcula histograme ale distribuțiilor ale dimensiunilor lor. În cazul în care distribuția este una gaussiană simplă, atunci se poate presupune că particulele sunt omogene. Suprafețele particulelor de virus variază topografic în funcție de compoziția și starea lor. Aceleași considerații pot fi făcute asupra fragmentelor virale la care se pot de asemenea determina proprietățile.

Pentru vizualizarea prin microscopie de forță atomică particulele virale / fragmentele au fost imobilizate electrostatic pe sticlă tratată cu polilizină (15 minute la temperatura camerei) și apoi spălate în volume mari de apă distilată în vederea înlăturării componentelor tamponelor (săruri, detergenți) și uscate în aer la temperatura camerei. Imaginile de topografie și faza au fost înregistrate în modul oscilant (AC) pe un microscop de forță atomică (Witec Alpha300 RAS) cu bucla de control pe amplitudine utilizând un cantilever cu raza nominală a vârfului de 15 nm.

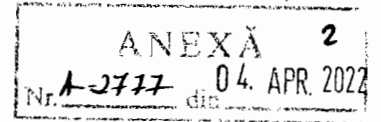
Pentru imobilizarea virusului pe lamelă, lamelele de microscopie sunt curățate înainte de a fi folosite cu apă bidistilată, izopropanol cu care le lasă în contact cca. 5 minute și clătite din nou cu apă. După curățare, spoturile unde vor fi imobilizate probele sunt tratate cu 5 μ l polilizină 0.01% și se lasă să acționeze timp de 5 minute, în cameră umedă, pentru a preveni uscarea. După cele 5 minute, lamela se clătește cu apă bidistilată și se lasă să se usuce. Pe spoturile uscate se pipetează 2 μ l de probă de suspensie virală (concentrația pentru o acoperire optimă a suprafeței este de 50 μ g/mL) și se lasă în contact 15 minute, în cameră umedă, pentru a preveni uscarea probei. După cele 15 minute de legare pe suprafață se clătește lamela cu apă bidistilată și se lasă să se usuce.

Analiza AFM este efectuată în aer, în modul de contact intermitent la o frecvență de \sim 70kHz, folosind un cantilever cu diametrul nominal de 20nm și o constanta de forță de 2 N/m.

Pentru evaluarea cantitativă a numărului și distribuției pe dimensiuni a particulelor virale / agregatelor proteice prezente în probele analizate, elementele particulare prezente în imaginile de topografie AFM înregistrate pe o suprafață de 10 x 10 μ m au fost identificate și segmentate în Gwyddion pe baza intensității fiind calculat diametrul mediu, volumul și suprafața în plan pentru fiecare dintre ele.

Nu s-au observat diferențe majore în privința distribuției diametrelor particulelor virale depuse în medii diferite, de exemplu tampon fosfat sau tampon HEPES potasiu. În schimb, diferențe mici de fragmentare sunt detectabile. De exemplu în prezență de Triton-X100 se poate observa ca, în timp ce în tampon fosfat dispar aproape total particulele de dimensiuni de peste 100 nm, în HEPES-potasiu solubilizarea proteinelor virale este doar parțială, rămânând o populație semnificativă de particule în zona de dimensiuni a virusului întreg. La îndepărtarea Triton-X100, numărul particulelor de dimensiuni mari crește semnificativ, în comparație cu proba ce conține încă detergent, indicând o reorganizare / agregare parțială a proteinelor virale hidrofobe.

Sistemul diferențiază între virusurile întregi și cele reasamblate pentru că după înlăturarea detergentului componentele virale reagregă și par întregi pentru alte tehnici. În acest procedeu particulele virale întregi sunt diferențiate de agregatele virale, având un profil cu aspect de „pălărie” (fig.6 și fig. 7). Acest profil este cauzat de uscarea virusului. După uscare are înălțimi mai mici, de 30-40 nm. Totuși amprenta lui rămâne mai mare fiind apropiat de dimensiunea așteptată de 100 nm incluzând deviația determinată de mărimea vârfului. Acest lucru nu influențează statistica de determinate a distribuției particulelor, axa fiind doar deplasată cu o mărime comparativă cu a vârfului de măsură.



