



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 120**

51 Int. Cl.:
C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03726841 .4**

86 Fecha de presentación : **13.05.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1506287**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **Procedimientos de purificación de adenovirus.**

30 Prioridad: **14.05.2002 US 380332 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Merck & Co., Inc.**
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065-0907, US

72 Inventor/es: **Konz, John, O., Jr.;**
Lee, Ann, L.;
Goerke, Aaron, R. y
To, Chi Shung Brian

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 285 120 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de purificación de adenovirus.

5 **Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio, a tenor del artículo del código 35 U. S. C. § 119 (e), a la solicitud de Estados Unidos N° de serie 60/380.322, presentada el 14 de mayo de 2002.

10 **Declaración con relación A I + D patrocinado federalmente**

No aplicable

Referencia al apéndice de microficha

15 No aplicable.

Campo de la invención

20 La presente invención se refiere a procedimientos de purificación de partículas de virus, especialmente partículas de vectores de adenovirus recombinantes. Este procedimiento se desarrolla para purificar adenovirus a partir de lisado de células. Usa una combinación de precipitación selectiva, filtración en profundidad y/o centrifugación, ultrafiltración, digestión por nucleasa y cromatografía para producir de manera fuerte y económica producto altamente purificado. En este procedimiento, los niveles de ADN de células huésped contaminantes se reducen de manera consistente a menos del límite de cuantificación de un ensayo a base de PCR específico de ADN humano (< 5 pg/10¹¹ vp).

Antecedentes de la invención

30 Los avances en las áreas de del uso de vectores víricos recombinantes para terapia génica y aplicaciones de vacunación de ADN han creado una necesidad para la fabricación y purificación a gran escala de virus de calidad clínica. Una familia de tales virus son los adenovirus. Los adenovirus están agrupados dentro de la familia de *Adenoviridae*, que están divididas en el género *Aviadenovirus* (pájaros) y *Mastadenovirus* (humano, simio, bovino, equino, porcino, ovino, canino y de zarigüeya). Una revisión de la familia de *Adenoviridae* se puede encontrar en *Fundamental Biology*, edición 3ª, Fields, B.N.; Knipe, D.M. y Howley, P.M. eds., capítulo 30, p. 979-1016 (1996), que se incorpora en esta memoria descriptiva por referencia. De interés específico en las aplicaciones de la vacunación génica y/o terapia génica es el uso de un adenovirus incompetente de replicación de primera generación (FG), mutilado por las supresiones de los genes E1 y/o E1/E3, basándose en el serotipo 5 de adenovirus. El adenovirus tiene un amplio tropismo celular que incluye células que presentan antígenos profesionales tales como macrófagos y células dendríticas, pueden infectar (si no replicar en) células de la mayoría de las especies de mamíferos, y se pueden producir en grandes cantidades en líneas celulares humanas apropiadas diseñadas para proporcionar el producto génico F1 en *trans*. El genoma del adenovirus en general está asociado a patologías benignas en los seres humanos, y la organización genómica del virus se ha estudiado bien desde su descubrimiento a principios de los años 1950. Además, el genoma es susceptible de manipulación, dependiendo de la estrategia utilizada para construir el vector respectivo. Un virus incompetente de replicación (tal como un vector Ad5gag con supresión de E1/E3 que expresa un transgen gag de VIH, como se ejemplifica en esta memoria descriptiva) requiere una línea celular que complementa las supresiones. Cualquiera de tales líneas celulares se puede usar para generar vectores de virus recombinantes, con preferencia, pero sin limitación, líneas celulares que incluyen células 293 y células PER.C6TM. Con este fin, se han descrito en la bibliografía numerosos vectores de adenovirus recombinantes de primera generación (por ejemplo, véase Bett y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8802-8806; documentos WO 01/02607 y WO 02/22080). Los vectores adenovíricos "Cobarde" son un vector adenovírico de 2ª generación desprovisto generalmente de secuencias que codifican proteínas víricas, frecuentemente con proteínas víricas complementadas en *trans* por un virus auxiliar (a menudo un adenovirus con supresión de E1) desarrolladas con el adenovector dependiente del auxiliar (HD) en la línea celular empaquetada (por ejemplo PER.C6TM). Las proteínas víricas ausentes, estos vectores víricos pueden, como alternativa, estar complementados *in trans* por una línea celular y/o "virus auxiliar" capaz de expresar las proteínas adenovíricas estructurales y funcionales necesarias para la replicación exitosa, empaquetamiento y rescate. En vista del incremento de popularidad de estos vectores víricos y la última necesidad de preparar cantidades a escala comercial de o bien vacunas basadas en virus o vehículo de terapia génica, se ha convertido en esencial concebir procedimientos económicos y a escala de producción y purificación.

60 Las reseñas tempranas de purificación cromatográfica a pequeña escala se reseñaron a finales de los años 1950 y principio de los años 1960 (por ejemplo, véase Klemperer y Pereira 1959, *Virology* 9: 536-545; Philipson, *Virology*, 1960, *Virology* 10: 459-465; harina, y col., 1961, *Virology*: 13 264-267), pero se recolocó por centrifugación en un gradiente de CsCl. En la última década se ha reseñado de nuevo la purificación cromatográfica de adenovirus.

65 La patente de Estados Unidos N° 5.837.520 (véase también Huyghe y col., 1995, *Human gene Therapy* 6: 1403-1416) describen un procedimiento de purificación de adenovirus que comprende el tratamiento del lisado de células con una nucleasa, seguido de (1) cromatografía de intercambio de aniones y (2) cromatografía de ion metálico.

ES 2 285 120 T3

La patente de Estados Unidos N° 6.261.523 describe un procedimiento de purificación de adenovirus que comprende someter una preparación de virus a cromatografía de intercambio de aniones seguido de cromatografía de exclusión por tamaño.

5 La patente de Estados Unidos N° 6.194.191 describe procedimientos de purificación de adenovirus que usan velocidades de perfusión bajas durante el cultivo de células, y una etapa de lisis de detergente, y/o una sola etapa de cromatografía.

10 Shabram y col., 1997 (Human Gene Therapy 8: 453-465) describen un procedimiento para medir la concentración de Ad5 con cromatografía de intercambio de iones analítica.

A pesar de estas y otras reseñas, permanece una necesidad para el desarrollo de un procedimiento a gran escala para la purificación de vectores víricos generados dentro de sistemas de cultivos de células huésped que se refieren tanto a publicaciones cuantitativas como cualitativas que se imponen tras una vacuna comercializada o producto de terapia génica. La presente invención se refiere y reúne estas necesidades mediante la descripción de un procedimiento de purificación que, en parte, depende de una etapa de precipitación selectiva que facilita la eliminación de extensas cantidades de ADN contaminante / impuro mediante clarificación.

Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a procedimientos de purificación de partículas de virus. A este fin, la presente invención se refiere a procedimientos de purificación de partículas de virus a partir de un lisado celular que comprende precipitar de manera selectiva las impurezas de las moléculas de ácido nucleico (ADN) separándolas así de las partículas de virus dentro del medio de cultivo de las células huésped después de la lisis mediante la adición de un agente de precipitación selectiva de manera que al menos aproximadamente el 80% de las moléculas de ácido nucleico de las células huésped precipitan a partir del medio que contiene las partículas de virus. Como se describe en esta memoria descriptiva, la etapa inicial permite la precipitación selectiva del ADN impurificado, tal como el ADN de la célula huésped, con al menos una reducción del 80% en ADN contaminante, y como se ejemplifica en esta memoria descriptiva, incluso al menos una reducción del 80% hasta aproximadamente una reducción del 90% en ADN impurificado después de la clarificación. Un virus preferido para la purificación mediante los procedimientos descritos en esta memoria descriptiva es cualquier serotipo de adenovirus. El serotipo de adenovirus a purificar es o bien un tipo salvaje, modificado o forma recombinante del serotipo de adenovirus respectivo. La presente invención se ejemplifica, pero no significa, que se limite, a un procedimiento de purificación de las partículas del vector del adenovirus 5, las partículas del vector del adenovirus 6 y las partículas del vector del adenovirus 35 recombinantes. Otras partículas de adenovirus preferidas para la purificación mediante los procedimientos descritos en esta memoria descriptiva incluyen, pero no se limitan a, partículas del adenovirus 26 y partículas del adenovirus 36.

La presente invención se refiere a en parte a una etapa preferida en el proceso de purificación, a saber la inclusión de una etapa de precipitación selectiva después de la lisis mediante la adición de al menos un (os) agentes de precipitación selectivos que incluyen pero no se limitan a detergente catiónico) que, cuando se compagina de manera preferible con clarificación, da como resultado la eliminación de ácidos nucleicos y otros desechos celulares que también pueden incluir cápsides víricas vacías. La metodología descrita en esta memoria descriptiva da como resultado un procedimiento más robusto y económicamente factible para preparar grandes cantidades de calidad comercial de partículas de adenovirus altamente purificadas. Los niveles de ADN de las células huésped residuales se reducen de manera consistente a menos del límite de cuantificación de un ensayo basado en Q-PCR (< 5 pg/10¹¹ vp). Como se ha descrito en esta memoria descriptiva, una referencia a una "etapa de precipitación selectiva después de la lisis", "etapa de precipitación selectiva", "precipitación selectiva" o similares significa que se refiere a una etapa de precipitación en la que se añade un agente de precipitación selectiva (SPA) hasta un cierto intervalo de concentración en la preparación, provocando un alto porcentaje de moléculas de ácido nucleico contaminante (por ejemplo, ADN) a precipitar de manera selectiva separándolas así del virus respectivo.

El procedimiento de la presente invención incluye, pero no requiere necesariamente las siguientes etapas de procedimiento:

55 (1) liberar las partículas de virus de las células infectadas mediante una etapa de lisis tal como una etapa de lisis por detergente; (2) precipitación selectiva para eliminar un alto porcentaje de ácidos nucleicos contaminantes; (3) filtración profunda y/o centrifugación para eliminar los desechos de células y precipitado de ácido nucleico; (4) ultrafiltración para reducir volumen y tampón de intercambio; (5) tratamiento de nucleasa para digerir el remanente de ácidos nucleicos y facilitar la eliminación; (6) cromatografía de intercambio aniónico para purificar el virus de contaminantes celulares, componentes de virus no ensamblados y cápsides vacías; (7) ultrafiltración de flujo tangencial para eliminar adicionalmente los contaminantes así como la introducción de un tampón de formulación; (8) filtración esterilizante de la preparación de virus; (9) opcionalmente, incluir una (s) etapa (s) adicional (es) para purificar además la preparación vírica, tal como una etapa de cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo, una etapa de adsorción de fase inversa, y/o una etapa de cromatografía de hidroxipatito; y (10) opcionalmente, una etapa previa a o junto con una cromatografía de intercambio aniónico que es una etapa de filtración para eliminar las partículas antes de la carga en una columna de cromatografía de intercambio aniónico. La tabla 1 esboza, un procedimiento por etapas ejemplificado de purificación de AdV.

ES 2 285 120 T3

La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de virus de tipo salvaje o recombinante, especialmente adenovirus de tipo salvaje recombinante, en el que una o más etapas del procedimiento ejemplificado (véase la tabla 1) se omiten. Tal omisión se puede utilizar por el experto en la técnica en una mezcla y base de coincidencia con el fin de generar un protocolo completo para la purificación de adenovirus que es cualitativamente aceptable y se formula a una concentración que permite las aplicaciones clínicas y/o comerciales. Cualquier tal procedimiento modificado preferiblemente, pero no necesariamente, incluyen al menos las siguientes etapas: (1) lisis de células; (2) precipitación de ADN selectiva después de la lisis; (3) clarificación del sobrenadante que contiene virus remanente, tal como mediante filtración profunda para retirar desechos de células y precipitado de ácido nucleico adicional, y (4) una etapa de filtración para concentrar el virus purificado hasta niveles útiles para las administraciones clínicas y/o comerciales y/o intercambiar el virus en un tampón apropiado.

Otra realización de la presente invención se refiere a la incorporación de cuatro etapas descritas anteriormente, a saber (1) lisis de células; (2) precipitación selectiva de ADN; (3) clarificación; (4) una etapa de concentración (con o sin un tratamiento por nucleasa; con la etapa adicional de (5), que en una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en cualquier orden razonable que da como resultado la recuperación de cantidades de calidad comercial de adenovirus.

La presente invención además se refiere a la incorporación de metodología adicional hacia abajo además de las etapas de 1-5 descritas en el párrafo anterior que incluye una o más, y en cualquier combinación razonable y/u orden, una etapa de ultrafiltración, una etapa de filtración para eliminar las partículas antes de cargar en una columna de cromatografía de intercambio iónico, una etapa de cromatografía alternativa u ortogonal (incluyendo pero sin limitación una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de hidroxipatito, y/o etapas de cromatografía de adsorción de fase inversa (por ejemplo, usando Amberlite XAD), y/o una etapa de filtración esterilizante.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a diversos procedimientos de purificación de partículas víricas, tal como adenovirus, que son más económicos y robustos que los procedimientos conocidos. Las solicitudes cromatográficas anteriores para la purificación de adenovirus se basan en la combinación de altas concentraciones de nucleasa y baja carga de adenovirus con el fin de generar resultados satisfactorios. Estos factores conducen a procedimientos que son antieconómicos e impracticables a escala superior. La presente invención supera estos problemas describiendo los procedimientos de purificación de partículas de virus, especialmente partículas de adenovirus, que comprende una etapa de precipitación selectiva hacia arriba que elimina la gran mayoría del ADN celular huésped cuando se combina con una etapa de clarificación. Esta etapa temprana para retirar los contaminantes de las células huésped permite la inclusión o exclusión de diversas etapas hacia abajo en diversas etapas y/u orden de etapa, dependiendo del nivel de pureza requerido para el producto vírico purificado final. Como ejemplos, pero sin limitaciones, las etapas hacia abajo adicionales incluyen cromatografía de intercambio aniónico, ultrafiltración y un tratamiento de nucleasa de baja concentración hacia abajo. Más específicamente, una etapa adicional preferida posterior a una etapa de precipitación selectiva es una etapa de cromatografía de intercambio aniónico en la que se añade poca o nada nucleasa. Se muestra en esta memoria descriptiva que este procedimiento permite cargar aproximadamente 5-20 veces la cantidad reseñada anteriormente de adenovirus en la columna debido a la previa precipitación de contaminantes. Tal etapa será útil para mejorar un producto de alta pureza. También, un procedimiento que incorpora la precipitación/clarificación selectiva de ADN mejora significativamente la eficacia de una etapa de ultrafiltración posterior. Y como se indica en esta memoria descriptiva, no se requiere una etapa de tratamiento por nucleasa pero opcionalmente se puede añadir para asegurar la robustez del procedimiento. Para muchas aplicaciones, la pureza del producto ultrafiltrado puede ser suficiente y la purificación cromatográfica se considera innecesaria. Para las aplicaciones de muy alta pureza, tales como lotes de calidad clínica o rellenos comerciales, o por razones alternativas tales como validación de eliminación, una o más etapas de cromatografía se pueden añadir. Como se ha mencionado anteriormente, la cromatografía de intercambio aniónico es extremadamente útil en tal procedimiento, dependiendo de la cuidadosa selección de resina y condiciones operativas (concentración de NaCl), así como la inclusión de un detergente (por ejemplo, PS-80) en los tampones de desarrollo que inhiben la agregación durante la carga y elución. De nuevo, la utilización global de la resina AEX se mejora 5-20 veces sobre los mejores procedimientos reseñados, con la capacidad ejemplificada utilizable, pero no limitada a $2,0 \times 10^{13}$ vp/ml de resina. Como alternativa o además de la cromatografía de intercambio aniónico, la adsorción de fase inversa también puede ser útil para reducir la concentración de impurezas. En particular, los detergentes introducidos durante el cultivo, lisis o precipitación se pueden eliminar selectivamente usando una etapa de adsorción de lote o basada en columna.

A este fin, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de partículas de virus, especialmente partículas de adenovirus, que se caracteriza por una etapa de precipitación selectiva después de la lisis que puede ser útil en combinación adicional con una etapa de clarificación y etapas óptimas de ultrafiltración, tratamiento de nucleasa, reducción de volumen y/o cambio de tampón.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de purificación de partículas de virus, especialmente partículas de adenovirus, en el que se utiliza una etapa de precipitación de ADN selectiva después de la lisis en combinación con una etapa de clarificación, una etapa de cromatografía de intercambio aniónico y una etapa de ultrafiltración, con tratamientos opcionales que incluyen pero no se limitan a un tratamiento de nucleasa, reducción de volumen y/o cambio de tampón.

La presente invención además se refiere a un procedimiento ejemplificado de purificación de partículas de virus, especialmente partículas de vectores de adenovirus recombinantes, como se describe en la Tabla 1.

ES 2 285 120 T3

La presente invención además se refiere a diversas modificaciones que se hacen evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva, tales modificaciones que utilizan un elemento central de una etapa de precipitación de ADN selectiva después de la lisis; una etapa que, cuando se combina con una etapa de clarificación, establece el resto del procedimiento de purificación generando un producto relativamente alto para la manipulación adicional. De este modo se hace evidente tras la revisión de esta memoria descriptiva que ninguna, una o más de una etapa de purificación adicional se puede añadir con la complacencia de los expertos en la técnica con el fin de generar un producto vírico purificado. Tales etapas adicionales pueden ser etapas descritas en esta memoria descriptiva (por ejemplo, véase la Tabla 1) o que se conocerían en la técnica.

Por lo tanto, las realizaciones preferidas de la presente invención se refieren a procedimientos de purificación de lotes de adenovirus que son de calidad clínica en cantidades comercialmente viables en los que el procedimiento comprende al menos una etapa después de la lisis de la etapa de preparación selectiva mediante la adición de un SPA que elimina la mayoría del ADN celular cuando se combina con al menos las etapas adicionales de clarificación y ultrafiltración. La inclusión de esta etapa de precipitación después de la lisis mejora de manera significativa la eficacia de cualquier (cualesquiera) etapa (s) de ultrafiltración posterior (es). Por lo tanto la metodología descrita en esta memoria descriptiva reúne la necesidad de un esquema de purificación de virus que permita a gran escala, los requerimientos de producción comerciales. Los procedimientos descritos en esta memoria descriptiva son especialmente útiles en la vacuna génica / terapia génica que permite superar muchos inconvenientes de los procedimientos de purificación vírica conocidos. Como se ha indicado a lo largo de esta memoria descriptiva, los procedimientos descritos en esta memoria descriptiva dan como resultado preparaciones concentradas de adenovirus con cantidades inapreciables de contaminación de ADN. Se prefiere que las preparaciones de adenovirus de la presente invención contienen adenovirus de al menos 1×10^{11} vp/ml, y preferiblemente mayor de 1×10^{12} vp/ml, mientras que tiene un nivel de ADN de célula huésped al menos menor de 100 picogramos/ 10^{11} vp, o además menos de 30 picogramos/ 10^{11} vp/ml, preferiblemente menos de 10 picogramos/ 10^{11} vp/ml, y los más preferible menos de 5 picogramos/ 10^{11} vp/ml.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de purificación de adenovirus, que al menos incluye la inclusión de una etapa de precipitación selectiva después de la lisis mediante la adición de un SPA que se puede acoplar con una (s) etapa (s) de clarificación adicional (es) y una (s) etapa (s) de ultrafiltración. Esta metodología promueve la eliminación de ácidos nucleicos y otros desechos celulares, dando como resultado cantidades de calidad comercial más robustas de partículas de adenovirus altamente purificadas.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento de purificación de adenovirus, que al menos incluye la incorporación de las cuatro etapas descritas anteriormente, a saber (1) lisis de células; (2) precipitación selectiva de moléculas de ácido nucleico mediante la adición de un SPA; (3) clarificación; (4) etapa de concentración (con o sin tratamiento de endonucleasa); con la etapa adicional de (5) una etapa de cromatografía de intercambio aniónico.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de purificación de adenovirus, que al menos incluye la incorporación de etapas además de las etapas 1-5 del párrafo anterior, que puede incluir cualquier combinación y orden razonable, una (s) etapa (s) de ultrafiltración, una etapa de filtración para eliminar las partículas antes de cargar en una columna de cromatografía de intercambio aniónico, una etapa de cromatografía alternativa u ortogonal (que incluye pero no se limita a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de hidroxapatito, y/o cromatografía de adsorción en fase inversa y/o una etapa de filtración esterilizante).

(2) Todavía otro objeto de la presente invención se ejemplifica como un procedimiento de purificación de adenovirus, que incluye, pero no requiere necesariamente casa una de las siguientes etapas del procedimiento: (1) liberación de las partículas de las células infectadas mediante una etapa de lisis tal como una etapa de lisis con detergente; (2) precipitación selectiva para eliminar un alto porcentaje de ácidos nucleicos contaminantes; (3) filtración profunda y/o centrifugación para eliminar los desechos de células y precipitado de ácido nucleico; (4) ultrafiltración para reducir volumen y tampón de intercambio; (5) tratamiento de nucleasa para digerir el remanente de ácidos nucleicos y facilitar la eliminación; (6) cromatografía de intercambio aniónico para purificar el virus de contaminantes celulares y componentes de virus no ensamblados; (7) ultrafiltración de flujo tangencial para eliminar adicionalmente los contaminantes así como la introducción de un tampón de formulación; (8) filtración esterilizante de la preparación de virus; (9) opcionalmente, incluir una (s) etapa (s) adicional (es) para purificar además la preparación vírica, tal como una etapa de cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo, una etapa de adsorción de fase inversa, y/o una etapa de cromatografía de hidroxapatito; y (10) opcionalmente, una etapa previa a o junto con una cromatografía de intercambio aniónico que es una etapa de filtración para eliminar las partículas antes de la carga en una columna de cromatografía de intercambio aniónico. La tabla 1 esboza, un procedimiento por etapas ejemplificado de purificación de Ad, en el que la combinación y/u orden de cada etapa de procedimiento respectiva puede ser capaz de ajustarse por el experto en la técnica.

Como se usa en esta memoria descriptiva “vp” se refiere a -partícula vírica-.

Como se usa en esta memoria descriptiva “AEX” se refiere a -cromatografía de intercambio aniónico-.

Como se usa en esta memoria descriptiva “CEX” se refiere a -cromatografía de intercambio catiónico-.

Como se usa en esta memoria descriptiva “TFF” se refiere a -filtración de flujo tangencial-.

ES 2 285 120 T3

Como se usa en esta memoria descriptiva “TNBP” se refiere a -fosfato de tri-n-butilo-.

Como se usa en esta memoria descriptiva “CPC” se refiere a -cloruro de cetilpiridinio-.

5 Como se usa en esta memoria descriptiva “DB” se refiere a -bromuro de domifeno-.

Como se usa en esta memoria descriptiva “CTAB” se refiere a -bromuro de cetil trimetilamonio-.

10 Como se usa en esta memoria descriptiva “BTC” se refiere a -cloruro de bencetonio-.

Como se usa en esta memoria descriptiva “TTA” se refiere a -cloruro de tetradeciltrimetil amonio-.

Como se usa en esta memoria descriptiva “PS-80” se refiere a -polisorbato 80-.

15 Como se usa en esta memoria descriptiva “SPA” se refiere a -agente de precipitación selectiva-. Un agente de precipitación selectiva se define en esta memoria descriptiva como cualquier agente, compuesto o tal que, cuando se añade a una preparación que contiene una población de virus, tal como adenovirus, y moléculas de ácido nucleico contaminante, afectará a la precipitación selectiva de al menos una cantidad sustancial de moléculas de ácido nucleico contaminante del virus respectivo.

20 Como se usa en esta memoria descriptiva el término “adenovirus” o “ad” o “AdV” se refiere a cualquier adenovirus, que incluye pero no se limita a cualquier serotipo de adenovirus que es un virus de tipo salvaje, un virus modificado (tal como un virus atenuado), y/o un virus recombinante, tal como cualquier serotipo de adenovirus que es, por ejemplo, un vector de adenovirus recombinante de 1º o 2ª generación que puede o no puede contener uno o más transgenes heterólogos insertados dentro del vector de adenovirus recombinante respectivo.

30 Como se usa en esta memoria descriptiva, el término “células huésped” o “línea celular huésped” se refiere a cualquier línea celular de mamífero que apoya la réplica de un virus, tal como un adenovirus de tipo salvaje, modificado o recombinante. Se apreciará que cualquiera de tales líneas celulares huéspedes se desarrolla en cultivo hasta una fase de crecimiento conocida en la técnica, seguido de la infección con una reserva de semilla del virus respectivo, después seguido de cultivo adicional en condiciones farmacéuticamente aceptables, dando como resultado la producción de una población de virus adicional, que se puede recoger mediante los procedimientos descritos en esta memoria descriptiva.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 muestra un ejemplo de cromatografía de intercambio aniónico preparativo (AEX). La alimentación se ajustó hasta aproximadamente 38 mS/cm y se cargó en la Source 15Q. La columna se lavó con 5 volúmenes de HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 0,39 M, PS-80 al 0,1%, pH 7,5 y un gradiente lineal se desarrolló a NaCl 0,47 M.

40 Las Figuras 2A, 2B y 2C muestran los resultados de los cromatogramas de ensayo de intercambio aniónico para la etapa de cromatografía preparativa AEX. (A) alimentación; (B) flujo a través; (C) combinación de productos. Las ID de los máximos son como sigue: impurezas 1 minuto-misc, PS-80; 7 minutos-proteína hexón; 11 minutos-partículas de AdV; 16 minutos-ácido nucleico.

45 La Figura 3 muestra un perfil de intercambio aniónico preparativo para el ejemplo 2. Se muestran la carga, lavado, y elución.

La Figura 4 muestra los perfiles de precipitación de adenovirus para los detergentes catiónicos BTC, DB, CTA., CPC y TTA.

50 La Figura 5 muestra los perfiles de precipitación de ADN para los detergentes catiónicos BTC, DB, CTA., CPC y TTA.

55 La Figura 6 muestra diversas capacidades para una filtración profunda de CE-25 y DE-45 en diversas condiciones de mezcla.

La figura 7 muestra un análisis de SDS_PAGE de un procedimiento por etapas de purificación de adenovirus (MRKAd5gag) a partir de 300 litros de un cultivo celular. La carga se normalizó hasta 6,4⁹ vp.

60 La Figura 8 muestra el análisis de proteína en gel SDS-PAGE en el intermedio del producto de intercambio aniónico (AEP) para tres preparaciones de adenovirus ejemplificadas. Todas las muestras cargadas a 1,19¹⁰ vp total. Banda (1) marcadores MW.; (2) 0112A; (3) 0112C; (4) 0114; (5) 0113A1; (6) 0113A2; (7) 0113A3; (8) 0113B; (9) 0113C; (10) 0113D.

65 La figura 9 muestra los tiempos de separación para diversos adenovirus recombinantes (Ad5, Ad24 y Ad35) mediante cromatografía de intercambio aniónico.

La Figura 10 muestra el efecto de concentración de bromuro de domifeno en diversos serotipos o adenovirus recombinante y ADN de cada virus recombinante respectivo.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de purificación de partículas de virus a partir de un lisado de células. A este fin, la presente invención se refiere a procedimientos de purificación de partículas de virus a partir de un lisado de células de un medio de cultivo de células que comprende precipitar de manera selectiva las moléculas de impurezas (ADN) (tal como ADN genómico de células huésped) de las partículas de virus dentro del lisado de células
10 mediante la adición de un agente de precipitación selectiva al medio de cultivo de células huésped después de la lisis de manera que al menos aproximadamente el 80% de moléculas de ADN impuras se precipitan del medio que contiene las partículas de virus. Como se describe en esta memoria descriptiva, esta etapa inicial permite la precipitación selectiva de ADN contaminante, con al menos una reducción del 80% del ADN contaminante, como se ejemplifica en esta memoria descriptiva, incluso aproximadamente una reducción del 90% en ADN después de la clarificación (por
15 ejemplo, filtración profunda o centrifugación y una etapa de filtración profunda de refinado). A este fin, la presente invención se refiere a procedimientos de purificación de virus, especialmente adenovirus, donde al menos 70%, o al menos 80%, o incluso al menos 90% de ADN contaminante (por ejemplo, impureza) se retira de las partículas de virus después de una etapa inicial después de la lisis de precipitación selectiva o una etapa de precipitación selectiva después de la lisis inicial seguido de una etapa de clarificación (por ejemplo, tal como filtración profunda o centrifugación y
20 una etapa de filtración profunda de refinado).

Aunque cualquier número de virus de tipo salvaje o modificados puede permitir esta metodología, un virus preferido es un adenovirus de tipo salvaje o modificado o vector adenovírico recombinante, ejemplificado en esta memoria descriptiva con un vector de adenovirus recombinante de serotipo 5, 6 y 35. Un virus preferido de purificación es cualquier adenovirus de tipo salvaje, modificado, mutado y/o recombinante (de nuevo, véase *Fundamental Biology*, 3ª Ed., Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Ed., en el capítulo 30, p. 979-1016 (1996)). La presente invención se refiere en parte a un procedimiento de purificación mediante el que se incluye una etapa después de la lisis al menos una etapa de precipitación selectiva mediante la inclusión de un agente de precipitación selectiva, que es preferiblemente un detergente catiónico, que elimina de manera eficaz la mayoría de las moléculas de ácido nucleico libres,
30 así como otros desechos celulares. La metodología de la presente invención da como resultado la recuperación de las cantidades comercialmente viables del vector de adenovirus con características de pureza excelentes, haciendo esta metodología especialmente útil para el llenado y distribución de vacunas a base de adenovirus o productos de terapia génica a base de adenovirus. La presente invención se refiere a procedimientos de obtención de virus purificado a partir de instalaciones de producción a gran escala que incluye, en un primer aspecto, una combinación de precipitación,
35 filtración profunda y/o centrifugación, ultrafiltración, digestión con nucleasa y cromatografía para de manera contundente y económica producir producto altamente purificado. Los niveles de ADN de células huésped residuales son consistentes por debajo de 5 pg/10¹¹ vp cuando se usan los procedimientos de al presente invención se ejemplifican en la Tabla 1. Será evidente para el experto en la técnica que una medición del contenido de ADN de las células huésped residuales no significa que se considere como una limitación a esta metodología. En su lugar, estos datos apoyan la esencia de la presente invención: una metodología a gran escala para la generación de partículas de virus que da como resultado un producto altamente purificado que se puede utilizar en escenarios clínicos y comerciales. Se puede hacer notar que la importancia de lograr los niveles de ADN particulares en el producto final es específico del producto. Los productos para uso parenteral en los seres humanos requerirán los patrones más rigurosos pero, incluso en ese caso, los objetivos pueden variar entre 100 pg/dosis hasta 10 ng/dosis ("WHO Requirements for the Use of Animal Cell as
45 *in vitro* Substrates for the Production of Biologicals (requirements for Biologicals Substances N° 50), WHO Technical Report Series, N° 878, 1998) o mayor, y probablemente se ajustan dependiendo de la indicación de los productos. Además, para los productos a base de adenovirus, la dosificación puede variar en varios órdenes de magnitud. Por lo tanto, no existe significación específica de lograr unos niveles residuales de ADN específicos inferiores (tal como por debajo de 5 pg/10¹¹ vp) y, en la mayoría de las aplicaciones, no es probable que sean de mucha consecuencia variaciones de varias veces alrededor del nivel entre lotes. Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, se prefiere que las preparaciones de adenovirus de al presente invención contengan adenovirus de al menos 1 x 10¹¹ vp/ml, y preferiblemente mayor de 1 x 10¹² vp/ml, mientras que tienen un nivel de ADN de células huésped residual al menos menor que 100 picogramos/10¹¹ vp, o además menos de 30 picogramos/10¹¹ vp, preferiblemente menos de 10
50 picogramos/10¹¹ vp.

55 La presente invención se refiere en parte a una etapa preferida en el procedimiento de purificación, a saber la inclusión de una etapa de precipitación selectiva después de la lisis que, cuando se combina preferiblemente con clarificación, da como resultado la eliminación de ácidos nucleicos residuales y otros desechos celulares, permitiendo de este modo la preparación de un procedimiento más contundente y económicamente factible para preparar grandes cantidades de calidad comercial de partículas de adenovirus altamente purificados. El procedimiento de la presente invención incluye, pero no requiere las siguientes etapas del procedimiento: (1) liberar las partículas de virus de las células infectadas mediante una etapa de lisis tal como una etapa de lisis por detergente; (2) precipitación selectiva para eliminar un alto porcentaje de ácidos nucleicos contaminantes; (3) filtración profunda y/o centrifugación para eliminar los desechos de células y precipitado de ácido nucleico; (4) ultrafiltración para reducir volumen y tampón de intercambio; (5) tratamiento de nucleasa para digerir el remanente de ácidos nucleicos y facilitar la eliminación; (6) cromatografía de intercambio aniónico para purificar el virus de contaminantes celulares y componentes de virus no ensamblados; (7) ultrafiltración de flujo tangencial para eliminar adicionalmente los contaminantes así como la introducción de un tampón de formulación; (8) filtración esterilizante de la preparación de virus; (9) opcionalmente

seguido de o añadido como una etapa anterior una etapa independiente, adicional para además purificar la preparación vírica, tal como etapa de cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo, una etapa de adsorción de fase inversa, y/o una etapa de cromatografía de hidroxipatito; y (10) opcionalmente, una etapa previa a o junto con una cromatografía de intercambio aniónico que es una etapa de filtración para eliminar las partículas antes de la carga en una columna de cromatografía de intercambio aniónico. La tabla 1 esboza, un procedimiento por etapas ejemplificado de purificación de Ad. Como se ha indicado anteriormente, una opción adicional al procedimiento descrito en esta memoria descriptiva es la adición de una etapa de filtración antes de o en combinación con cromatografía de intercambio aniónico. Es posible que en ciertos casos, (que puede depender de los componentes particulares del medio de cultivo así como de las propiedades de tanto la línea celular de producción como del producto), partículas pequeñas o “agregados” pueden o bien pasar a través de la etapa de clarificación principal o formarse durante el tratamiento de nucleasa o ultrafiltración, particularmente cuando la ultrafiltración incorpora una etapa de concentración. En este caso, se contempla una etapa de filtración adicional para eliminar estas partículas antes de cargar en la cromatografía de intercambio aniónico. El filtro se puede colocar en línea durante la carga de la columna, o se puede usar en una operación independiente. La ultrafiltración en general estaría acompañada de uso de filtros de cápsula o de cartucho desechables. Estos filtros terminal pueden ser profundos o basados en membrana. Los medios en estos filtros pueden ser polipropileno, celulosa, ésteres de celulosa, fluoruro de polivinilideno, nylon, poliétersulfona, o cualquier otro material que es consistente con la baja unión de producto; además de todos estos medios pueden estar presentes con o sin agentes modificantes tales como tierra de diatomeas y/o resinas que mejoran las propiedades del filtro. El tamaño nominal de tal filtro estaría entre 0,2 y 1 micrón.

La presente invención además se refiere a un procedimiento para purificar virus de tipo salvaje o recombinante, especialmente adenovirus de tipo salvaje o recombinante, en el que se omiten una o más etapas de un procedimiento ejemplificado (véase la Tabla 1). Tal omisión se puede utilizar por el experto en la técnica en base a una mezcla o de coincidencia con el fin de regenerar un protocolo completo para la purificación de adenovirus que es cualitativo aceptable y se formula a una concentración que permite las aplicaciones clínicas y/o comerciales. Cualquiera de tal procedimiento modificado preferiblemente, pero no necesariamente, incluirá al menos las siguientes etapas: (1) lisis de células; (2) precipitación de ADN selectiva después de la lisis; (3) clarificación del sobrenadante que contiene virus remanente, tal como mediante filtración profunda para retirar desechos de células y precipitado de ácido nucleico adicional, y (4) una etapa de filtración para concentrar el virus purificado hasta niveles útiles para las administraciones clínicas y/o comerciales y/o intercambiar el virus en un tampón apropiado.

Otra realización de la presente invención se refiere a la incorporación de cuatro etapas descritas anteriormente, a saber (1) lisis de células; (2) precipitación selectiva de ADN; (3) clarificación; (4) una etapa de concentración (con o sin un tratamiento por nucleasa; con la etapa adicional de (5), que en una etapa de cromatografía de intercambio aniónico.

La presente invención además se refiere a la incorporación de metodología adicional hacia a bajo además de las etapas de 1-5 descritas en el párrafo anterior que incluye una o más, y en cualquier combinación razonable, una etapa de ultrafiltración, una etapa de cromatografía alternativa u ortogonal (incluyendo pero sin limitación una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de hidroxipatito, y/o etapas de cromatografía de adsorción de fase inversa (por ejemplo, usando Amberlite XAD, y/o una etapa de filtración esterilizante).

Las etapas 1-4 se pueden extender a cualquier producto con características que permiten la precipitación selectiva de ADN basada en la carga y/o hidrofobicidad, con tal que el producto no esté inactivado por el agente selectivo. Por ejemplo, cualquier producto catiónico (o anión con una densidad de carga menor que ADN) debe permanecer libre en solución con ADN que precipita con detergentes catiónicos o polímeros). Los ejemplos ejemplares pueden incluir pero no se limitan a virus asociados a adeno (VAA), virus de papiloma humano (VPH) o VLP derivado de su (s) proteína (s) estructural (es), y virus de la hepatitis A (VHA). De particular interés es VAA, ya que la purificación que usa cromatografía de intercambio catiónico se ha demostrado y pueden ser necesarias instalaciones de producción a gran escala si se aprueba como vector para o bien productos de terapia génica o de vacuna. En ese caso, los detergentes catiónicos se pueden usar para precipitar tanto ADN de células huésped como adenovirus auxiliar contaminante. Después de clarificación, el VAA se puede además procesar mediante ultrafiltración y cromatografía, siendo el intercambio catiónico la etapa preferida y la cromatografía de intercambio aniónico añadida solamente si se desea una contundencia adicional. A este fin se debe hacer notar que un aspecto de la presente invenciones el uso específico de bromuro de domifeno como una precipitación selectiva para los esquemas de purificación que requieren la eliminación de cualquier número de componentes celulares, especialmente ácidos nucleicos, aparte de cualquier número de tipos diferentes de productos biológicos, que incluyen pero no se limitan a partículas de virus, partículas de tipo virus (por ejemplo, vacuna basada en VPH), o cualquier otro producto biológico que se puede separar sustancialmente de un producto contaminante a base de cultivos mediante una etapa de precipitación selectiva. Aunque un gran número de SPA se pueden usar para practicar la presente invención, el bromuro de domifeno es de particular interés debido principalmente a sus disponibilidad como una materia prima de calidad de GMP y de uso actual en otros productos propuestos para uso humano. Más específicamente, ya que el bromuro de domifeno se usa como ingrediente activo en productos de higiene oral así como cremas de antibiótico tópicos, esta molécula se produce en grandes cantidades y se liberan en condiciones de GMP. Se conoce en la técnica el uso de un agente de precipitación selectiva, y más específicamente a la precipitación de ácido nucleico del virus. El incremento de selectividad de Db se produce por su capacidad de discriminar fácilmente entre componentes de el corriente que poseen pequeñas diferencias en densidades de carga o carga global. La implementación exitosa de esta tecnología en corrientes que tienen diferencias mínimas en la densidad de carga (por ejemplo, adenovirus y ADN) realza su aplicación potencial a través de un número de aplicaciones comerciales actuales

o futuras. La gran ventana de procesamiento que acompaña tal aplicación se puede solamente incrementar tanto como los diferenciales de carga entre producto e impurezas. Selectivamente se puede además potenciar mediante la adición de sales inorgánicas o variando la resistencia iónica. Durante la precipitación, para los compuestos que también incorporan un grupo amonio, se sabe que las cargas positivas sobre las moléculas de detergentes neutralizan los grupos cargados negativamente sobre las moléculas que poseen un grado de electronegatividad. Una vez que las cargas sobre las moléculas están neutralizadas, las colas hidrófobas de las moléculas de detergente interactúan entre sí mediante interacciones hidrófobas, haciendo que los componentes solubles precipiten. La molécula de DB posee una similitud estructural a muchos detergentes catiónicos usados comúnmente ya que contiene un grupo amonio cargado aunque la combinación del (de los) grupo (s) amonio, éster (es), y anillo (s) benceno proporcionen selectividad y robustez adicional a las interacciones basadas en la carga de manera que se pueda implementar una tecnología novedosa (por ejemplo, que incluye, pero no se limita a moléculas de ADN, ARN, Proteínas, VLP, y polisacáridos).

De este modo la presente invención se refiere a la metodología que da como resultado la purificación de partículas de vector de adenovirus a partir de instalaciones de producción a gran escala que hacen comercialmente viables cantidades de virus recuperado así como mostrando también excelentes características de pureza. El término “gran escala” como se usa en esta memoria descriptiva se considera que es volúmenes totales de cultivo de células huésped mayores de aproximadamente 10 litros hasta aproximadamente 50.000 litros, siendo la norma procesamientos entre aproximadamente 300 litros y aproximadamente 20.000 litros.

En un aspecto ejemplificado de la presente invención, una combinación de etapas de lisis de células, precipitación con un SPA, filtración profunda y/o centrifugación, ultrafiltración, digestión por nucleasa y cromatografía se utilizan para producir de manera fuerte y económica producto altamente purificado, veles de ADN de células huésped residual de menos que los niveles detectables cuando se usa un ensayo de Q-PCR para ADN de células huésped. Una etapa de lisis inicial proporciona la liberación máxima de adenovirus intracelular a partir de las células huésped y proporciona un potencial para inactivar los agentes potenciales adventicios en particular, virus con envuelta tales como herpes virus o retrovirus) que pueden hipotéticamente contaminar el cultivo de células a un nivel bajo.