Revendicări

1. Folosirea procedului de analiza prin microscopie de Foarță atomică in analiza fragmentarii virusului gripal in produsul vaccin gripal inactivat și fragmentat.
2. Diferențierea între formele de re-agregate virale si virusurile întregi prin analiza fragmentării prin microscopie de forță atomică și aplicațiile ce deriva din aceasta pentru proprietățile vaccinului gripal inactivat și fragmentat analizate prin acest procedeu.

Desene

Fig. 1 virus gripal întreg A/Texas/50/2012, reasortant: A/H3N2/NYMC/X-223 : A – imagine de topografie, B – imagine de fază

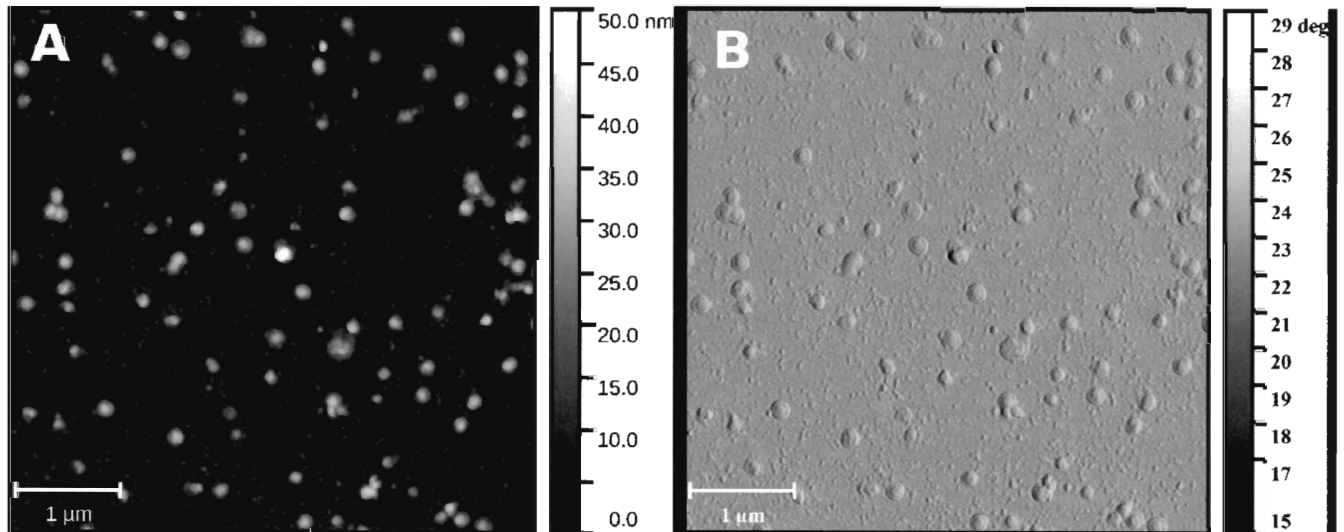


Fig. 2 virus gripal întreg B/Massachusetts/2/2012-like virus, reasortant: B/NYMC/BX-51B : A – imagine de topografie, B – imagine de fază