Como se ha indicado anteriormente, la primera etapa de lisis de células infectadas permite una recogida de virus tanto asociados (intracelular) como no asociados a células (extracelular) del medio de cultivo de células huésped. Como resultado, se proporciona flexibilidad en la selección de condiciones de cultivo que son óptimas para la productividad del virus global. Además, la presencia de detergente a lo largo del procedimiento minimiza la asociación del virus al ADN de las células huésped. La lisis por detergente de las células huésped, aunque es el procedimiento preferido de lisis de células huésped que contienen AdV, se pueden reemplazar por procedimientos de lisis no mecánica que permiten procedimientos de purificación a gran escala (tal como tratamiento por enzimas) y/o procedimientos fragmentación mecánica (tal como ultrafiltración de fibra hueca) para liberar cantidades máximas de adenovirus. Se puede usar cualquier componente de lisis de células que permite la introducción en un sistema biológico tal como un protocolo de terapia génica o de purificación de vacuna para lisar las células huésped infectadas, a saber un detergente o enzima conocida en la técnica que es útil en aplicaciones biológicas, que incluye pero no se limita a detergentes Triton y/o Polisorbato-80. Además, se puede añadir un disolvente tal como TNBP al lisado o clarificar el lisado a bajas concentraciones (por ejemplo, 0,3%) para complementar estos detergentes en su capacidad para inactivar los virus con envuelta. También, la autólisis de las células huésped puede proporcionar la liberación sustancial de virus intracelular. Por lo tanto, cualquier forma de lisis de células huésped que se conoce en la técnica se puede usar para liberar el virus intracelular en el medio de cultivo de células huésped para la recogida eventual mediante los procedimientos descritos en esta memoria descriptiva.

Después de la lisis, el ADN se precipita de manera selectiva mediante la adición de de una solución de SPA concentrada mientras deja el adenovirus en la fase líquida. Esta etapa permite la precipitación selectiva de ADN de células huésped y también mejora la robustez hacia abajo. Como se ejemplifica en esta memoria descriptiva, esta etapa de precipitación de fase temprana da como resultado aproximadamente 90% de reducción en el ácido nucleico después de la clarificación. Las nucleasas (que incluyen pero no se limitan de ninguna manera a Benzonase™ (Industrias EM), ADNasas y ARNasas) no se requieren ya más pero todavía son beneficiosas para la máxima reducción de ADN. En vista de la capacidad de esta etapa de precipitación para eliminar la gran mayoría de los ácidos nucleicos contaminantes, la cromatografía de intercambio aniónico puede no ser esencial para la pureza del producto dependiendo de la dosificación final. Sin embargo, una etapa de AEX puede permanecer en el procedimiento para robustez.

Aunque sin estar unido a ninguna teoría, se cree que al adición de un SPA después de la lisis de células da como resultado los grupos cargados positivamente (y anillos aromáticos, si están presentes) sobre los compuestos que se unen a los grupos fosfato cargado negativamente (y pares de bases) en las moléculas de ADN. Las colas hidrófobas en los detergentes interactúan después entre sí dando como resultado precipitación. Los resultados experimentales descritos en esta memoria descriptiva muestran que las moléculas de ADN tienen una afinidad mayor a los SPA que el adenovirus, por lo tanto las moléculas no interactuarán con el adenovirus hasta que la concentración de ADN en la fase líquida sea baja. Las micelas mixtas también proporcionan un incremento de robustez. Este mecanismo proporciona la selectividad requerida durante la precipitación. Los SPA que pueden ser útiles en la práctica de la invención descritos en esta invención incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de amina, compuestos de amonio cuaternario, y cualesquiera mezclas respectivas de los mismos. Las mezclas de los SPA proporcionan un comportamiento similar a los SPA puros mientras incorporan mecanismos de precipitación múltiples (es decir sitios de unión primarios). Una mezcla de SPA se puede añadir al lisado de células a medida que se incorpora el tampón de precipitación o una metodología de adición de alto corte/bajo corte. Más específicamente, las muchas formas de polietilén imina (PEI) han mostrado que son muy

eficaces en la neutralización del exceso de carga aniónica (impurezas de ADN), especialmente en condiciones de pH ácido o neutro. Teóricamente, los copolímeros de PEI modificados que tienen relativamente una masa molecular alta puede ser eficaz.

5 Los compuestos de amonio cuaternario de las siguientes siete clases se ha mostrado que son beneficiosos para la presente invención. éstos incluyen pero no se limitan a las siguientes clases y ejemplos de productos comercialmente disponibles: sales monoalquiltrimetil amonio (los ejemplos de productos comercialmente disponibles incluyen bromuro o cloruro de cetiltrimetilamonio como CTA, bromuro o cloruro de tetradeciltrimetilamonio como (TTA), cloruro de alquiltrimetil amonio, cloruro de alquilariltrimetilamonio, bromuro o cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodecildimetil-2-fenoetilamonio, hexadecilamina: sal cloruro o bromuro, dodecilamina o sal cloruro, y bromuro o cloruro de cetildimetil amonio), sales de monoalquildimetilbencil amonio (los ejemplos incluyen cloruros de alquildimetilbencil amonio y cloruro de bencetonio como BTC), sales de dialquildimetil amonio (los productos comerciales incluyen bromuro de domifeno como DB, haluros de didecildimetil amonio, y cloruro o bromuro de octildodecildimetil amonio), sales de amonio heteroaromáticos (los productos comerciales incluyen haluros de cetilpiridinio (CPC o sal bromuro y bromuro o cloruro de hexadecilpiridinio), isómero cis de 1-[3-cloroalil]-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantano, bromuro de alquiliisoquinolinio, y cloruro de alquildimetilnaftilmetil amonio (BTC 1110). Las sales de amonio cuaternario polisustituido (los productos comercialmente disponibles incluyen, pero no se limitan a alquildimetilbencil amonio sacarinato y alquildimetilbencil amonio ciclohexilsulfamato), sales de amonio bis-cuaternario (los ejemplos de productos incluyen 1,10-bis(cloruro de 2-metil-4-aminoquinolinio)-decano, cloruro de 1,6-Bis{ 1-metil-3-(2,2,6-trimetil ciclohexil)-propildimetil amonio} hexano o cloruro de triclobisonio, y la bis-quat denominada como CDQ por Buckman Brochures), y las sales de amonio cuaternario poliméricas (incluye poliyononas tales como cloruro de poli[oxietileno(dimetiliminio)etileno(dimetilimino)etileno], bicloruro de poli[N-3-dimetilamonio]propil]N-[3-etilenoetilendimetilamonio]propil]urea, y alfa-4- [cloruro de 1-tris(2-hidroxietil)amónio).

25 El lisado de células tratadas con SPA se clarifica mediante filtración profunda para eliminar las impurezas precipitadas y desechos de células. También es posible la centrifugación con o sin filtración profunda de refinado. Por lo tanto, la clarificación del lisado precipitado se puede realizar usando solo centrifugación, o centrifugación en tándem con una etapa de clarificación de refinado tal como filtración profunda. Para mayores volúmenes de líquido (mayores que aproximadamente 50 l), la centrifugación continua se preferirá sobre los procedimientos de lote. La centrifuga continua puede ser de un diseño tubular, como en la CARR Powerfuge, o disco, como en la Westfalia CSA-1, aunque otras elaboraciones y modelos son probablemente más satisfactorios. En general, los tiempos de residencia y fuerza centrífuga requeridos se dispondrán por la eficacia del equipo individual así como la distribución del tamaño de precipitado, y la metodología para las condiciones de selección apropiadas para eliminar el precipitado pero no el adenovirus serán evidentes para los expertos en la técnica. El ejemplo 15 muestra el uso de la centrifugación continua seguida de una filtración profunda de refinado. El uso de centrifugación continua se prefiere en las aplicaciones en las que la densidad celular sea alta (por ejemplo, cultivo por lote de alimentación o de perfusión) y/o cuando los volúmenes son mayores (mayor que 1000 l). El lisado de células clarificado se concentra después según sea apropiado (dependiendo de la masa de células y productividad de adenovirus) de cultivo, siendo 10-20 veces típico de los procedimientos de lote sencillos), opcionalmente tratado por nucleasa, y diafiltrado. La combinación de la precipitación y clarificación retiran aproximadamente el 90% del ADN total y, dependiendo de las condiciones de ultrafiltración / tratamiento por nucleasa, la pureza de esta corriente puede ser suficiente para muchas aplicaciones. El procedimiento no requiere nucleasa, aunque se pueden usar pequeñas cantidades para asegurar la robustez del procedimiento. Para muchas aplicaciones, la pureza del producto ultrafiltrado puede ser suficiente y la purificación cromatográfica se considera innecesaria. Para las aplicaciones de pureza muy alta (o por razones alternativas tales como validación de eliminación), se pueden añadir una o más etapas de cromatografía, como se describe en esta memoria descriptiva. Estará dentro del alcance del experto en la técnica para ensayar sustitutos potenciales para los SPA descritos en esta memoria descriptiva para identificar un compuesto que precipita de manera eficaz moléculas de ácido nucleico y otros desechos celulares de las partículas de virus como se ejemplifica en esta memoria descriptiva para el bromuro de domifeno (DB). Por lo tanto, la presente invención se refiere en parte a procedimientos de purificación de partículas de virus a partir de un medio de cultivo de células huésped que comprende selectivamente precipitar las moléculas de ácido nucleico de células huésped de las partículas de virus dentro del medio de cultivo de células huésped después de la lisis mediante la adición de un agente de precipitación selectiva al medio de cultivo celular de células huésped después de la lisis. En tales condiciones se esperará que una mayoría sustancial de ácidos nucleicos contaminantes precipitarán aparte del virus, entre al menos el 70%, más probablemente al menos el 80% de tal ADN contaminante y hasta al menos el 90% de tal ADN contaminante 7 impuro, especialmente cuando sigue una etapa de clarificación tal como filtración profunda sola o filtración profunda combinada con una etapa de filtración profunda de refinado.

60 En esta memoria descriptiva se ejemplifica y se prefiere que la etapa de precipitación selectiva se produzca en la primera etapa después de la lisis. Sin embargo, esta preferencia no significa que sea una limitación, ya que la etapa de precipitación selectiva se puede insertar en otras fases del procedimiento de purificación para eliminar mejor las moléculas de ácido nucleico residuales y desecho celular a partir de un lisado celular tamponado o una solución de tampón que contiene Ad en fase tardía. Por ejemplo, la precipitación con detergente se puede colocar alternativamente después de clarificación o ultracentrifugación (concentración/diafiltración) con la adición de una clarificación posterior. La clarificación puede tomar cualquiera de las varias formas que incluyen filtración profunda o de membrana.

ES 2 285 120 T3

Se puede contemplar una etapa de filtración para retirar el desecho celular y precipitado de ácido nucleico. La etapa proporciona un medio conveniente para retirar de manera económica el desecho celular y el precipitado. Cuando se elige un filtro o esquema de filtro era necesario asegurar un comportamiento robusto en el caso de que se produzcan cambios o variaciones hacia arriba. El mantenimiento del balance entre el buen comportamiento de clarificación y el rendimiento de las etapas requiere investigación de una gran variedad de tipos de filtro con medios internos variables. Los filtros adecuados pueden utilizar filtros de celulosa, fibras de celulosa regenerada, fibras de celulosa combinadas con adyuvantes de filtro inorgánicos (por ejemplo, tierra de diatomeas, perlita, sílice de pirólisis), fibras de celulosa combinadas con adyuvantes de filtro inorgánicos y resinas orgánicas, o cualquier combinación de los mismos, y filtros poliméricos (los ejemplos incluyen pero no se limitan a nylon, polipropileno, poliétersulfona) para lograr la retirada eficaz y recuperaciones de virus aceptables. En general es preferible pero no requerido un procedimiento de etapas múltiples. Un procedimiento ejemplar de dos o tres fases consistiría en un (os) filtro (s) rústico (s) para retirar el precipitado grande y desecho celular seguido de filtro (s) de segunda fase de refinado a con tamaños de poros nominales mayores que 0,2 micrones menos de 1 micrón. La combinación óptima será función de la distribución del tamaño del precipitado así como otras variables. Además, las operaciones de una sola fase que emplean un filtro relativamente hermético o centrifugación también puede producir un producto de buena calidad. Más generalmente, cualquier planteamiento de clarificación que incluye filtración terminal, microfiltración, centrifugación, o alimentación del cuerpo de los adyuvantes de filtro (por ejemplo, tierra de diatomeas) en combinación con filtración terminal o profunda, que proporciona un filtrado de claridad adecuada para no ensuciar la membrana y/o resina en las etapas posteriores, serán aceptables para practicar la presente invención.

La filtración profunda o filtraciones profundas en combinación con centrifugación han sido los procedimientos más robustos de clarificación para la presente invención. éstos incluyen pero no se limitan a los siguientes ejemplos de productos comercialmente disponibles: los filtros de profundidad de la serie AP que incorpora CUNO (los ejemplos incluyen APO1), los filtros de profundidad de la serie CP que incorpora CUNO (los ejemplos incluyen CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), los filtros de profundidad de la serie HP que incorpora CUNO (los ejemplos incluyen HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), los filtros de profundidad de la serie CA que incorpora CUNO (los ejemplos incluyen CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), los filtros de profundidad de la serie CA que incorpora CUNO (los ejemplos incluyen CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), los filtros de profundidad de la serie SP que incorpora CUNO (los ejemplos incluyen SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90), los filtros Delipid y delipid Plus de CUNO, los filtros de profundidad de la serie CE de Millipore Corporation (los ejemplos incluyen CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75), los filtros de profundidad de la serie DE de Millipore Corporation (los ejemplos incluyen DE15, DE20, DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE70, DE75), los filtros HC de Millipore Corporation (los ejemplos incluyen A1HC, B1HC, COHC), los filtros de Polynet de CUNO (un ejemplo incluye Polynet-PB), los filtros clarigard y Polygard de Millipore, los filtros Life assure de CUNO, los filtros de profundidad de ManCel associates (los ejemplos incluyen pero no se limitan a PR 12 UP, PR12, PR 5 UP), y los filtros de PALL o SeitzSchenk Incorporated (los ejemplos incluyen pero no se limitan a Bio20, SUPRA EKIP, KS-50P).

Un aspecto adicional del procedimiento descrito son una serie de etapas para concentrar el Adenovirus, añaden un tratamiento de nucleasa adicional (por ejemplo, Benzonase™, Industrias EM) y para introducir un tampón de intercambio mediante la diafiltración. El tamaño de membrana seleccionado permite la eliminación de proteínas estructurales de virus no ensambladas, detergente y nucleasa. La adición de Benzonase™ no se requiere para derivar un producto que es altamente puro mediante intercambio de HPLC, pero no conduce a niveles de ADN residuales al final de esta etapa y presumiblemente en el producto final purificado.

La membrana de ultrafiltración particular seleccionada será de un tamaño lo suficientemente pequeño para retener adenovirus pero suficientemente grande para eliminar de manera eficaz impurezas. Dependiendo del fabricante y tipo de membrana, los cortes del peso molecular nominal (NMWCO) entre 100 y 1000 kDa pueden ser apropiados. la composición de membrana puede ser, pero no se limita a, celulosa regenerada, poliéter sulfota, polisulfona, o derivados de los mismos. Estas membranas pueden ser hojas planas o fibras huecas. Se prefiere la ultrafiltración que usa modo de flujo tangencial. Las retículas que promueven turbulencia también pueden ser útiles para optimizar la eliminación de impurezas. En una realización preferida, se usan hojas planas NMWCO PES de 300 kDa 0 500 kDa con una retícula que promueve turbulencia (por ejemplo, Pellicon 2 Biomax de Millipore con retícula C) en un modo de flujo tangencial. En el modo de flujo tangencial, la etapa se puede controlar estableciendo un flujo transversal fijo con o sin contrapresión en el retorno retenido, estableciendo una presión de transmembrana fija, o fijando tanto el flujo transversal como el flujo perneado.

El factor de concentración dirigido durante la ultrafiltración será función de las condiciones de cultivo, incluyendo el medio usado, densidad celular, y productividad vírica. Para el cultivo del lote con una densidad de células de infección de aproximadamente 10⁶ células/ml, se prefiere 5- a 40 veces de concentración; se prefiere especialmente una concentración de 10- a 25 veces.

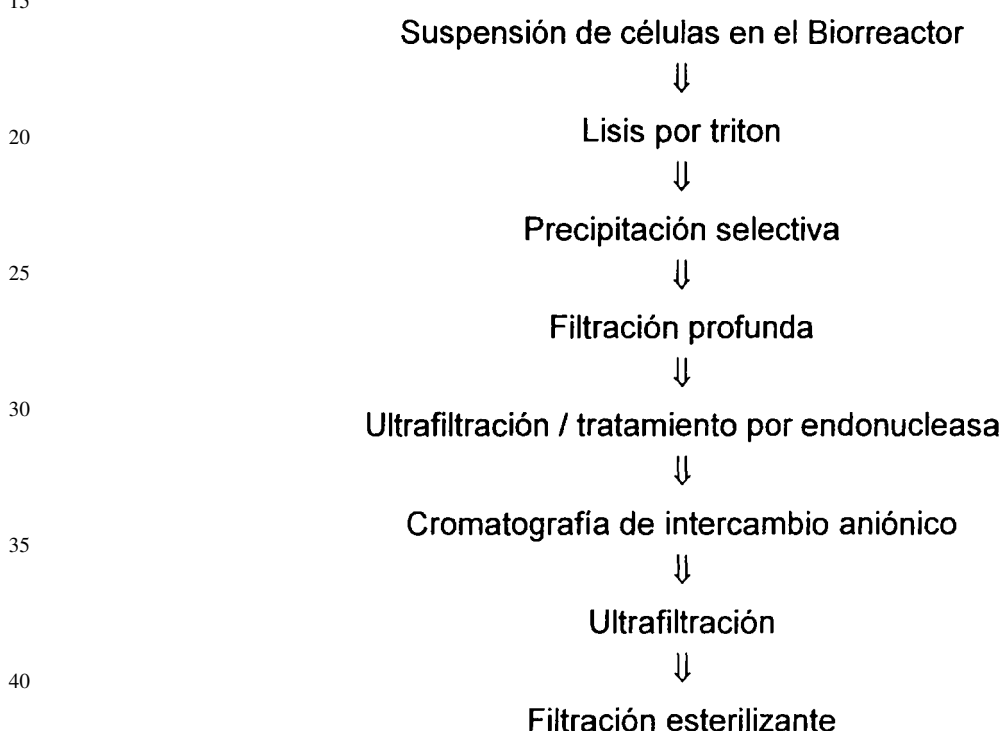
El tratamiento de nucleasa también se puede considerar para inclusión en el procedimiento, pero no significa que se requiera. El tratamiento de nucleasa puede incluir el uso de una nucleasa de amplio espectro (por ejemplo Benzonase™), una ADNasa, una ARNasa, o cualquier combinación de las mismas. Se prefiere una nucleasa o cóctel con tanto ARNasa como ADNasa. Se puede contemplar una etapa de tratamiento de nucleasa en cualquier punto en el procedimiento, mientras que el contenido en nucleasa residual en el producto final sea aceptable a la aplicación. Se prefiere que el tratamiento de nucleasa se produzca después de la clarificación, y se prefiere especialmente que el tratamiento de endonucleasa se produzca después de la clarificación y una etapa de concentración, pero antes de una etapa de cro-

ES 2 285 120 T3

matografía de intercambio aniónico. Una manifestación útil del procedimiento permite el tratamiento de endonucleasa en el aparato de ultrafiltración después de la concentración. La permeación se puede detener temporalmente para una longitud de incubación apropiada, y después volver a comenzar la diafiltración.

5 Puede ser deseable la diafiltración en un tampón que usa ultrafiltración. En la mayoría de las aplicaciones, se usarán varios volúmenes de lote para asegurar el intercambio completo. Si el procedimiento va a acabar en este punto, se puede usar un tampón de formulación apropiado (por ejemplo, véase la publicación PCT WO 01/66137) para maximizar la estabilidad del producto. Si la corriente se va a cargar en una columna de cromatografía, la diafiltración se debe de llevar a cabo en un tampón apropiado para esa aplicación. Por ejemplo, si el producto se va a cargar en
10 una columna de intercambio aniónico, la diafiltración en un tampón con pH entre 6,5 y 8,0 se prefiere, aunque no se requiere. Más específicamente, puede ser apropiado la diafiltración en HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5, con o sin detergente para evitar la agregación (tal como PS-80 al 0,1%).

15 TABLA 1



45 Como se ha indicado a lo largo de esta memoria descriptiva y se muestra en la Tabla 1, también puede ser útil una etapa de cromatografía de intercambio iónico para muchas aplicaciones. Para la purificación de adenovirus de tipo 5 con Source 15Q, la concentración de NaCl para cargar y lavar puede ser presumiblemente en cualquier parte entre 0,33 y 0,41 M a pH 7,5 y se desplazaría a pH alternativo. El pH de los tampones necesita ser lo suficientemente alto para unirse (mayor que aproximadamente 6,5). Además, el pH del sistema de tampón también debe ser lo suficientemente bajo para evitar la inestabilidad vírica. El pH máximo preciso que se puede usar dependerá del experto en la técnica para esa aplicación particular. Como una guía y ciertamente sin ninguna limitación, un intervalo de pH entre Ad5 puede variar potencialmente entre aproximadamente 6-10, con niveles preferidos de 6,5-9, e incluso más preferido entre 6,5-8,0. La presencia de PS-80 al 0,1% en los tampones es crítica para lograr niveles bajos de ADN residual en el producto debido a que atenúa la asociación de virus/ADN y agregación de virus. Estará dentro del dominio de la experimentación de rutina para el experto en la técnica establecer concentraciones de detergente mayores o menores o detergentes alternativos que serían útiles para promover la disociación de partículas de virus de otros virus así como
55 diversos contaminantes celulares. También está dentro del mismo área de experimentación que el experto en la técnica pueda elegir un detergente alternativo para el tampón de procedimiento. Como un ejemplo, pero de ninguna manera significa que sea una limitación, tensioactivos no iónicos que se pueden usar potencialmente para inhibir la agregación en intercambio aniónico y a lo largo del procedimiento incluyen ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán, que incluyen pero no se limitan a Polisorbato-80 (Tween 80[®]) [como se ejemplifica en esta memoria descriptiva],
60 polisorbato-60 (Tween 60[®]), Polisorbato-40 (Tween 40[®]), y Polisorbato-20 (Tween 20[®]), éteres de polioxietileno alquilo, que incluyen pero no se limitan a Brij 58[®], Brij 35[®], así como otros tales Triton X-100[®], Triton X-114[®], NP 40[®], Span 85 y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121). De éstos, se prefiere la serie de Polisorbato. Se describe en esta memoria descriptiva que una resina tal como una resina Source 15Q (Amersham Biosciences) tiene una capacidad de unión extremadamente alta para adenovirus que se puede utilizar de manera eficaz debido a la inhibición de la agregación. La evidencia anecdótica y técnica conocida sugiere que las cargas bajas (< 1 x 10¹² vp/ml de resina) son la norma de la industria. Para Source 15Q, se prefieren columnas con alturas de lecho con
65 más de 5 cm cuando el diámetro de la columna excede de 10 cm. Las columnas con alturas de lecho entre 10 y 25

ES 2 285 120 T3

cm trabajan especialmente bien. Aunque no se requiere, es preferible implementar una estrategia que fraccione el pico del producto principal de las impurezas relacionadas cromatográficamente, por ejemplo, empleando un valor de corte para absorbancia de UV. Otras resinas que son adecuadas para la purificación de adenovirus en este procedimiento incluyen pero no se limitan de ninguna manera a Source 30Q (Amersham Biosciences), Fractogel TMAE (industrias EM), y Q-Sepharose XL (Amersham Biosciences). Se puede usar cualquier intercambiador iónico, los inventores han demostrado que otros incluyen Fractogel DEAE (Industrias EM), Q-Hyper D/F (Biosepra), Toyopearl DEAE-650M (Tosohaas), Toyopearl DEAE-750C (Tosohaas) y Toyopearl QAE-550 M (Tosohaas). Además, los productos de cromatografía de membrana de intercambio aniónico tales como los producidos por Pall (por ejemplo la serie Mustang™) y Sartorius (por ejemplo la serie Sartobind) son adecuados para la purificación de Adenovirus.

En cualquier realización de la presente invención, el producto de intercambio aniónico se puede se puede diafiltrar en tampón de formulación y filtrase estéril. Como alternativa, se puede añadir una etapa adicional de cromatografía (por ejemplo intercambio catiónico antes o después de la diafiltración con el potencial de mejorar la robustez de la eliminación de impurezas y/o virus/prión. La ultrafiltración de flujo tangencial es útil en la eliminación de proteína residual y ácido nucleico y para cambiar el virus en un tampón de formulación. La etapa proporciona control de PS-80 y puede proporcionar la eliminación de impurezas residuales incluyendo ADN, detergentes residuales y proteínas de células huésped. La presencia d PS- 80 en la alimentación y tampón de diafiltración minimiza el potencial para la agregación del producto. Es importante el control de flujo para la reducción eficaz de PS-80 en presencia de altas concentraciones de adenovirus. La elección entre membranas de 300 kD y 500 kD se disponen mediante el sacrificio entre rendimiento y eliminación de impureza mejorada. Otras configuraciones de membrana (tal como fibra hueca) son sustitutos aceptables. Más generalmente, la selección de las condiciones para esta ultrafiltración es similar a las descritas anteriormente. Esto es, la membrana de ultrafiltración particular seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño para retener adenovirus pero suficientemente grande para eliminar impurezas de manera eficaz. Dependiendo del fabricante y tipo de membrana, pueden ser apropiados cortes de peso molecular nominal (NMWCO) entre 100 y 1000 kDa. La composición de membrana puede ser, pero no se limita a, celulosa regenerada, poliétersulfona, polisulfona, los derivados del mismo. Estas membranas pueden ser hojas planas o fibras huecas. Se prefiere la ultrafiltración que usa modo de flujo tangencial. Las retículas que promueven turbulencia también pueden ser útiles para optimizar la eliminación de impurezas. En otra realización se usan membranas de hoja plana PES de NMWCO de 300 kDa o 500 kDa (por ejemplo, Millipore Pellicon 2 Biomax con retícula C) en el modo de flujo tangencial. En el modo de flujo tangencial, la etapa se puede combinar estableciendo un flujo transversal fijo (con o sin contrapresión sobre la línea de retorno retenida), estableciendo una presión de transmembra fija, o fijando tanto el flujo transversal como el flujo de perneado. Se prefiere el control del flujo transversal y flujo de perneado. El tampón de diafiltración particular elegido debe ser un tampón de formulación apropiado (véase el documento WO 0166137) o un subconjunto de los componentes deseados. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a (1) Tris 5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 8,0, (2) Tris 10 mM, Histidina 10 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS- 80 al 0,005%, pH 7,4, (3) Tris 5 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005, pH 7,4, y (4) Tris 10 mM, Histidina 10 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,02%, EDTA 0,01 mM, etanol al 0,5% (v/v), pH 7,4.

Se puede incluir una etapa de filtración esterilizante, que es útil en la eliminación de bioburden. El producto se puede filtrar a través de una membrana de 0,22 micrones de fluoruro de polivinilideno (PVDF) modificado (por ejemplo Millipore Millipak). Además de PVDF modificado, el filtro esterilizante se puede construir de una diversidad de otros materiales que se conocen bien en la técnica y están disponibles para el experto en la técnica. Éstos pueden incluir pero no se limitan a polipropileno, celulosa, ésteres de celulosa, nylon, poliétersulfona, o cualquier otro material que es consistente con la unión de producto baja. El filtro puede tener una sola capa de membrana o puede incorporar un prefiltro del mismo o diferente material. El producto se puede mantener congelado o a aproximadamente 4°C durante la formulación o llenado posterior. Una etapa opcional adicional hacia abajo en el procedimiento es la inclusión de una etapa de purificación ortogonal con el fin de eliminar cualquier remanente de impurezas y/u otros agentes. Una etapa como tal incluye, pero no se limita necesariamente a, una etapa de cromatografía de intercambio catiónico. Si se elige, la operación de la etapa de intercambio catiónico debe ser en modo de flujo continuo. La segunda ultrafiltración actúa como antes excepto la concentración de sal del tampón de diafiltración se puede reducir (por ejemplo, a 10 mM). Después de la ultrafiltración e inmediatamente antes del intercambio catiónico, el pH del lote se reduce a 6,5 mediante la adición de un tampón de bajo pH (histidina). Se pueden lograr pH más bajos pero con riesgo de pérdida de adenovirus en el tampón de formulación ejemplificado, los pH más altos reducen la eficacia de la etapa pero mejoran la estabilidad de adenovirus. De manera similar puede variar la concentración de NaCl. Hasta la fecha, se han evaluado un número de resinas para la recuperación de adenovirus que incluye Poros 50HS, Source 30S, Sourde 15S, SP Sepharose HP, SP Sepharose XL, SP Sepharose FF; se prefiere Source 30S. Inmediatamente después del intercambio catiónico, el pH se aumenta en la formulación diana mediante la adición d un tampón Tris de alto pH. Además de cómo se ha indicado anteriormente, los productos de cromatografía de membrana de intercambio aniónico tales como los producidos por Pall (por ejemplo los de la serie Mustang™) y Sartorius (por ejemplo los de la serie sartorius) son adecuados para la purificación de adenovirus. El producto puede después filtrarse de manera estéril como antes.

También se puede añadir una etapa de adsorción de fase inversa, preferiblemente después de la etapa de clarificación o la primera ultrafiltración. La adsorción de fase inversa puede eliminar detergentes incluyendo Triton X-100 y bromuro de domifeno así como componentes del medio de cultivo tales como pluronic y rojo fenol así como una diversidad de otras impurezas hidrófobas. Por lo tanto representa un procedimiento conveniente para incrementar la robustez o eliminar las etapas hacia abajo. La etapa de adsorción puede actuar en modo o bien de lote o de columna. En el modo de lote, el adsorbente se debe posteriormente retirar usando una filtración, preferiblemente en modo terminal.

ES 2 285 120 T3

En el modo de columna, el lote se debe bombear sobre la resina a un tiempo de residencia adecuado para permitir la adsorción de detergentes y otras impurezas. Las resinas adecuadas deben tener un tamaño de poro que excluye el producto y puede incluir cualquiera de la serie Amberlite XAD, por ejemplo XAD4, XAD16, XAD1180 (Rohm and Haas) o resinas similares de otros fabricantes, por ejemplo Bio-Beads SM2 (Bio-Rad).

También se puede considerar una etapa de cromatografía de hidroxapatito para eliminar las impurezas adicionales. Esta etapa puede actuar en modos o bien de unión/elución o de flujo continuo. La etapa se puede colocar después de o bien la etapa de ultrafiltración finalizando la UF con una diafiltración en un tampón con aproximadamente fosfato 10 mM y NaCl 0,5 M a un pH preferencial entre 6,5 y 8. Un gradiente en fosfato a 0,4 M es suficiente para la elución de adenovirus.

Será evidente tras la revisión de esta memoria descriptiva que el procedimiento de la presente invención son escalables, desarrollando al gama desde cultivos celulares de pequeña escala (por ejemplo, procesamientos de aproximadamente 5-10 litros) hasta el final para preparaciones de escala comercial, tales como procesamientos de producción de 10.000 a 50.000 litros. Las secciones de los ejemplos 2 y 5 muestran datos de procesamientos completos a escala más pequeña, mientras que la descripción más adelante en esta sección contempla, como un ejemplo y ciertamente sin limitación, un procedimiento de purificación de adenovirus entre cultivos de 1000 litros (l) (800 l de volumen operativo) de células PER.C6™ (Crucell) infectadas previamente con el vector adenovirus respectivo. A este fin, la Tabla 1 resume los descriptores del procedimiento para un procesamiento en biorreactor de 1000 l profético (800 l de volumen operativo) será escalable de manera lineal). Las etapas del procesamiento inicial (lisis, filtración profunda y ultrafiltración) se escalan con volumen de cultivo mientras que la cromatografía de intercambio aniónico y etapas posteriores se escalan con producción de partículas virales. Por lo tanto, el tamaño de las últimas etapas se basará en una estimación de productividad de biorreactor de 4×10^3 partículas de virus por litro (vp/l). bajo estas suposiciones, se producirán aproximadamente $1,6 \times 10^{16}$ vp por lote. De manera adicional, el ejemplo 9 muestra los datos generados a partir del procesamiento de 600 l de Ad5.

Una primera etapa en un procesamiento de purificación de la presente invención es una etapa de lisis de células huésped, que proporciona la máxima liberación de partículas de adenovirus a partir de las células así como proporcionar una oportunidad de inactivar de manera potencial agentes adventicios. Como se ha mencionado anteriormente, un disolvente (por ejemplo, TNBP) también se puede añadir a baja concentración (es decir, 0,3%) para incrementar la eficacia de inactivación de agentes adventicios. El mantenimiento prolongado de un lisado o flujo de lisado clarificado que incorpora TNBP puede conducir potencialmente a una disminución en la capacidad de infección del producto. A partir de un procedimiento de cultivo de adenovirus de 800 l, aproximadamente 8 litros de Triton X-100 al 10% y 40 litros de Tris 0,5 M, MgCl₂ 40 mM, PS-80 al 1% se añadirá al biorreactor con agitación suave. La lisis de células se completará en 2 horas pero se puede mantener durante un tiempo adicional para propósitos de eliminación viral. El lisado de células se puede después mantener a 4°C o purificarse inmediatamente. Esta etapa de lisis inicial, independiente de la escala del cultivo de adenovirus, permite la recogida de tanto virus asociado a célula (intracelular) como no asociado (extracelular). Como resultado, proporcionará flexibilidad en la selección de las condiciones de cultivo que son óptimas para la productividad de virus global. Además, la presencia de detergente a lo largo del procedimiento minimizará la asociación del virus con ADN de células huésped.

Como se ha indicado anteriormente, un esquema de purificación preferido incorpora una etapa para precipitar moléculas de ácido nucleico huésped y otros desechos celulares así como la mejora de la robustez hacia abajo. Continuando con una descripción de un procedimiento de purificación proyectado para un procesamiento de 800 l, aproximadamente 60 l de bromuro de domifeno al 0,5% (CTAB o CPC se puede sustituir con algún ajuste de la concentración final), se añade lentamente al biorreactor o tanque de recogida para una concentración final de aproximadamente 0,04%. Si es necesario, al concentración de SPA óptima para un procesamiento específico se puede determinar usando estudios de sonda a escala de 1 ml. Se prefiere pero no se requiere la adición por debajo de la superficie del SPS. El lisado precipitado se clarifica inmediatamente. Tal precipitación dará lugar aproximadamente un 90% de reducción en ácido nucleico después de la clarificación. Además, también se pueden flocular otras impurezas (desechos celulares, etc) durante esta precipitación. Cuando se compara con controles sin precipitar, el rendimiento de la filtración profunda se potenciará notablemente y se mejorarán las producciones. El producto clarificado a partir del procesamiento mencionado de 800 litros será significativamente menos turbio y el comportamiento de la ultrafiltración posterior se mejorará notablemente. Las nucleasas (por ejemplo Benzonase™ y ARNasas) no se requerirán más sino que incluso serán beneficiosas para una reducción de ADN máxima. La cromatografía de intercambio aniónico puede no ser esencial para la pureza del producto dependiendo de la dosificación final pero, como se muestra en este ejemplo profético así como en las secciones de los ejemplos 2 y 5 pueden permanecer en el proceso para robustez.

El lisado de células tratadas con SPA se clarifica para retirar las impurezas precipitadas y el desecho de células. Esta etapa puede incluir o bien una etapa de filtración profunda o una etapa de centrifugación con o sin la etapa de refinado de filtración profunda. Cuando se incorpore cualquier etapa, el lisado celular clarificado se concentrará después 10-20 veces, opcionalmente se tratará con nucleasa, y se diafiltrará. La combinación de la precipitación y clarificación eliminará aproximadamente el 90% del ADN total y, dependiendo de las condiciones de ultrafiltración / tratamiento con nucleasa, la pureza de esta corriente puede ser suficiente para muchas aplicaciones. Más específicamente, una etapa de filtración profunda será útil para eliminar el desecho celular y los ácidos nucleicos huéspedes. Cuando se opta por filtración profunda, el lisado de células se filtrará a través de dos filtros profundos en serie para eliminar el desecho celular. La filtración utilizará dos cartuchos de filtros de 16 pulgadas (40,64 cm) MilliporeMillistak CE20 (75 pies cuadrados (6,97 metros cuadrados) seguido de dos cartuchos de 16 pulgadas (40,64 cm) Millistak CE50 (75

ES 2 285 120 T3

pies cuadrados (6,97 metros cuadrados). Estas áreas incluyen un factor de seguridad de la menos 2. La filtración se llevará a cabo usando un caudal constante de aproximadamente 9l/h/pie² (9l/h/0,092 m²). El líquido restante en la tubería se desplazará con presión de aire. La filtración profunda proporciona un medio conveniente para eliminar de manera económica el desecho celular y precipitado. Se sabe que los expertos en la técnica al menos tras la revisión de esta memoria descriptiva que la selección del filtro real se puede cambiar para optimizar de manera adicional el rendimiento o eliminación de impureza. Como se ha indicado previamente, al centrifugación es una alternativa viable para la filtración profunda que se puede aplicar especialmente a procesamientos a mayor escala.

En el esquema de purificación como se muestra en la Tabla 1, las etapas de concentración, tratamiento de nucleasa y diafiltración se incorporan en orden para reducir el volumen del lote, digerir y eliminar los ácidos nucleicos residuales, y promover un cambio de tampón. Más específicamente, el lisado clarificado se concentrará desde aproximadamente 800 l a aproximadamente 40 l usando una ultrafiltración de volumen constante con una membrana de NMWCO poliétersulfona (PES) de 300 kD en condiciones de flujo constante. Después de la concentración, 0,6 MM Unidades de Benzonase™ (15 U/ml) se añadirán directamente al retenido y se volverán a circular lentamente en el sistema de ultrafiltración con mezclado. Después de 1-2 horas a temperatura ambiente, el lote se diafiltrará contra 5 volúmenes (200 l) de HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 en condiciones de flujo constante. Se debe indicar que el tamaño de membrana seleccionada permitirá la eliminación de proteínas estructurales de virus sin ensamblar, micelas de detergente y Benzonase™. Un MWCO mayor (por ejemplo, 500 kD) también puede proporcionar un comportamiento adecuado. La adición de Benzonase™ no se requiere para derivar un pico que es altamente puro mediante HPLC de intercambio aniónico pero conducirá a menores niveles de ADN residual al final de esta etapa y presumiblemente en el producto final purificado.

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) de la Tabla 1 será útil para purificar el virus de las proteínas, ácidos nucleicos, y componentes virales no ensamblados de células huésped. La conductividad del lote se ajustará hasta 38 mS mediante la adición de aproximadamente 62 l de HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, PS-80 al 0,1%, pH 7,5. Después de la dilución, el lote se bombeará sobre una columna de resina Source 15Q (Amersham Biosciences) a una carga de aproximadamente 5 x 10¹² partículas por ml de resina. Para MRKA5gag, esto corresponde a una columna de aproximadamente 5 litros (aproximadamente 20 cm de altura x 10 cm de diámetro). Después de la carga, la columna se lavará con 5 volúmenes de HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 0,39 M, PS-80 al 0,1%, pH 7,5 para eliminar el Triton residual y las impurezas de proteína. Después el producto se eluye en un gradiente lineal de 4 volúmenes a NaCl 0,47 M y se recoge basándose en el señal de A₂₆₀. La necesidad de controlar la temperatura durante este proceso se dictará mediante el tipo de procesamiento y la estabilidad del AdV en esta fase. La carga a una conductividad de 38 mS es aproximadamente equivalente a NaCl 0,38 M. La concentración es adecuada para unir partículas de adenovirus pro no las impurezas relacionadas; esto se traduce en una capacidad mayor de unión para adenovirus. La presencia de PS-80 al 0,1% (o un compuesto relacionado en una concentración biológicamente eficaz) en los tampones será crítico para lograr bajos niveles de ADN residual en el producto debido a que atenúa la asociación virus/ADN y agregación de virus. La resina Source 15 Q tiene una capacidad de unión extremadamente alta para adenovirus que se puede utilizar de manera eficaz debido a que nosotros inhibimos la agregación.

La ultrafiltración de flujo tangencial es una etapa mostrada en la tabla 1 que es útil para eliminar también proteína residual y ácido nucleico así como para cambiar virus en un tampón de formulación. En resumen, el área de la membrana MWCO PES de 300 kD) se selecciona para una carga de 1-2 x 10¹⁶ vo por m². El producto de AEX se diluirá hasta aproximadamente 1,1 x 10¹² vp/ml aproximadamente 16 litros) y después se diafiltra usando control de flujo contra 5 volúmenes de tampón de formulación (Tris 5 M, MgCl₂ 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,05%, pH 8,0). La etapa se hace actuar a aproximadamente 4°C y el producto se mantiene a 4°C hasta filtración esterilizante. La etapa proporcionará control de PS-80 y puede proporcionar la eliminación de impurezas residuales que incluyen ADN y proteína s de células huésped. La presencia de PS-80 en la alimentación y tampón de diafiltración minimizará el potencial para la agregación del producto. El control de flujo es importante para la reducción eficaz de PS-80 en la presencia de altas concentraciones de adenovirus. Se pueden sustituir las membranas de 500 kD, sin embargo, existe algún potencial para la permeación de virus. Otras configuraciones de membrana (por ejemplo de fibra hueca) proporcionan sustitutos aceptables.