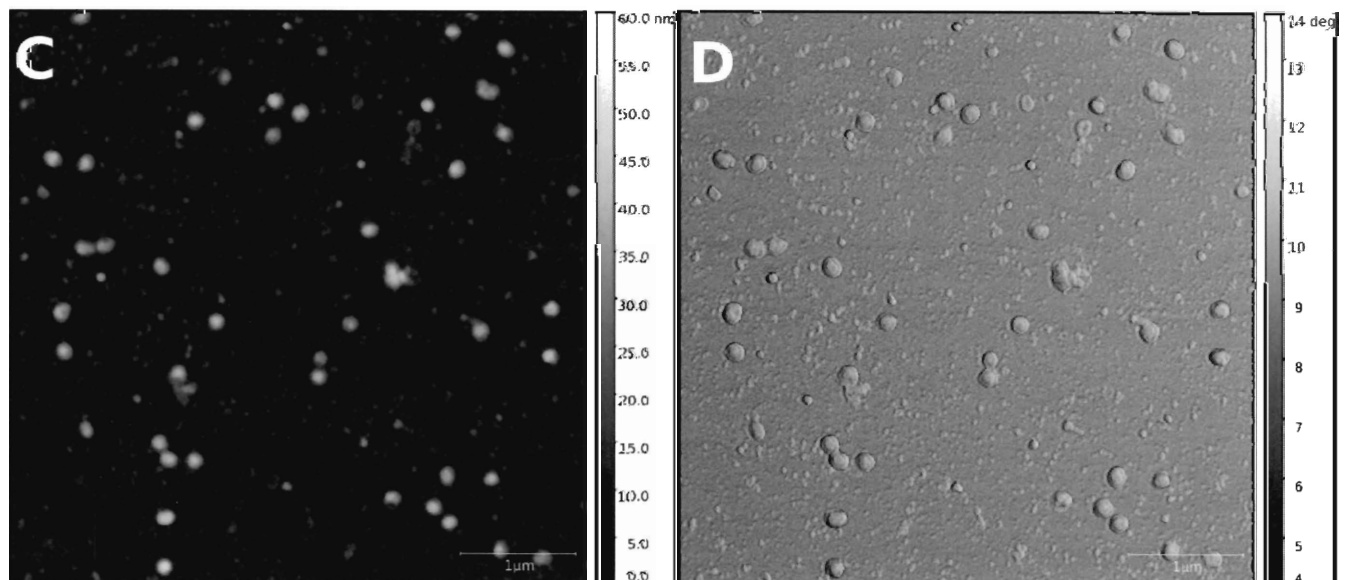
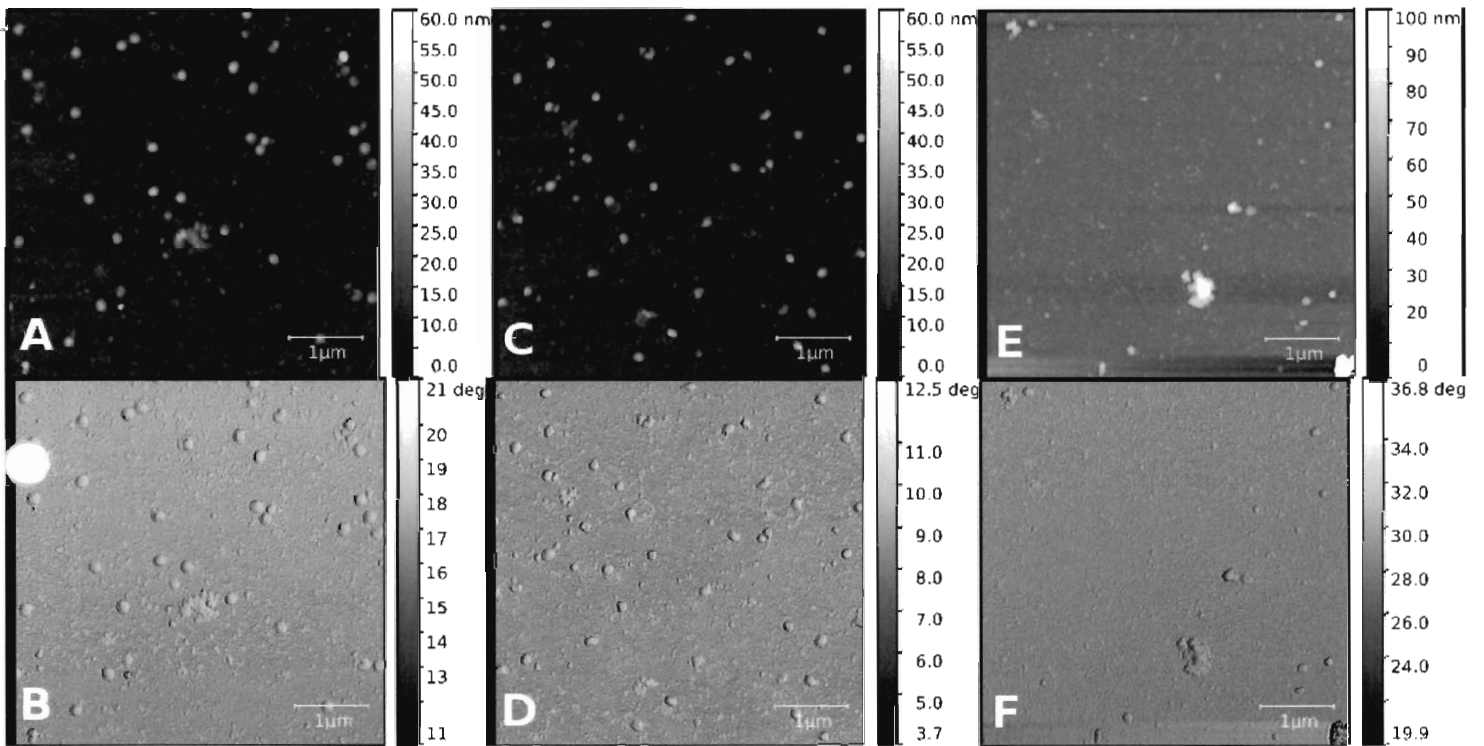