Se puede añadir filtración esterilizante, según la tabla 1, para eliminar la biocarga. El retenido final se filtrará a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno modificado de 0,22 micrones (PVDF) (por ejemplo Millipore Millipak 200) usando una carga de filtro de aproximadamente 3 x 10¹³ vp/cm². Además del PVDF modificado, el filtro estéril puede estar construido de una diversidad de materiales diferentes que se conocen en la técnica y están disponibles para el experto en la técnica. Éstos pueden incluir pero no se limitan a polipropileno, celulosa, ésteres de celulosa, nylon, poliétersulfoona, o cualquier otro material que sea consistente con una unión baja de producto. El filtro puede tener una sola CAAP de membrana o puede incorporar un prefiltro del mismo o material diferente. El producto se puede mantener congelado a aproximadamente 4°C durante la formulación y llenado posterior.

Se puede añadir una etapa de purificación ortogonal para tratar la eliminación de impurezas así como un agente de eliminación adventicio. Las etapas de purificación ortogonal no se requieren necesariamente y de pueden determinar por los expertos en la técnica y a su vez implementarse basándose en la necesidad. La concentración de dosis clínica más alta, la robustez de eliminación de impurezas, y lo referente a sustrato de células con relación a la capacidad de generar tumores, virus adventicios y priones todos pueden definir esta necesidad para los expertos en la técnica. Las etapas potenciales incluyen cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo, adsorción de fase inversa, y cromatografía de hidroxapatito. El intercambio catiónico de flujo continuo es particularmente deseable debido a que

proporciona un factor de eliminación alto para PrP y muchos virus adventicios potenciales, incluyendo virus asociados a adeno (VAA).

Como se ha indicado en esta memoria descriptiva, la presente invención se refiere a la purificación de virus de tipo salvaje, modificados o recombinantes. De interés específico en las aplicaciones de vacunación y/o terapia génica es el uso de adenovirus incompetentes de replicación de 1ª o 2ª generación, mutilados por E1 o supresiones adicionales, incluyendo vectores adenovirus “cobardes”. El genoma de adenovirus está generalmente asociado a patologías benignas en seres humanos, y al organización genómica del virus se ha estudiado bien desde su descubrimiento a comienzos de los 1950. Además, el genoma es capaz de manipulación, dependiendo de la estrategia utilizada para construir el vector respectivo. Un virus incompetente de replicación (tal como un vector Ad5gag con supresión de E1/E3 que expresa un transgen gag de VIH, como se ejemplifica en esta memoria descriptiva) requiere una línea celular que complementa las supresiones. Cualquier línea celular mencionada se puede usar para generar vectores de virus recombinantes, con preferencia, pero sin limitación, las líneas celulares que incluyen células 293 y células PER.C6™. A este fin, se han descrito en la bibliografía numerosos vectores recombinantes de 1ª generación (por ejemplo, véase Bett y col., 1994, Proc. Natl. Acad. sci. 91: 8802-8806; documentos WO 01/02607 y WO 02/22080). Los vectores adenovirus “cobardes” son vectores de adenovirus de 2ª generación en general desprovistos de secuencias de codificación de proteínas frecuentemente con proteínas víricas complementadas *in trans* por un virus auxiliar (a menudo un adenovirus con supresión E1) desarrollado con el adenovector dependiente del auxiliar (HD) en una línea celular empaquetada (por ejemplo PER.C6™). Ausente de las proteínas víricas, estos vectores víricos pueden, como alternativa, estar complementadas *in trans* por una línea celular capaz de expresar las proteínas adenovíricas estructurales y funcionales necesarias para la replicación exitosa, empaquetamiento y rescate. A la vista del aumento de la popularidad de estos vectores víricos y la última necesidad de preparar cantidades a escala comercial de o bien un vector viral basado en vehículo de vacuna o de terapia génica, ha llegado a ser esencial desarrollar metodología más eficaz cualitativa y cuantitativa para la producción de vectores de adenovirus recombinantes de calidad comercial. Se entenderá que serotipos alternativos, que incluyen pero no se limitan a los serotipos 2, 4, 12, 6, 17, 24, 26, 31, 33, 34, 35, 36 y 16 son capaces de purificación mediante los procedimientos a gran escala descritos en esta memoria descriptiva. Los serotipos adenovíricos 2, 5 y 6, 24, 26 y 36, particularmente 5 se prefieren para uso en esta invención, ya que en este momento, se conoce más sobre estos serotipos en general que otros serotipos, y se conocen las secuencias de ADN completas. El adenovirus de serotipo 5 prototipo se ha secuenciado completamente (Chroboczek y col., 1992, J. Virol 186: 280, que se incorpora en esta memoria descriptiva por referencia). También pertenecen al subgrupo C de adenovirus, que no están asociados a malignidades de seres humanos y roedores. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, se prevé que se puede usar cualquier serotipo de adenovirus en esta invención, incluyendo quimeras (tal como virus Ad recombinantes “cambiado”, donde la región E4 dicha de un serotipo (por ejemplo Ad5) reemplaza la región similar de un serotipo alternativo (por ejemplo, Ad24), que puede permitir el crecimiento del virus quimérico Ad24 en una línea celular (por ejemplo PERC6) que expresa una región E1 de Ad5. Además, también se pueden purificar serotipo no humanos (por ejemplo, cepas de adenovirus que infectan chimpancés) mediante los procedimientos descritos en esta memoria descriptiva. Un vector de Ad5 recombinante ejemplificado, pero sin limitación, es MRKAd5gag, así como MRKAd5pol, los cuales se describen en el documento WO 02/22080. Otro vector Ad relacionado es Ad5gag, como se describe en el documento WO 01/02607. Estas publicaciones PCT se incorporan en esta memoria descriptiva por referencia.

La célula huésped para uso en el procedimiento presentado en esta memoria descriptiva comprende cualquier línea celular de mamífero que apoyará la infección y réplica de un vector de adenovirus de 1ª o 2ª generación. Una célula huésped preferida es una línea celular que apoya la infección y réplica de un adenovirus recombinante con supresiones E1 y/o E1/E3. Como se describe en esta memoria descriptiva, tal virus incompetente de réplica (tal como un Ad5gag, como se ejemplifica en esta memoria descriptiva) requiere una línea celular auxiliar que complementa la supresión de E1 de Ad5. Cualquier línea celular mencionada se puede usar para generar virus recombinante, las líneas celulares preferidas, pero no limitantes, incluyen células 293, células PER.C6™, células 911 de una línea celular de la retina embrionaria humana (Fallaux y col., 1996, Human Gene Therapy 7: 215-222); aminocitos transformados por E1 (Schiedner y col., 2000, Human Gene Therapy 11: 2105-2116); una línea celular A549 transformada por E1 para un carcinoma de pulmón humano (Imier y col., 1996, Gene Therapy 3: 75-84) y GH329: HeLa (gao y col., 2000, Human Gene Therapy 11: 213-219). Tal línea celular se transforma para apoyar la réplica y empaquetamiento de un adenovirus recombinante respectivo, tal como un adenovirus recombinante con supresiones E1 o E1/E3. Las líneas celulares adicionales que se pueden utilizar en la presente invención son de nuevo líneas celulares que se han adaptado para que actúen como células huésped para un virus termo estable particular. Es preferible que la línea celular sea una línea celular continua y más preferible que al fuente de las células cultivadas se originan de un tejido no neoplásico. También es preferible que la fuente sea mamífero, más probablemente de origen primate, y especialmente de origen humano. De nuevo, una línea celular preferida es una línea celular que es útil para la propagación de un virus recombinante con supresiones E1 o E1/E3 de Ad; un virus recombinante que complementa el vector de adenovirus con supresión E1 incluía líneas celulares transfectadas con el gen que codifica E1 de Ad que se han seleccionado para este fenotipo transformado, tal como células 293 (células epiteliales de riñón humano) y PER.C6™ (retinoblastos embrionarios humanos). Otros tipos de células incluyen pero no se limitan a células HeLa, células A549, células KB, células CKT1, células NIH/sT3, células Vero, células de ovario d Hámster Chino (CHO), o cualesquiera células eucarióticas que apoyan el ciclo de vida de adenovirus.

Cualquier procedimiento de producción de virus hacia arriba conocido en la técnica se puede adaptar a cultivo de células de gran escala de células huésped de mamíferos se puede utilizar para generar el material de partida (es decir, un cultivo de células huésped infectado por virus que se ha sometido a un periodo después de la infección de cultivo desarrollado de manera que se maximice la cantidad de virus intracelular o extracelular) para la metodología de purifi-

cación de la presente invención, teniendo en cuenta las modificaciones conocidas por los expertos en al técnica según sea apropiado para ser responsables de, por ejemplo, cambios en la densidad celular o la presencia de microvehículos. Esta metodología se conoce en la técnica (por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos n° 6.194.191 para una revisión de las técnicas de cultivo de células conocidas en al técnica, así como “Cultura of animal Cells: A Manual of Basic Techniques”, 2000, Ed. R. I. Freshney, Wiley-Liss, ambos documentos se incorporan en esta memoria descriptiva por referencia) y se pueden adaptar de virus a virus y sitio a sitio con el fin de optimizar la producción de virus. Por ejemplo, las células PER.C6™ se pueden cultivar en un biorreactor de 300 l con 240 l de volumen operativo y cultivarse con un Adenovirus recombinante que codifica un transgen gag de VTH (tal como MRKAd5gaga o Ad5gag) a una concentración de células viables de $0,59 \times 10^6$ células/ml a una multiplicidad de infección (MOI) de 280 vp/célula. Aproximadamente cincuenta horas después de la infección (hpi), se recoge el biorreactor, a una concentración total de aproximadamente $0,55 \times 10^6$ células/ml con un 555 de viabilidad. En el momento de la partida de esta unidad de operación, aproximadamente el 25% del virus es el sobrenadante, según un ensayo de AEX. De manera similar, se cultivan células PER.C6™ en Biorreactores de 20 l Wave con un volumen de trabajo de 10 l y se infectan con un vector de Adenovirus recombinante que codifica un transgen nef de VIH a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 290 partículas virales por célula (vp7célula) y una concentración de células viables de aproximadamente $0,72 \times 10^6$ células/ml. Aproximadamente cincuenta horas después de la infección (hpi) se recogen dos biorreactores Wave a una concentración total de aproximadamente $0,66 \times 10^6$ células/ml con un 815 de viabilidad. En el momento del comienzo de la concentración, 20,4% del virus estaba en el sobrenadante según ensayos de AEX de intercambio aniónico.

Los siguientes ejemplos no limitantes se presentan para ilustrar mejor la invención.

Ejemplo 1

25 *Cromatografía de AEX sin una etapa de precipitación selectiva*

Una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) con cierta selección de resina y condiciones operativas de columna (concentración de NaCl y pH) permiten altas capacidades de carga de virus. En esta memoria descriptiva también se muestra que la inclusión de un detergente (por ejemplo, PS-80) en los tampones de desarrollo inhiben las agregaciones durante la carga y elución. En conjunto, en esta memoria descriptiva se describe que la utilización de la resina de AEX según se practica mejorará 5-20 veces sobre los procedimientos reseñados previamente, con una capacidad utilizable demostrada (pero no necesariamente limitada) a $2,0 \times 10^{13}$ vp/ml de resina. es crucial para la implementación de un procedimiento económicamente eficaz y robusto la elección de erizan con una capacidad dinámica de adenovirus y metodologías para asegurar que la capacidad se puede utilizar sin la agregación de producto. Estas ventajas significativas dirigen esos aspectos: (1) Source 15Q (Amersham Biosciences) se ha seleccionado por su alta capacidad - otras resinas que incluyen Source 30Q (Amersham Biosciences) y Fractogel TMAE (industrias EM) también proporcionan resultados aceptables aunque con capacidades menores que están probablemente causadas por menores relaciones de área superficial eficaz a volumen; (2) PS-80 se ha añadido a los tampones de desarrollo al 0,1% para evitar la agregación; y (3) el producto se carga a una conductividad que es lo suficientemente alta para asegurar que las impurezas de hexón de adenovirus y cromatográficamente similares no se unen a la resina. Por ejemplo, la carga a una conductividad d 38 mS es aproximadamente equivalente a NaCl 0,38 M. La concentración de sal es adecuada para unir partículas de adenovirus pero no impurezas relacionadas; esto se traduce en una mayor capacidad de unión para adenovirus. La conductividad óptima dependerá del serotipo de adenovirus (por ejemplo, Adenovirus de Tipo 6 se debe cargar a aproximadamente NaCl 0,33 M ya que esta concentración permite que el hexón libre permite que las partículas víricas se unan fácilmente). Estas condiciones dan como resultado una etapa que actúa de manera significativa más eficazmente que otras condiciones reseñadas. La figura 1 muestra como actúa este procedimiento. Para propósitos ilustrativos, se muestra un cromatograma preparativo que usa el procedimiento descrito en una corriente que no se ha sometido a precipitación selectiva. En su lugar, el lisado clarificado se ah tratado con altos niveles de nucleasa. Además, la alimentación (Figura 2A), flujo continuo (Figura 2B), y eluido (Figura 2C)) de este planteamiento, el pico comprendido predominantemente por hexón de adenovirus se puede mover al de flujo continuo eliminando cualquier competición para unión y mejorando d manera significativa la resolución de de adenovirus de estas impurezas y la capacidad de columna. el producto de intercambio aniónico se ha diafiltrado después en tampón de formulación y se filtra estéril. Como alternativa, se puede añadir una etapa de cromatografía adicional (por ejemplo, intercambio catiónico) o bien antes o después de la diafiltración con el potencial de mejorar la robustez de impureza y/o eliminación de virus/prión.

Ejemplo 2

60 *Purificación de vector adenovírico MRKAd5gag a partir de lisado de células huésped*

Se obtuvieron aproximadamente 12,5 litros de material lisado por Triton MRKAd5gaga (lote 0114) a partir de un procesamiento en Biorreactor de 300 l y se dividieron en alícuotas de 9,5 y 3 litros. Las alícuotas se precipitaron de manera separada en vasos de precipitado Nalgene de 20 litros. Se especificaron parámetros mixtos para cada alícuota reduciendo las condiciones de precipitación de 1000 l razonables manteniendo un tiempo de recambio volumétrico constante. Ambas alícuotas se precipitaron mediante la adición de DB hasta una concentración final de 0,0435% en peso/vol usando una solución concentrada (DB al 2% en NaCl 40 mM). La velocidad de adición de esta mezcla era 0,3 ml/min para cada litro de lisado. Se añadió la solución DB por debajo de la superficie. El uso de la adición por debajo de la superficie se apoya por los datos generados por los inventores.

ES 2 285 120 T3

Una vez que se completó la precipitación, se llevó a cabo la filtración profunda de manera secuencial sobre cada alícuota usando el mismo aparato de filtración. La clarificación se llevó a cabo usando un filtro Millipore Opticap CE-25 en serie con un Opticap DE-45. Ambos filtros proporcionan áreas de superficie de filtración de 1 pie² (0,093 m²). Los 12,5 l de material precipitado se procesaron de manera exitosa con un aumento de presión máxima en cada filtro de 1 psi (6,89 kPa). Después de la clarificación se redujo la turbidez desde aproximadamente 540 a 3,6 NTU. Como se muestra en la Tabla 2, el rendimiento en esta etapa era solamente el 60% pero parecía estar provocado por un fenómeno de adsorción y por lo tanto estaba exacerbado por el bajo rendimiento usado en este ejemplo.

Solamente 9,5 litros de este material se procesó a través del producto final. La concentración y diafiltración se realizaron usando un ultrafiltro PES de 0,1 m² de NMWCO de 500 kDa (Millipore Pellicon 2). Esta membrana se incorporó en un aparato TFF que contenía una carcasa de filtro de membrana y una bomba de lóbulos. Un factor de concentración de 20 se realizó en el material clarificado para disminuir el volumen del lote total. Después de la concentración, se añadió BenzinasTM a 15 U/ml de material y el lote se recirculó lentamente en el sistema durante dos horas con la línea de perneado cerrada. Después de la incubación el lote se diafiltró contra 5 volúmenes de HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5.

Se realizó una cromatografía de intercambio aniónico a una carga de $2,4 \times 10^{12}$ vp/ml de resina. La caída de presión a lo largo de la columna no se incrementó durante la carga indicando que al corriente estaba esencialmente sin desecho y agentes de suciedad. Además, no se observó casi absorbancia de UV (a 260 ó 280 nm) durante carga de producto, lavado, o después de la elución de producto (Figura 3). Estas observaciones demuestran que el grueso de las impurezas se retiraban hacia debajo de la cromatografía de intercambio aniónico y eran consistentes con los datos de impureza más adelante.

La segunda ultrafiltración se realizó usando cinco membranas PES de 50 cm², de 500 kD. Se llevaron a cabo cinco volúmenes de diafiltración para cambiar el virus en el tampón de formulación. Como se muestra en al tabla 2, el rendimiento a través de esta etapa era menor pero probablemente provocado por la permeación de virus y/o carga de membrana baja. Después el producto se filtró estéril con un filtro de 0,22 micrones de 10 cm² Millipore Sterivex GV. No se observó aumento de presión durante la filtración esterilizante que sugiere una pérdida de virus agregado. Hay que indicar que los rendimientos del procedimiento actual son conservadores ya que no tienen en cuenta el muestreo sustancial para propósitos de análisis.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 285 120 T3

TABLA 2

Tabla de rendimiento para MRKAd5gag

Muestra	Volumen (ml)	AEX (vp/ml)	Parículas de virus	Rendimiento de etapa	Rendimiento neto
Lisado A	9475	$8,68 \times 10^{10}$	$8,23 \times 10^{14}$	100%	100%
Lisado B	3045	$6,12 \times 10^{10}$	$1,86 \times 10^{14}$		
Total	15520		$1,01 \times 10^{15}$		
DB ppt. A ¹	9655	$9,15 \times 10^{10}$	$8,84 \times 10^{14}$	107%	107%
DB ppt. B	3094	$6,26 \times 10^{10}$	$1,94 \times 10^{14}$		
Total	12749		$1,08 \times 10^{15}$		
Lisado clarificado A ²	9553	$3,75 \times 10^{10}$	$3,59 \times 10^{14}$	60%	65%
Lisado clarificado B	3279	$8,89 \times 10^{10}$	$2,91 \times 10^{14}$		
Total	12833		$6,5 \times 10^{14}$		
Retenido UF1	263,3	$1,19 \times 10^{12}$	$3,14 \times 10^{14}$	105%	68%
Lavado UF1	189,4	$3,22 \times 10^{11}$	$0,61 \times 10^{14}$		
Total	427,7		$3,75 \times 10^{14}$		
Conjunto de intercambio iónico ³	205,4	$1,47 \times 10^{12}$	$3,01 \times 10^{14}$	80%	54%
Retenido UF2	276,2	$7,17 \times 10^{11}$	$1,74 \times 10^{14}$	69%	38%
Producto filtrado estéril	231	$7,10 \times 10^{11}$	$1,64 \times 10^{14}$	94	36
1. Precipitado filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,45 micrones antes de ensayo. 2. Solamente lisado A clarificado procesado hacia delante en este ejemplo 3. Solamente 166 ml de AEP se enviaron a la segunda ultrafiltración.					

Los datos de la eliminación de proteína y ADN se ilustran en la Tabla 3. Hay que hacer notar que los niveles de ADN residual están por debajo del límite de cuantificación del ensayo después de intercambio aniónico indicando que el procedimiento ejemplificado tiene una robustez de procedimiento sustancial. Los niveles de proteína específicos no cambian del producto UF1 al producto final y están cerca de los niveles teóricos para adenovirus. Esta observación es completamente consistente con la pérdida de señal de UV mostrada en el flujo continuo de AEX preparativo y lavado. La "limpieza" potenciada de la corriente mediante la precipitación y clarificación se cree que es la causa principal de esta mejora. La Tabla 3 también muestra que la infectividad se mantiene a lo largo del procedimiento.

ES 2 285 120 T3

TABLA 3

Datos de infectividad y eliminación de impurezas de purificación de MRKAd5gag

Intermedio	ADN residual, pg/10 ¹¹ vP	Proteína (BCA) µg/10 ¹¹ vp	AEX/QPA, vp/IU
Lisado	5,52e6	1292	--
DB ptt	3,30e5	811	--
Lisado clar	--	1802	--
UF1 FR	229	14	19
AEP	2,0 (< 5)	13	19
UF2 FR	--	16	--
SFP	2,2 (< 5)	15	16

Ejemplo 3

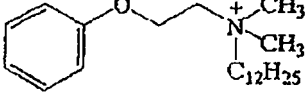
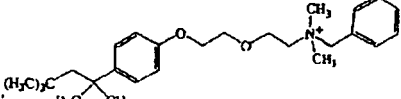
Tensioactivos catiónicos para precipitación de moléculas de ácido nucleico

Se estudiaron tensioactivos alternativos para investigar la especificidad relativa de tipos diferentes de detergentes catiónico. Este ejemplo proporciona un entendimiento adicional de aumento de selectividad de DB. La Tabla 4 contiene la lista de tensioactivos usados en este ejemplo junto con sus pesos de fórmula y estructuras moleculares.

TABLA 4

Diferencias estructurales de detergentes catiónicos

Tensioactivo	Acrónimo	Peso molecular (D)	Estructura
Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio	CTAB	365	
Cloruro de tetradeciltrimetilamonio	TTa	336	
Cloruro de cetilpiridinio	CPC	340	

Bromuro de domifeno	DB	414	
Cloruro de benzalconio	BTC	448	

Se trataron alícuotas de 1 ml con un intervalo de concentraciones de tensioactivos y se agitaron en un aparato Vórtex inmediatamente. Después de la filtración con filtros de jeringa de 0,45 micrones, se analizaron las muestras para evaluar la concentración de ADN mediante ensayo de Picogreen (Molecular Probes) y se determinó la concentración de adenovirus usando un ensayo de HPLC de intercambio aniónico. La Figura 4 muestra los perfiles de precipitación de adenovirus. Una longitud de cadena más corta (por ejemplo, CTAB contra TTA) muestra un perfil de precipitación más distinta. Aunque 0,03% es la máxima concentración de tensioactivo que se puede permitir antes de la precipitación de adenovirus para tanto CTAB como TTA; los perfiles de ADN son diferentes (véase la figura 5). Cuando se comparan los perfiles de precipitación de DB y BTC se encontraron que eran casi idénticos. Aunque, cuando se apartan del borde al que la precipitación de adenovirus comienza, la selectividad para el ADN es mayor para DB que para BTC a todas las concentraciones (véase la Figura 5). Es decir, el contacto entre nitrógeno cargado positivamente de BTC y el grupo fósforo de ADN se puede impedir de manera estérica mediante la proximidad más cercana del anillo de benceno en BTC. Un resultado de la carga que se está blindada o carece de una cola hidrófoba distinta también se puede desechar. Sin embargo, se puede concluir que las estructuras de anillo son más robustas y selectivas para el ADN. La interacción hidrófoba propuesta podría ser la fuerza directora para este fenómeno. Todavía una sola diferencia entre las moléculas de CPC y CTAB es al presencia de un anillo de piridinio. La carga positiva se distribuye a lo largo de este anillo. Como se observa en la Figura 5 la precipitación inicial de adenovirus por CPC y CTAB comienza a 0,03%. Además el perfil de precipitación es mucho menos agresivo cuando se distribuye la carga positiva. Sin embargo, como se observa también en la Figura 5, CTAB precipita más ADN a través de una mayoría de concentraciones de tensioactivos.

Ejemplo 4

Efectos de velocidad mixta sobre la filtración profunda de preparaciones de adenovirus precipitada

La precipitación con bromuro de domifeno (DB) de ADN en el lisado de PERC.6™ es sensible a las condiciones de mezcla. El comportamiento de la filtración profunda para diferentes condiciones de mezcla generadas mediante diferente velocidad de impulsor se evalúa en este ejemplo. MRKA5gag 0114 se precipitó diversas velocidades de impulsor de 30, 65, y 250 rpm. La clarificación consistía en una filtración de dos fases. La filtración se filtró primero usando un CE-25 Millipore Millistak +50 (0,02 pies² (0,00186 m²)) a 9 l/hora/pie² (0,93 m²). El material se reunió y se filtró usando un DE-25 Millipore Millistak +50 (0,02 pies² (0,00186 m²)) al mismo caudal. La presión cae como una función de rendimiento para las diversas condiciones de mezcla se comparan con en control antes de precipitación en la figura 6. El mezclado a 30 rpm mostró un incremento significativo en rendimiento para el filtro CE-25 a 20 psig (137,9 kPa) cuando se compara con el caso control, pero mostró mayores pérdidas en el rendimiento global con relación a las condiciones de mezcla de 65 y 250 rpm. Las otras condiciones de mezclado mostraron menor rendimiento que el caso control para el filtro CE-25, pero mostraron mayor rendimiento global entre la precipitación y filtración profunda que el caso control. La dependencia de clarificación en las condiciones de mezclado subraya la importancia de la reoptimización después de que se hayan determinado las condiciones de mezclado. Como para el rendimiento del DE-45, se observó poco incremento de presión (1 psi (6,89 kPa)) en todo el material examinado. Así ya que el DE-45 nunca llegó a su capacidad, el filtro CE-25 es el factor limitante en el esquema de clarificación. aunque los filtros CE-25 redujeron la turbidez a cantidades variables, como se observa en la tabla 5, los siguientes filtros DE-45 redujeron la turbidez de los lisados precipitados hasta menos de 6 NTU, mientras que solamente reducían la turbidez del lisado precipitado hasta 10.

ES 2 285 120 T3

TABLA 5

Reducción de la turbidez para diversas condiciones de precipitación

Parámetro	Sin precipitar	Velocidad de mezcla		
		30 rpm	65 rpm	250 rpm
Alimentación (NTU)	41	237	200	600
Combinación CE25 (NTU)	14	22	24	4,4
Reducción	66%	91%	88%	99%
Combinación DE25 (NTU)	10	5,2	4,8	2,2
Reducción	29%	76%	80%	50%

Ejemplo 5

Preparación de adenovirus recombinante de un biorreactor de 300 litros

Un cultivo de células a escala de 240 l se realizó en un biorreactor de 300 l. Este lote confirmó la escalabilidad del procedimiento de publicación con operaciones unitarias individuales desarrolladas al equivalente de 60 y 214 litros de suspensión de células. El rendimiento de proceso global era 54% medido mediante HPLC de intercambio aniónico. La relación de capacidad de infección (vp/IU) y contenido de ADN específico del producto final eran 31 vp/IC) y (< 16,5 pg/10¹¹ vp), respectivamente, y eran comparables con los datos históricos.

Lisis - La lisis se completó mediante la adición de tampones concentrados para lograr las concentraciones finales de 0,1% de Triton X-100 y Polisorbato-80 al 0,05%. El lisado se mantuvo durante toda una noche a temperatura ambiente antes de la etapa de preparación de detergente.

Precipitación - la precipitación de ADN se realizó a escala de 214 l en el biorreactor. Una solución de bromuro de domifeno al 0,5% con NaCl 40 mM se añadió por encima de la superficie durante aproximadamente dos horas hasta una concentración final de 0,04% de bromuro de domifeno. El agitador se accionó a 80 rpm durante este tiempo. La velocidad de agitación se seleccionó actuando a un tiempo de recambio volumétrico de que se había demostrado como eficaz a escala más pequeña y que se podía implementar a gran escala. Después de la precipitación, aproximadamente 153 kg de lisado precipitado se transfirió para filtración profunda.

Filtración profunda - El lisado precipitado se clarificó con un esquema de filtración profunda de dos fases. Para este procesamiento, se usaron cartuchos Millstack de 12 pulgadas (0,3048 m) con un filtro de CE20 de 6,8 pies cuadrados (0,6317 metros cuadrados) seguido de un filtro CE-50 de 6,8 pies cuadrados (0,6317 metros cuadrados). La filtración se llevó a cabo a un caudal constante de 2 l/min y se recuperaron 144,2 kg de lisado clarificado. El rendimiento global fue 84%.

Ultrafiltración - Se concentraron aproximadamente 60 l de lisado clarificado 20 veces con 0,3 m² de área de membrana (PES de 500 kDa de Millipore Pellicon II). La velocidad de recirculación se mantuvo a 1 l/min y se controló el flujo del perneado a 0,3 l/min. La digestión por nucleasa se realizó mediante la adición de 15 U/ml de Benzonase™ seguido de dos horas de incubación a temperatura ambiente. A continuación, se cambió el tampón con 5 volúmenes de diafiltración de HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 para la eliminación de impurezas. El producto se mantuvo durante toda una noche a 4°C.

Cromatografía de intercambio aniónico - El producto UF1 se diluyó hasta una conductividad de 38 mS/cm usando HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, PS-80 al 0,1%, pH 7,5. Una columna FineLine de 10 cm de diámetro (Amersham Biosciences) se envasó con un total de 863,5 ml de resina Source 15Q (Amersham Biosciences). El producto se cargó a una velocidad lineal de 1,5 cm/min, se lavó con 5 volúmenes de columna de HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 0,39 M, PS-80 al 0,1%, pH 7,5. Una columna FineLine de 10 cm de diámetro y después se eluyó durante un gradiente de 4 columnas a NaCl 0,47 M.

ES 2 285 120 T3

Ultrafiltración - El máximo de producto se diluyó y se ajustó hasta una concentración de adenovirus de aproximadamente $1,05 \times 10^{12}$ vp/ml y una concentración de sal de NaCl 1 M. El lote se diafiltró en tampón de formulación (Tris 5 mM, NaCl 75 mM, $MgCl_2$ 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 8,0) mediante una membrana PEs de 500 kDa de $0,1 \text{ m}^2$ (Millipore Pellicon II Biomax). El flujo de permeado se mantuvo a 80 ml/min.

Filtración esterilizante - El retenido de ultrafiltración se filtró para esterilizar con un filtro Millipore Millipak-20 (100 cm^2) a un caudal constante de 150 ml/min.

La Tabla 6 muestra los rendimientos de etapa y neto de MRKAd5gaga. Este lote produjo $1,91E15$ partículas víricas con un rendimiento global neto de 54%. Hay que indicar que en algunos casos la entrada a una etapa es significativamente menor que la salida de la etapa anterior debido al muestreo.

TABLA 6

Tabla de rendimiento de MRKAd5gaga

Muestra	Vol, ml	AEX, vp/ml	Ad, vp	Rendimiento de etapa	rendimiento neto
Lisado	214200	$6,4 \times 10^{10}$	$1,37 \times 10^{10}$		
Precipitado ¹	232850	$5,08 \times 10^{10}$	$1,18 \times 10^{10}$	86%	86%
Alimentación de filtración profunda	152906	$5,08 \times 10^{10}$	$7,77 \times 10^{15}$		
Lisado clarificado	144224	$4,70 \times 10^{10}$	$3,39 \times 10^{15}$	55%	73%
Alimentación de UF1	59885	$5,08 \times 10^{10}$	$3,04 \times 10^{15}$	108%	79%
Retenido de UF1	2925	$9,82 \times 10^{11}$	$2,87 \times 10^{15}$		
Lavado de UF1	501	$5,58 \times 10^{10}$	$2,79 \times 10^{15}$		
Total de P1	3429	$8,46 \times 10^{11}$	$2,90 \times 10^{15}$	96%	75%
Alimentación de AE	8357	$3,37 \times 10^{11}$	$2,81 \times 10^{15}$	97%	73%
Producto de AE	1198	$1,77 \times 10^{12}$	$2,12 \times 10^{15}$	75%	55%
AEP ² diluido	2000	$1,05 \times 10^{12}$	$2,10 \times 10^{15}$		
Alimentación de UF ²	1900	$1,05 \times 10^{12}$	$1,99 \times 10^{15}$		
Retenido de UF2	1876	$1,05 \times 10^{12}$	$2,81 \times 10^{15}$	99%	55%
Alimentación de SF	1864	$1,05 \times 10^{12}$	$2,12 \times 10^{15}$		
Producto Filtrado estéril	1935	$9,95E+11$	$2,10 \times 10^{15}$	98%	54%
1. Filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,45 micrones antes del ensayo.					
2. Valor calculado					

ES 2 285 120 T3

La figura 7 muestra el análisis mediante SDS-PAGE del lote ejemplificado así como algunos experimentos adicionales que no se describen en esta memoria descriptiva. Las bandas 2-4, en particular, muestran procedimientos intermedios de este ejemplo y demuestran la alta pureza del producto ya que todas las bandas significativas se identifican como proteínas estructurales de adenovirus.

La Tabla 7 resume la retirada de ADN del lote. Se logró una reducción de ADN de 2 logs mediante la precipitación y filtración profunda. De nuevo, se logran los niveles cerca del límite de detección del ensayo. La Tabla 7 también presenta el perfil de eliminación de detergente durante este procesamiento ejemplificado. Los detergentes se eliminaron tanto eficazmente en intercambio aniónico como ultrafiltración segunda. La cantidad de detergente en la corriente del producto se redujo hasta por debajo del límite de detección (aproximadamente 0,001% después de UF2).

TABLA 7

Retirada de impurezas durante el lote MRKAd5gaga0123A

Intermedio	ADN (QPCR) (pg/10 ¹¹ vp)	Triton (%)	DB (%)
Lisado	1,9 x 10 ⁷	0,109	< 0,001%
Lisado clarificado	8,3 x 10 ⁴	0,078	0,011
Producto UF1	3410	0,297	0,122
AEP	30	0,007	0,008
Retenido UF2	< 5	< 0,001%	< 0,001%
Producto filtrado estéril	5	< 0,001%	< 0,001%

Ejemplo 6

Precipitación de CTAB frente a uso de niveles altos de nucleasa

Se utilizó MRKAd5gaga para comparar un procedimiento que incorpora la precipitación de CTAB y sin tratamiento de nucleasa (brazo C) con un procedimiento que utiliza niveles altos de nucleasa (150 U/ml, Benzonase™, 150 U/ml de ARNasa) pero sin precipitación (Brazo A). La tabla 8 contiene los datos de eliminación de ADN residual para ambos brazos de purificación. Hay que hacer notar que la precipitación de CTAB reduce el ADN global temprano en el procedimiento mientras que el caso base logra la mayoría de su eliminación a través del tratamiento de nucleasa (UF1 CR a UF1 DR). Los niveles de ADN en el producto de intercambio aniónico (AEP) están dentro de la variabilidad del ensayo. Estos datos muestran que una etapa de precipitación basada en detergente puede reemplazar un tratamiento de nucleasa de alta concentración completamente sin un impacto sobre la calidad del producto.

TABLA 8

ADN residual

Resultados de digestión por Benzonase™ contra precipitación de ADN mediante CTAB			
Intermedio del procedimiento	del	MRKAd5gag0112A	MRKAd5gag0112C
		ADN residual (pg/1E11 vp)	ADN residual (pg/1E11 vp)
Lisado		9,87 x 10 ⁷	9,87 x 10 ⁷
Lisado clarificado		7,25 x 10 ⁶	1,10 x 10 ⁶
Retenido de concentración de UF1	de	1,01 x 10 ⁷	--
Retenido de UF1		2,58 x 10 ³	5,38 x 10 ⁵
AEP (Producto de intercambio aniónico)	de	595	260

ES 2 285 120 T3

Ejemplo 7

Precipitación por CPC y bromuro de domifeno

5 En este ejemplo, se comparan procedimientos que utilizan precipitación por CPC o por DB (sin uso de nucleasa) a un control de alto nivel de nucleasa. En particular, se comparan los siguientes escenarios de purificación

10 0113A: Sin precipitación, Benzonase Y ARNasa a 150 U/ml cada uno, carga de AEX a aproximadamente 5×10^{12} vp/ml

10 0113C: Precipitado con CPC, sin uso de nucleasa, carga de AEX a aproximadamente 5×10^{12} vp/ml

10 0113D: Precipitado con DB, sin uso de nucleasa, carga de AEX a aproximadamente 5×10^{12} vp/ml

15 Los rendimientos de etapa eran comparables a través de tres brazos excepto para rendimientos inusualmente bajos de UF1 en el brazo A (véase la tabla 9).

TABLA 9

Tabla de rendimiento para MRK.Ad5gag0113

ETAPA	0113A1	0113C	0113D
PPT		102%	100%
CL	83%	84%	93%
UF1 FR	60%	109%	110%
AEP	76%	88%	80%
NET	38%	82%	82%

35 Los datos de ADN residual para el lote se enumeran en la tabla 10. Estos datos sugieren una alta eficiencia global para los procedimientos basados en precipitación incluso en la ausencia de cualquier uso de nucleasa. el producto de intercambio aniónico no se procesó a través de UF2 en este ejemplo, así los valores del producto final no están disponibles.

TABLA 10

Eliminación de ADN para MRKAd5gag0113

Intermedio	ADN de PER.C6 residual, pg/1e11 vp		
	0113A	0113C	0113D
LYS	$8,20 \times 10^6$	$8,20 \times 10^6$	$8,20 \times 10^6$
Retenido de UF1	116	4,88e5	4,98e5
AEP	8,7	59	26

60 La eliminación de proteína se muestra en la tabla 11 más adelante. La eficacia de la eliminación de proteína en la etapa UF1 parece mejorar significativamente antes de la precipitación, pero las diferencias de pureza en la etapa AEP no se pueden discernir usando proteína total ya que la gran mayoría de la proteína presente es el producto. Como resultado, la impureza de proteína relativa para los AEP se dirige mediante análisis de SDS-PAGE en el ejemplo 8.

65

ES 2 285 120 T3

TABLA 11

Eliminación de proteína total para lotes de MRKAd5gag0113 (ensayo BCA)

Intermedio	0113A $\mu\text{g}/10^{11}$ vp	0113C $\mu\text{g}/10^{11}$ vp	0113D $\mu\text{g}/10^{11}$ vp
LYS	1370	1255	1450
CL	1201	1183	1210
UF1 DR	228	66	113
AEP	15	13	13

Mientras que el CTAB se muestra que no tiene un efecto sobre la infectividad de adenovirus (lote 0112), las diferencias estructurales y diferencias de mecanismo posible de precipitación por CPC y DB garantizaron datos de infectividad adicionales. Para estas tres purificaciones, la relación de partículas virales a unidades infecciosas era como sigue: A-26 vp/IU; C-32 vp/IU; D-29 vp/IU. Estas relaciones son estadísticamente equivalentes y demuestran que los procedimientos esbozados en esta memoria descriptiva no tienen impacto en la infectividad del producto.

Ejemplo 8

Análisis de SDS-PAGE para los lotes MRKAd5gag0112, MRKAd5gag0113, MRKAd5gag0114

Se realizó un análisis de proteína en gel de SDS-PAGE sobre las muestras en curso a partir de lotes de purificación adicional MRKAd5gag0112, MRKAd5gag0113 (Ejemplo 7) y MRKAd5gag0114 (Ejemplo 2), como se muestra en la Figura 8. Se pueden hacer varias observaciones importantes. Primero la incorporación de la precipitación de CTAB (0112C, banda 3) parece conducir a una pureza de proteína más alta en el producto de intercambio aniónico (AEP) que el brazo control (0112A, banda 2). Segundo las bandas 5-10 muestran una pureza similar para el AEP a pesar de las siguientes variaciones de procedimiento: (a) carga AEX a 5, 10, y 15×10^{12} vp por ml de resina con 150 U/ml de tratamiento de Benzonase™ y sin precipitación (0113A1-A3-líneas 5-7); (b) uso de solamente 5 U/ml de Benzonase sin precipitación (0113B-banda 8); (c) precipitación por CPC o DB sin uso de nucleasa (0113C y D, bandas 9 y 10). Tercero, el AEP del lote 0114 (banda 4), que se incorporó tanto por precipitación por DB como por uso de bajo nivel de Benzonase, muestra mejor pureza de proteína (por ejemplo, impurezas de menos de 39- y 50 kDa).

Ejemplo 9

Purificación a escala de 600 litros de adenovirus de tipo 5

El procedimiento se aumentó a escala adicionalmente, comenzando con 600 l de lisada de células. Las especificaciones del procedimiento usadas son similares a las descritas en el ejemplo 5, pero incluyen las siguientes diferencias: (1) la filtración profunda se realizó con un filtro Millipore seguido de un filtro CUNO CP50 (incorpora carga positiva) en una relación de área de 2:1, (2) se usaron ultrafiltros de 200 kDa, (3) PS-80 al 0,1% está incluido en el tampón de diafiltración, y (4) un adenovirus recombinante sometido a purificación era MRKAd5pol, que se describe en detalle en la publicación PCT WO 02/22080.

Los rendimientos para este procedimiento se muestran en la Tabla 12. La infectividad del producto final se confirmó mediante un ensayo TCID₅₀, con una relación de infectividad de 4 vp/IU. El tamaño de partícula media por dispersión de luz dinámica era 123 nm, consistente con expectativas teóricas. Los niveles de ADN residual específico, niveles de proteína total, y compuestos residuales del procedimiento se muestran en la tabla 13. Estos datos confirman además la escalabilidad de este procedimiento.