Figura 3. Grade diferite de fragmentare ale virusului gripal B/Massachusetts/2/2012-like virus, reasortant: B/NYMC/BX-51B A și B (topografie și fază) concentrație mică de detergent și grad mic de fragmentare, C și D (topografie și fază): concentrație medie de detergent și grad mediu de fragmentare, E și F (topografie și fază): concentrație mare de detergent și grad mare de fragmentare.



Creste conc. de detergent si gradul de fragmentare

Figura. 4 Imagini AFM reprezentative cu particule virale immobilizate pe sticlă tratată cu polilizina; A-E - imagini topografice, F - imagine de fază; A - virus întreg din 25mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl; B - virus fragmentat cu 0.5% Triton X-100 in 25mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl; C - B după înlăturarea detergentului; D - virus întreg din TFS; E - virus fragmentat cu 0.5% Triton-X100 in TFS; F - detaliu din imaginea de fază;

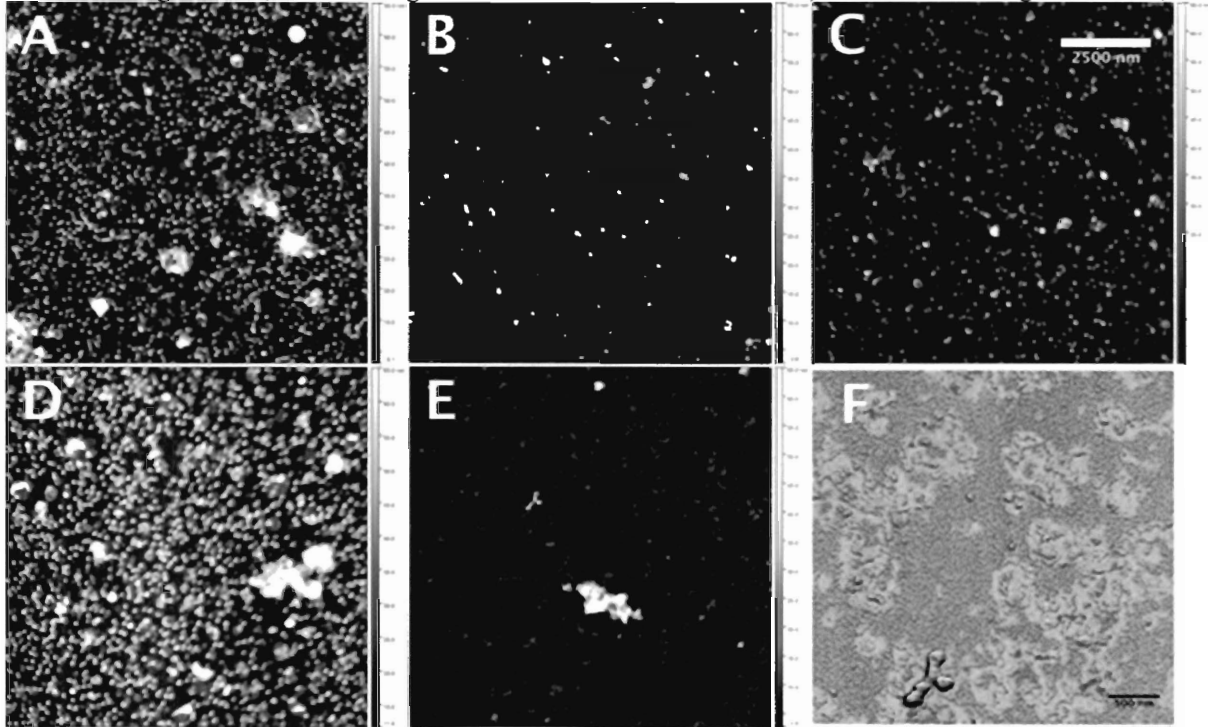


Figura 5. Distribuția diametrului particulelor virale / agregatelor proteice immobilizate pe polilizină, măsurată din imaginile de topografie AFM; K - virus întreg din 25 mM HEPES, 100 mM KCl; KF - virus fragmentat cu 0.5% Triton X 100 in 25 mM HEPES, 100mM KCl; KX - KF după înlăturarea detergentului pe XAD4; P - virus întreg din TFS; PF - virus fragmentat cu 0.5% Triton X 100 in TFS;