ES 2 285 120 T3

TABLA 12

Tabla de rendimiento de MRKA5pol para la purificación a escala de 600 l

Muestra	Vol, l	AEX, vp/ml	Ad, vp	Rendimiento de etapa ²	Rendimiento neto
Lisado	615	$2,62 \times 10^{10}$	$1,61 \times 10^{16}$	--	--
Precipitado ¹	668	$2,32 \times 10^{10}$	$1,55 \times 10^{16}$	96%	96%
Lisado clarificado	672	$1,83 \times 10^{10}$	$1,23 \times 10^{16}$	80%	77%
Producto UF1	30,6	$3,53 \times 10^{11}$	$1,08 \times 10^{16}$	93%	71%
Producto AE	2,64	$3,55 \times 10^{12}$	$9,37 \times 10^{15}$	89%	64%
Producto UF2	11,3	$7,22 \times 10^{11}$	$8,16 \times 10^{15}$	92%	59%
Producto filtrado estéril	10,3	$7,10 \times 10^{11}$	$7,31 \times 10^{15}$	98%	58%

1. Filtrado a través de un filtro de jeringa PVDF de 0,45 micrones antes de ensayo.
 2. Rendimientos de etapa teniendo en cuenta muestras grandes tomadas de intermedios del procedimiento (incluye precipitado: 2,2 l; lisado clarificado: 37,3 l; producto UF1: 0,8 l; producto AE: 0,15 l; producto UF2: 1,0 l)

TABLA 13

Eliminación de impurezas durante la purificación a escala de 600 l

Muestra	ADN (QPCR) pg/10 ¹¹ vp	Proteína (BCA) pg/10 ¹¹ vp	% de Triton	% de DB
Lisado	3,5E+07	2313	0,134	--
Lisado clarificado	8,4E+04	2404	0,082	0,021
Producto UF1	736	114	0,113	0,031
Producto AE	20	9	0,003	0,003
Producto UF2	17	8	< 0,0012	< 0,008
Producto filtrado estéril	14	8	< 0,0012	< 0,008

Ejemplo 10

Adenovirus de tipo 6

En este ejemplo, se purificó adenovirus de tipo 6 (del subgrupo C). Los cambios en el procedimiento en este ejemplo están predominantemente en la etapa de en la etapa de cromatografía de intercambio aniónica preparativa. Ahí, el producto UF1 se diluyó hasta aproximadamente 30,7 mS/cm y se cargó en la resina Source 15Q. La columna se lavó con un tampón que contenía NaCl 0,32 M. La elución del producto se produjo a través de un gradiente de

ES 2 285 120 T3

columna de 4 columnas hasta una concentración de NaCl de 0,41 M. Por otra parte, el procedimiento se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito en el ejemplo 9.

Los rendimientos de esta purificación demuestran que el comportamiento del procedimiento es comparable a Ad5 (tabla 5). Específicamente, los niveles de ADN residual mediante Q-PCR se redujeron por encima de 2 logs después de la precipitación y clarificación. Los niveles se reducen hasta $3 \text{ pg}/10^{11} \text{ vp}$ en el producto. Los valores de proteína total específicos (Tabla 15) también indican que la gran mayoría de la proteína total se elimina al final de UF1 y las impurezas residuales se normalizan después de AEX. Como se ha observado con el adenovirus de tipo 5 estos datos indican que los tipos de adenovirus en el mismo subgrupo se pueden purificar.

TABLA 14

Tabla de rendimiento de Ad6 para la purificación a escala de 20 l

Muestra	Vol, ml	AEX, vp/ml ²	Ad, vp	Rendimiento de etapa ²	Rendimiento neto
Lisado	3664	$1,06 \times 10^{11}$	$3,88 \times 10^{14}$	--	--
Precipitado ¹	3952	$1,01 \times 10^{11}$	$3,99 \times 10^{14}$	103%	103%
Lisado clarificado	3898	$8,71 \times 10^{10}$	$3,40 \times 10^{14}$	85%	88%
Producto UF1	185,7	$1,58 \times 10^{12}$	$2,93 \times 10^{14}$	87%	77%
Producto AE	101,6	$1,76 \times 10^{12}$	$1,79 \times 10^{14}$	63%	48%
Producto UF2	135,9	$1,13 \times 10^{12}$	$1,54 \times 10^{14}$	92%	44%
Producto filtrado estéril	141,4	$1,01 \times 10^{12}$	$1,43 \times 10^{14}$	100%	44%
1. Filtrado a través de un filtro de jeringa PVDF de 0,45 micrones antes de ensayo. 2. Resultados calculados a partir de la curva patrón de Ad5 3. Los rendimientos de etapa consideran el muestreo de intermedios (no mostrado)					

TABLA 15

Eliminación de impurezas durante la purificación de Ad6 a escala de 20 l

Muestra	ADN (QPCR) pg/10 ¹¹ vp	Proteína (BCA) pg/10 ¹¹ vp	% de Triton	% de DB
Lisado	5,8E+06	641	0,135	--
Lisado clarificado	4,2E+04	439	0,084	0,016
Producto UF1	310	37	0,017	0,041
Producto AE	20	10	< 0,0012	< 0,008
Producto UF2	5	10	< 0,0012	< 0,008
Producto filtrado estéril	3	7	< 0,0012	< 0,008

ES 2 285 120 T3

Ejemplo 11

Adenovirus de tipo 35 (Ad35pol)

5 En este ejemplo, se purificó adenovirus de tipo 35 (del subgrupo B). Los cambios en el procedimiento cuando se comparan con el ejemplo 5 estaban predominantemente en la etapa de en la etapa de cromatografía de intercambio aniónica preparativa. Ahí, el producto UF1 se diluyó hasta aproximadamente 28 mS/cm y se cargó en la resina Source 15Q. La columna se lavó con un tampón que contenía NaCl 0,29 M y se eluyó en un gradiente de columna de 4 columnas hasta una concentración de NaCl de 0,38 M. Por otra parte, el procedimiento se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito en los ejemplos 5 y 9.

15 Los rendimientos de esta purificación demuestran que el comportamiento del procedimiento es comparable a Ad5 (Tabla 16). Los niveles específicos de ADN residual mediante Q-PCR se redujeron por encima de 3 logs después de la precipitación y clarificación hasta 11 ng/10¹¹ vp. Los niveles se reducen hasta 1,0 ng/10¹¹ vp después de la primera ultrafiltración (UF1). Los valores de proteína total específicos (Tabla 17) también indican que la gran mayoría de la proteína total se elimina al final de UF1; estos datos indican que este producto alcanza relativamente alta pureza sin ninguna purificación cromatográfica y que muchos subgrupos de adenovirus se pueden purificar mediante el procedimiento existente, a saber someter un lisado clarificado, precipitado por SPA a una sola etapa de ultrafiltración.

TABLA 16

Tabla de rendimiento de Ad35 para la purificación a escala de 20 l

Muestra	Vol, ml	AEX, vp/ml ²	Ad, vp	Rendimiento de etapa ²	Rendimiento neto
Lisado	20723	4,31 x 10 ¹⁰	8,93 x 10 ¹⁴	--	--
Precipitado ¹	22371	3,64 x 10 ¹⁰	3,99 x 10 ¹⁴	91%	91%
Lisado clarificado	22259	2,86 x 10 ¹⁰	3,40 x 10 ¹⁴	78%	71%
Producto UF1	949	4,54 x 10 ¹¹	2,93 x 10 ¹⁴	75%	53%
Producto AE	137	2,85 x 10 ¹²	1,79 x 10 ¹⁴	93%	49%
Producto UF2	448	6,64 x 10 ¹¹	1,54 x 10 ¹⁴	78%	39%
Producto filtrado estéril	438	6,43 x 10 ¹¹	2,81 x 10 ¹⁴	99%	38%
1. Filtrado a través de un filtro de jeringa PVDF de 0,45 micrones antes de ensayo. 2. Resultados calculados a partir de la curva patrón de Ad5 3. Los rendimientos de etapa consideran el muestreo de intermedios (no mostrado)					

TABLA 17

Eliminación de proteínas durante la purificación de Ad35 en 20 l

Muestra	Proteína (BCA) ug/10 ¹¹ vp
Lisado	1803
Lisado clarificado	1549
Producto UF1	24
Producto AE	17
Producto UF2	14
Producto filtrado estéril	15

ES 2 285 120 T3

Ejemplo 12

Separación de adenovirus de Tipos 5, 24 y 36 mediante intercambio aniónico

5 Pequeñas cantidades de cromatografía de adenovirus purificado por CsCl-ultracentrifugación se inyectaron en una columna Source 15Q de escala analítica (véase la Figura 9), se usó un gradiente de NaCl de 0,2 a 0,6 M. El procedimiento claramente es capaz de de unirse/eluir virus del subgrupo C (Ad5), subgrupo D (Ad24), o subgrupo B (Ad35). Además, mediante la inyección de nuevos tipos de un tipo conocido (en el caso Ad5), el tiempo de elución relativa se puede calcular; a partir del tiempo de elución relativo y conocimiento de tampones preparativos para Ad5,
10 los tampones preparativos para cualquier otro serotipo se pueden determinar fácilmente. Este cambio es la única modificación notable necesaria para adaptar esta invención a otros serotipos de adenovirus.

Ejemplo 13

15 *Precipitación con Bromuro de domifeno de adenovirus de Tipos 5, 35 y 6*

Se añadió un intervalo de concentraciones de DB (0 a 0,065%) a viales de 1 ml de diferentes lisados de células de adenovirus que contenían aproximadamente triton al 0,1%, PS-80 al 0,05%, MgCl₂ 2 nM, y Tris 25 mM, pH 8. Las células se prepararon en cultivo en suspensión con infección a aproximadamente 10⁶ células/ml. Estas muestras se agitaron en un aparato Vórtex inmediatamente y se filtraron con filtros de jeringa de 0,45 micrones. Se retiraron alícuotas para la determinación de adenovirus y concentraciones de ADN mediante ensayos de AEX-HPLC y Picogreen.

Como se muestra en la figura 10, el adenovirus no precipita de manera apreciable a concentraciones de bromuro de domifeno por debajo de 0,05%. Por lo tanto, la adición de bromuro de domifeno a niveles entre 0,03 y 0,05% dará como resultado la precipitación selectiva de ADN. Para las propiedades de corriente particulares usadas aquí, la adición a 0,04% es adecuada para todos los serotipos. La precipitación de impurezas residuales mediante CPC, CTAB, y SPA alternativos mencionados también muestra un comportamiento similar a través de los múltiples subgrupos de adenovirus.

Ejemplo 14

Procedimiento de purificación de Ad5 con intercambio catiónico

La purificación de adenovirus que usa un procedimiento que incluye intercambio catiónico puede proceder a través de cromatografía de intercambio aniónico como se describe en los ejemplos precedentes. Este ejemplo describe el procesamiento del producto de intercambio aniónico a través de una segunda filtración, un ajuste de pF, intercambio catiónico de flujo continuo, y un segundo ajuste de pH/tampón para llegar a un producto en el tampón de formulación final.

El producto de intercambio aniónico se diluyó y se ajustó hasta una concentración de adenovirus de aproximadamente $1,77 \times 10^{12}$ vp/ml y una concentración de sal de NaCl 1 M. El lote se diafiltró en tampón (Tris 5 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 7,4) mediante tres membranas PES de 300 kDa de 0,05 m² (Millipore Pellicon XL). El flujo de perneado se mantuvo a 80 ml/min-m².

El retenido ultrafiltrado se ajustó a pH hasta aproximadamente 6,5 con tampón Tris 5 mM, Histidina 0,2 M, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005, HCl 50 mM, pH 6,5) antes de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico. Se empaquetó una columna Vantage L de 1,6 cm de diámetro (Millipore Corporation) con 18,8 ml de resina Source 30S (Amersham Biosciences). El producto se cargó a una velocidad lineal de 1 cm/min y se lavó con 6 volúmenes de columna de tampón (Tris 5 mM, Histidina 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,02%, pH 6,5. La operación se desarrolló en modo de flujo continuo y la recogida de producto se detuvo una vez que la línea base alcanzó la A₂₆₀. El producto se ajustó a las condiciones de formulación añadiendo tampón Tris 0,17 M, Histidina 10 mM, NaCl 2,27 M, MgCl₂ 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,02%, pH 9,3. La Tabla 18 muestra el rendimiento para este procedimiento.

55

60

65

ES 2 285 120 T3

TABLA 18

Tabla de rendimiento de MRKAd5gaga para la ultrafiltración e intercambio catiónico

Muestra	Vol, ml	AEX, vp/ml	Ad, vp	Rendimiento de etapa ²	Rendimiento neto
AEP	80,6	3,96E12	3,19E14	--	--
Alimentación de UF2	179,5	1,77E12	3,17E14	99%	99%
Retenido de UF2	206,9	1,26E12	2,61E14	83%	83%
Ajuste pre - CEX	199,1	1,18E12	2,35E14	97%	80%
CEP	224,2	8,56E11	1,92E14	88%	71%
Ajuste post - CEX	223,0	8,49E11	1,89E14	102%	72%
* Los rendimientos de etapa son responsables entre las etapas (no mostrado)					

Ejemplo 15

Clarificación del lisado precipitado con centrifugación continua - MRK Ad5pol

Este ejemplo demuestra que se puede usar una centrífuga continua con filtro profundo de refinado para clarificar el lisado de células precipitado. El lisado de células precipitado de un lote de Ad5 se centrifugó usando una centrífuga continua CARR Pilot Powerfuge a un tiempo de residencia de 2 min y tanto 20.000g como 10.000 g. El recipiente usado tenía un volumen de aproximadamente 1 l. El centrifugado se alimentó de forma continua en un filtro profundo CUNO CP50 a 0,14 lpm/pie² (0,093 m²) a una carga de 60 l/pie² (0,093 m²). Las muestras de centrifugado y filtrado puntuales se tomaron periódicamente para controlar el progreso de la clarificación. Los rendimientos de adenovirus a través de la centrifugación estaban en exceso de 90%, con un rendimiento de clarificación global de 80%. La turbidez del lisado clarificado era menor que 2 NTU. El lisado clarificado combinado se procesó después como se ha descrito en otros ejemplos con resultados similares en términos de eliminación de ADN residual, pureza de proteína, e infectividad de producto.

ES 2 285 120 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de purificación de partículas de virus a partir de un lisado de células huésped que comprende la precipitación selectiva de ADN separándolo así de las partículas de virus mediante la adición de un agente de precipitación selectiva al medio de cultivo de células huésped después de la lisis de manera que al menos el 80% de ADN impuro precipite en el medio que contiene las partículas de virus, en el que dicho agente de precipitación selectiva se selecciona entre PEI, sales de monoalquiltrimetilamonio, sales de monoalquildimetilbencilamonio, sales de dialquildimetilamonio, sales de amonio heteroaromáticas, sales de amonio bis- cuaternario y sales de amonio cuaternario poliméricas.
- 10 2. Un procedimiento de la reivindicación 1 en el que el agente de precipitación selectiva se selecciona entre el grupo constituido por DB, CPC, CTAB, BTC, TTA y PEI.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las partículas de virus son partículas de adenovirus.
- 20 4. Un procedimiento de la reivindicación 3 en el que el agente de precipitación selectiva se selecciona entre el grupo constituido por DB, CPC, CTAB, BTC, TTA y PEI.
- 25 5. Un procedimiento de la reivindicación 3 o reivindicación 4 que comprende:
- a) lisar las células huésped dentro de la preparación de cultivo de células;
 - b) precipitar de manera selectiva el ADN en la preparación de cultivo de células separándolo así de las partículas de adenovirus mediante la adición del agente de precipitación selectiva;
 - c) clarificar el medio que contiene las partículas de adenovirus; y
 - d) llevar a cabo la ultrafiltración en el medio que contiene adenovirus de la etapa c), dando como resultado una población de partículas de adenovirus concentradas, purificadas.
- 30 6. Un procedimiento de la reivindicación 5 en el que la etapa c se realiza mediante un procedimiento seleccionado entre el grupo constituido por filtración profunda, filtración sin salida, microfiltración, centrifugación o una combinación de las mismas.
- 35 7. Un procedimiento de la reivindicación 5 en el que la etapa c) se realiza mediante filtración profunda.
- 40 8. Un procedimiento de la reivindicación 5 en el que la etapa c) se realiza mediante la combinación de centrifugación y filtración profunda.
- 45 9. Un procedimiento de la reivindicación 5 en el que las partículas de adenovirus purificadas de la etapa d) se someten a cromatografía de intercambio catiónico.
- 50 10. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que el medio clarificado de la etapa c) se trata con una nucleasa.
- 55 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 que comprende:
- a) lisar las células dentro de la preparación de cultivo de células;
 - b) precipitar de manera selectiva el ADN en la preparación de cultivo de células separándolo así de las partículas de adenovirus mediante la adición del agente de precipitación selectiva;
 - c) clarificar el medio que contiene las partículas de adenovirus;
 - d) someter el medio que contiene adenovirus de la etapa c) a una cromatografía de intercambio aniónico, y
 - e) diafiltrar el eluido que contiene adenovirus recuperado de la etapa d), dando como resultado una población de partículas de adenovirus concentradas, purificadas.
- 60 12. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que la etapa c) se realiza mediante un procedimiento seleccionado entre el grupo constituido por filtración profunda, filtración sin salida, microfiltración, centrifugación o una combinación de las mismas.
- 65 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 ó reivindicación 4 que comprende:
- a) lisar las células huésped dentro de la preparación de cultivo de células huésped;

ES 2 285 120 T3

b) precipitar de manera selectiva el desecho de células huésped en la preparación de cultivo de células huésped separándolo así de las partículas de adenovirus mediante la adición del agente de precipitación selectiva;

5 c) clarificar el medio que contiene las partículas de adenovirus;

d) llevar a cabo un primer procedimiento de ultrafiltración en el medio que contiene adenovirus de la etapa c);

e) someter el medio que contiene adenovirus de la etapa d) a una cromatografía de intercambio aniónico;

10 f) llevar a cabo un segundo procedimiento de ultrafiltración en el medio que contiene adenovirus recuperado de la etapa e); y

g) opcionalmente someter las partículas de adenovirus de la etapa f) a una cromatografía de intercambio catiónico, dando como resultado una población de partículas de adenovirus concentradas, purificadas.

15 14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa c) se realiza mediante un procedimiento seleccionado entre el grupo constituido por filtración profunda, filtración sin salida, microfiltración, centrifugación o una combinación de las mismas.

20 15. Un procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa c) se realiza mediante filtración profunda.

16. Un procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa c) se realiza mediante la combinación de centrifugación y filtración profunda.

25 17. Un procedimiento de la reivindicación 11 o reivindicación 13 en el que la cromatografía de intercambio aniónico de la etapa d) o e), respectivamente, emplea un tampón que comprende un detergente.

18. Un procedimiento de la reivindicación 17 en el que el detergente es un tensioactivo no iónico.

30 19. Un procedimiento de la reivindicación 18 en el que el detergente es polisorbato-80 (PS-80).

20. Un procedimiento de la reivindicación 19 en el que la concentración de PS-80 es 0,1%.

35 21. Un procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa d) comprende diafiltración en un tampón con un pH entre 6,5 y 8,0.

22. Un procedimiento de la reivindicación 21 en el que la etapa d) comprende diafiltración en un tampón que comprende HEPES 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5.

40 23. Un procedimiento de la reivindicación 21 en el que el tampón comprende además polisorbato-80 (PS-80).

24. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa (f) comprende diafiltración en un tampón que contiene polisorbato-80 (PS-80).

45 25. El procedimiento de la reivindicación 24 en el que dicho tampón comprende Tris 5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 8,0.