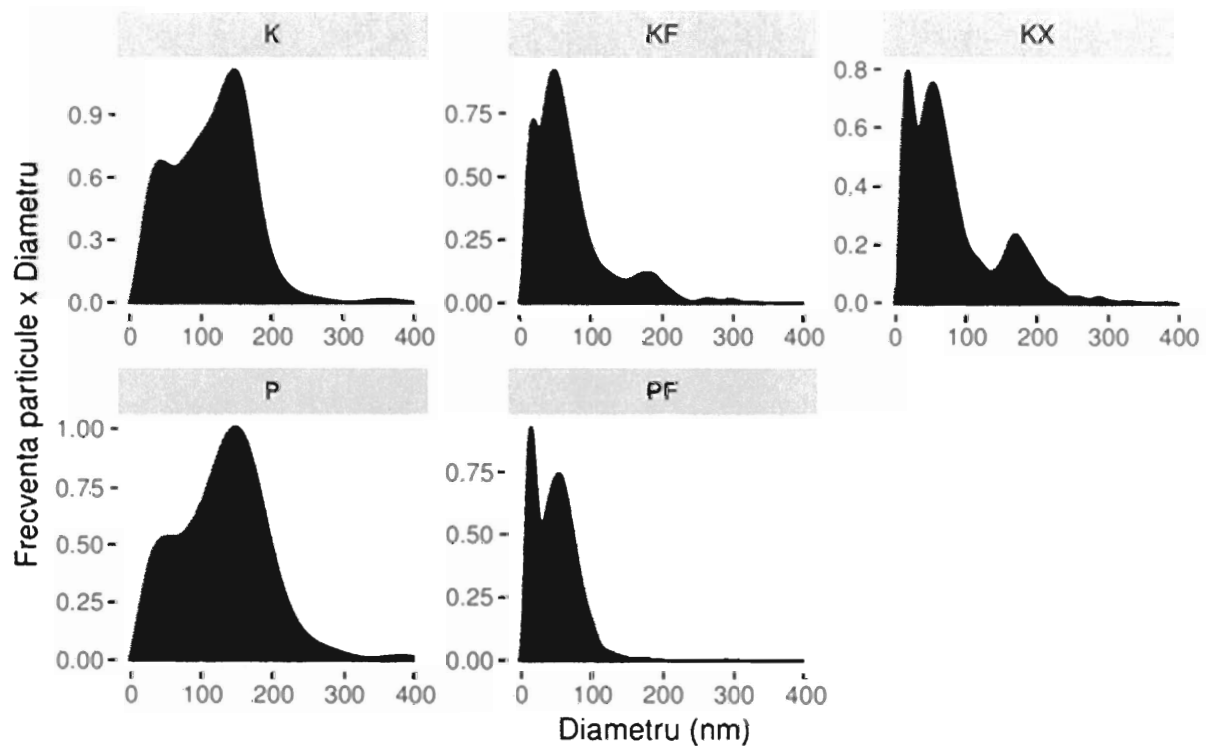


Figura 6 Detaliu virus gripal întreg A/Texas/50/2012, reasortant: A/H3N2/NYMC/X-223 : stânga – imagine de topografie, dreapta – imagine de fază

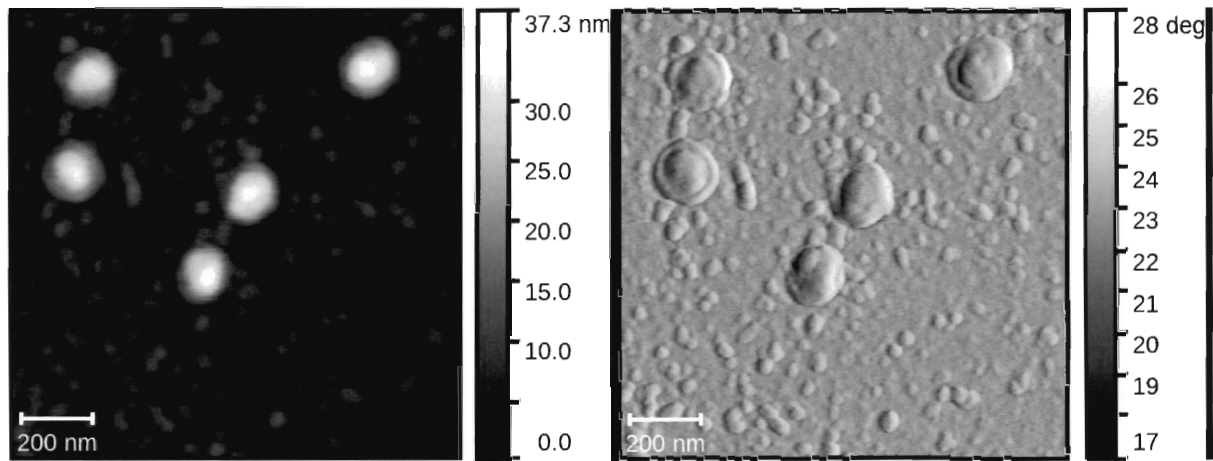


Figura 7 Detaliu virus gripal întreg B/Massachusetts/2/2012-like virus, reasortant: B/NYMC/BX-51B stânga – imagine de topografie, dreapta – imagine de fază

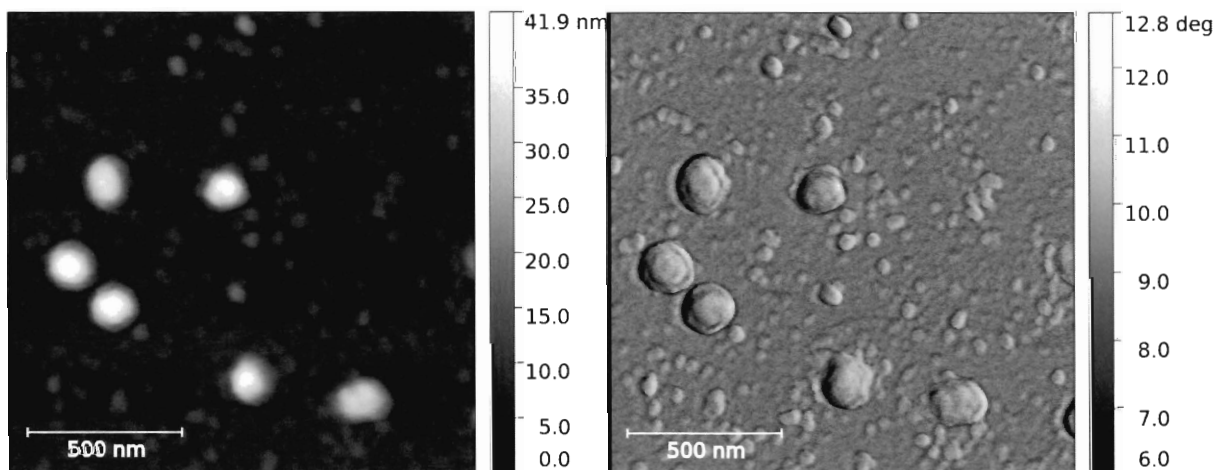


Figura 8 Profil virus gripal întreg A/Texas/50/2012, reasortant: A/H3N2/NYMC/X-223 neinactivat, uscat pe lamelă.

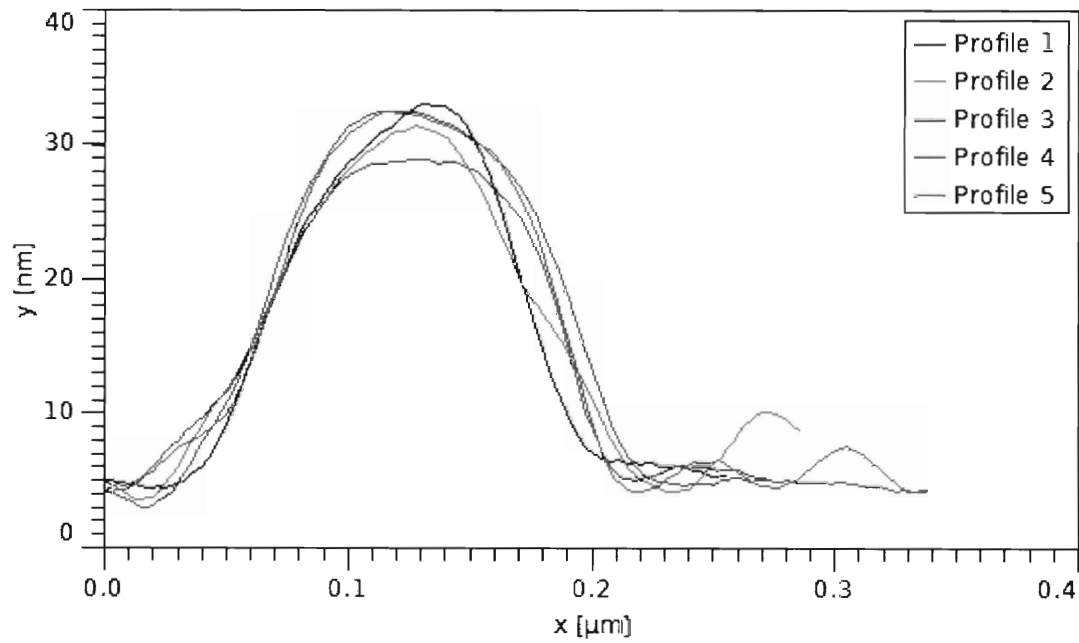


Figura 9. Profil virus gripal întreg B/Massachusetts/2/2012-like virus, reasortant: B/NYMC/BX-51B inactivat, termic uscat pe lamelă.