50

55

60

65

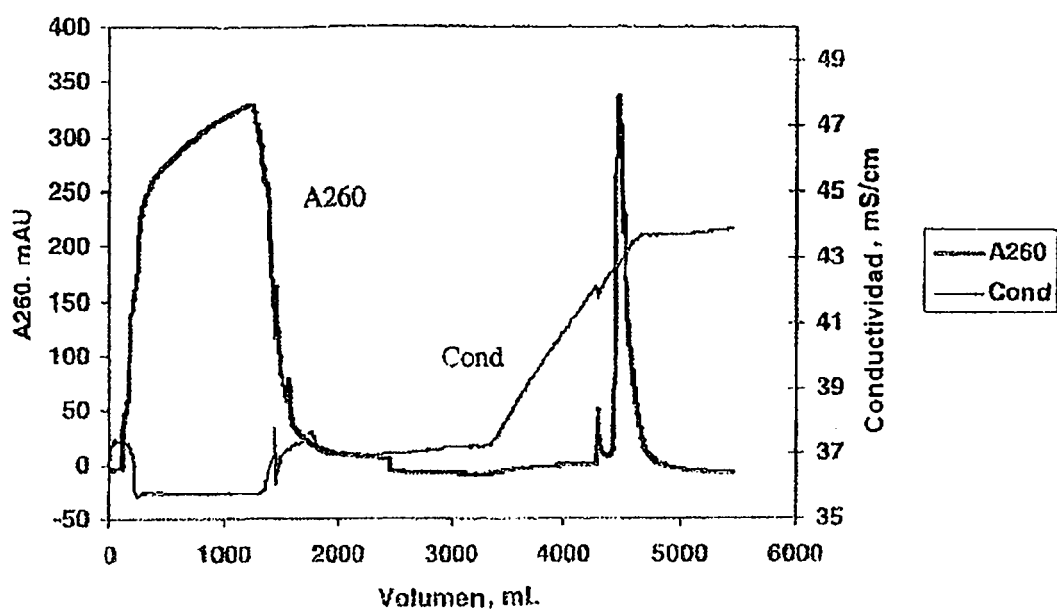
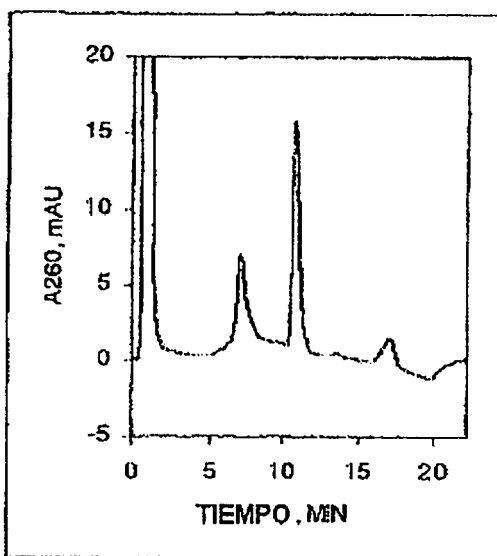
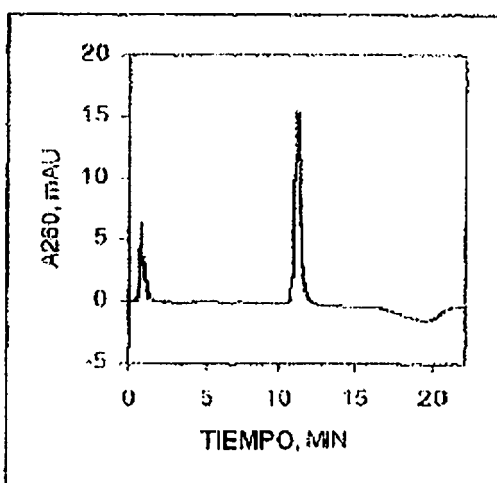
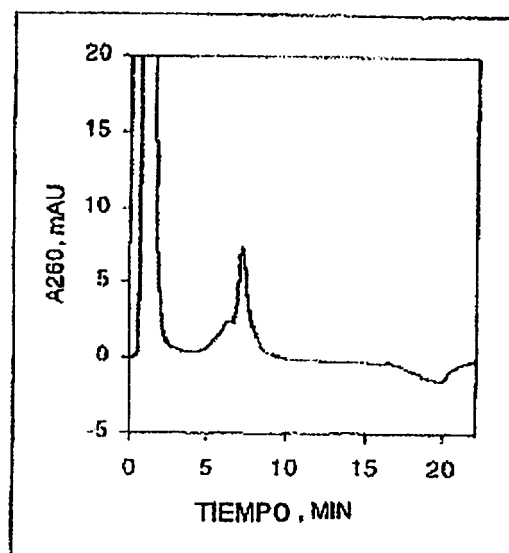


FIGURA 1

A. Alimentación



B. Flujo directo



**C. Acúmulo de producto
(eluido)**

FIGURA 2A, 2B, 2C

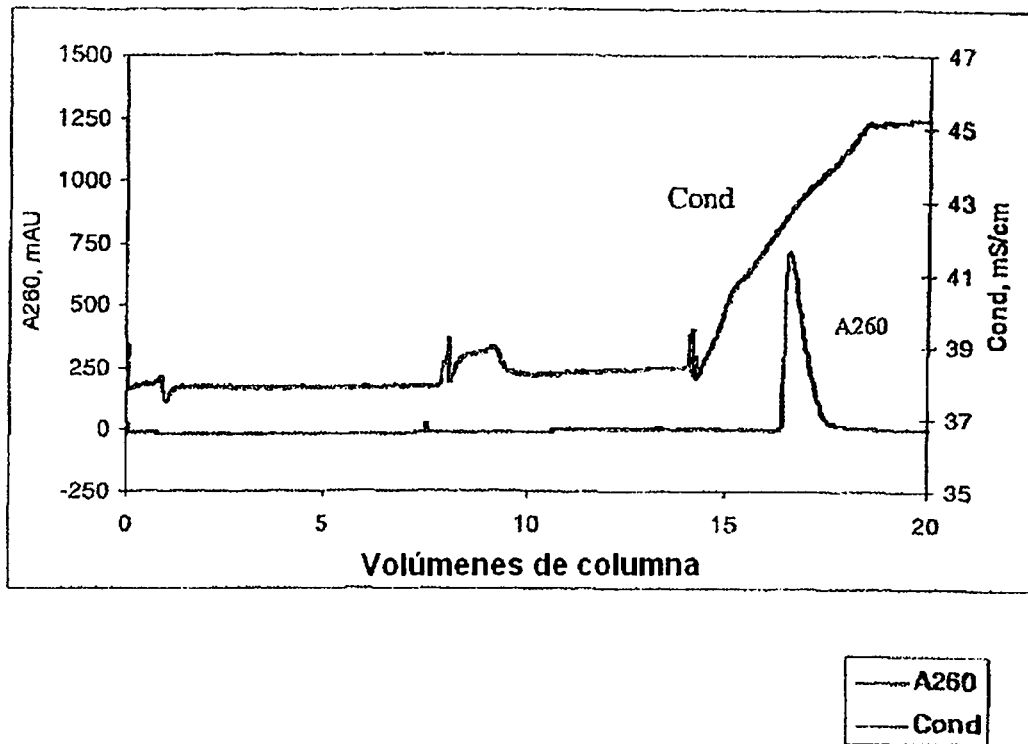


FIGURA 3

Perfiles de precipitación de adenovirus para detergentes catiónicos

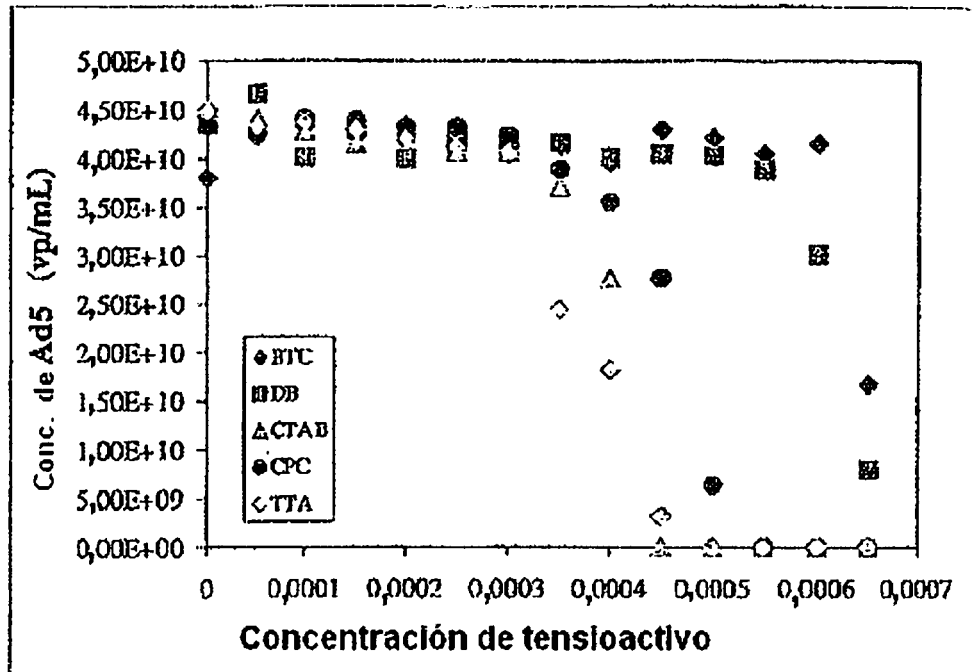


FIGURA 4

Perfiles de precipitación de ADN para detergentes catiónicos

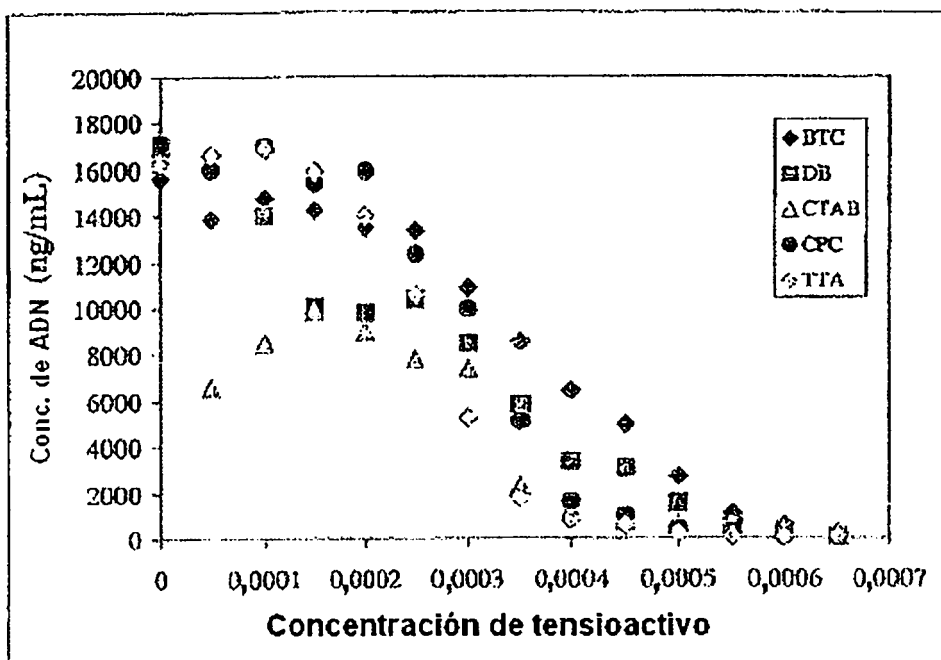


FIGURA 5

Capacidades de filtración profunda para diversas condiciones de precipitación

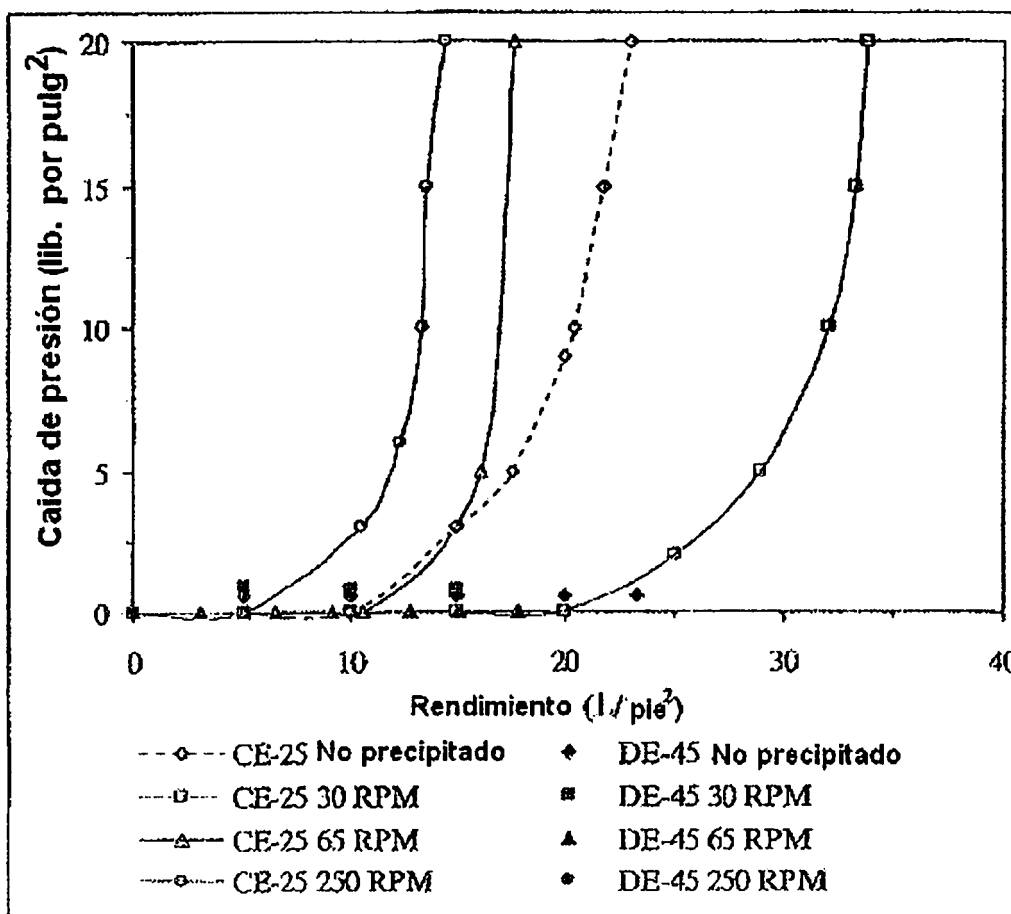


FIGURA 6

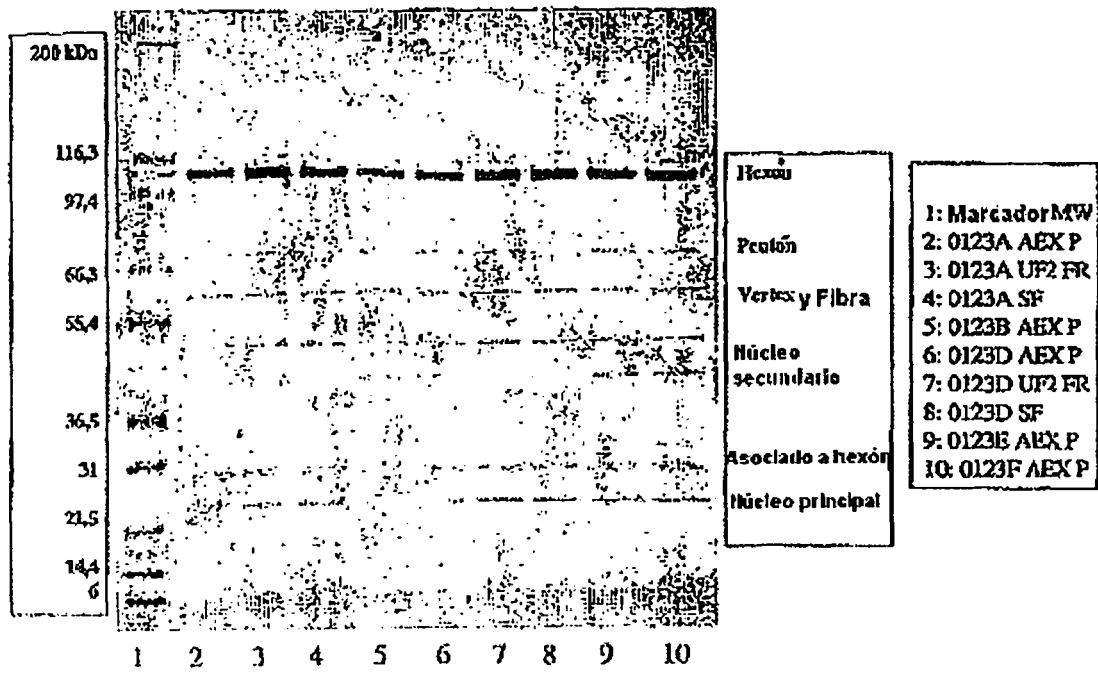


FIGURA 7

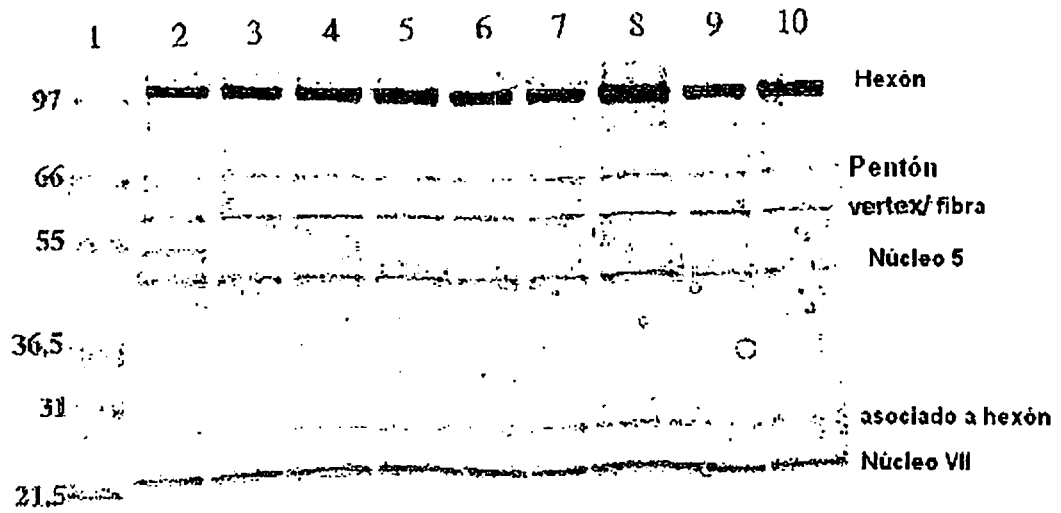


FIGURA 8

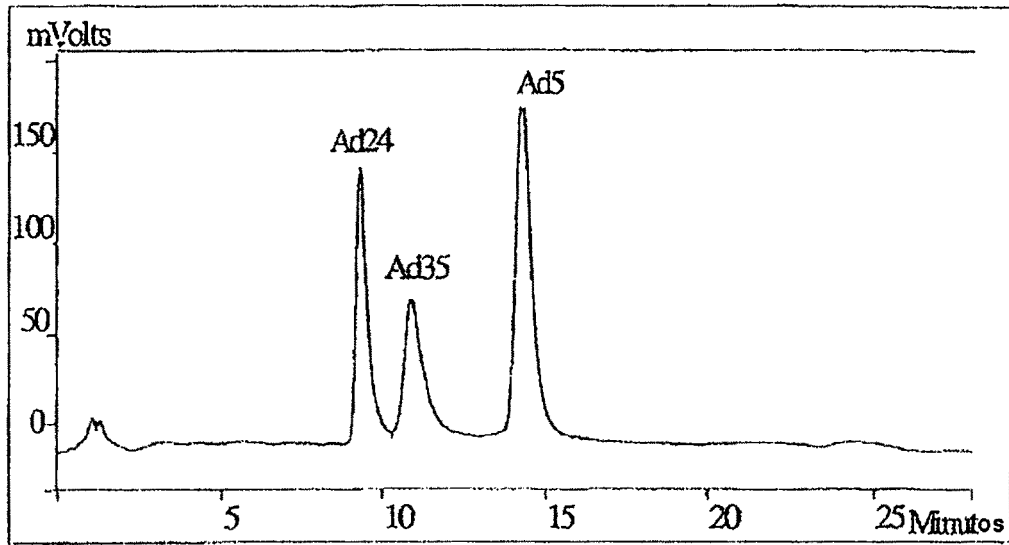


FIGURA 9

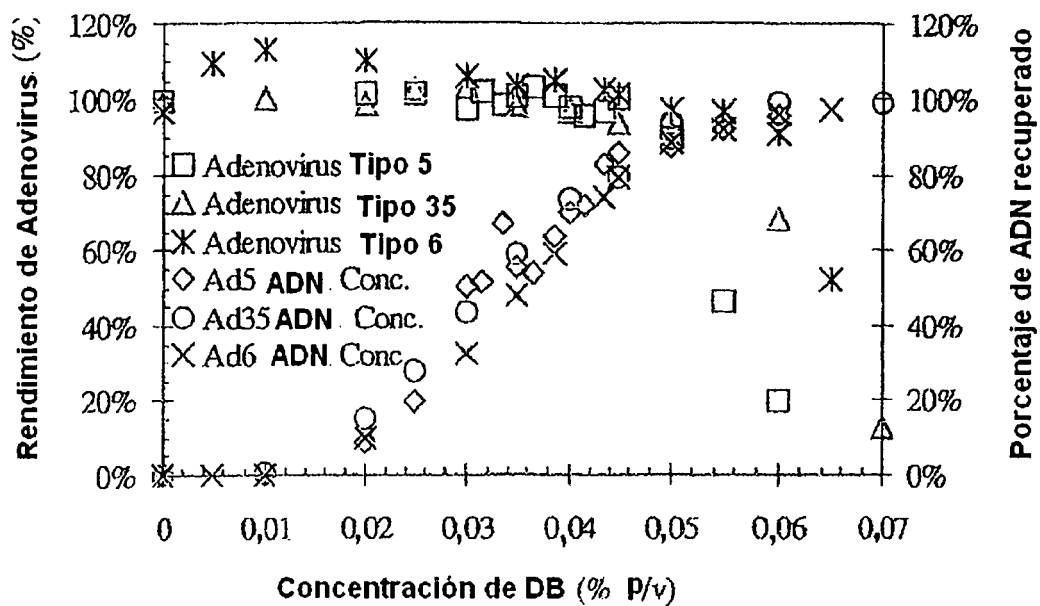


FIGURA 10