

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 148**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016** **PCT/US2016/036888**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016** **WO16201224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016** **E 16732426 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.08.2021** **EP 3307878**

54 Título: **Procesos para la producción y purificación de composiciones que contienen ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

10.06.2015 US 201562173777 P

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

17.02.2022

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES (100.0%)
National Institutes of Health Office of Technology
Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325
MSC 7660
Bethesda, MD 20852-7660, US**

72 Inventor/es:

**BROADT, TREVOR, LANE;
SHABAN, SAMIR, HUSSEIN;
XIE, YUEQING;
ZHU, JIANWEI, SEAN y
MITRA, GEORGE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 895 148 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

Procesos para la producción y purificación de composiciones que contienen ácidos nucleicos

5 REFERENCIA CRUZADA A APLICACIÓN RELACIONADA

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional EE. UU. Nº 62/173.777, presentada el 10 de junio de 2015.

10 CAMPO

[0002] La solicitud se refiere a un proceso de purificación para la obtención de una composición que comprende un virus vivo, a saber, PVS-RIPO, y a un método para generar un plásmido estable que comprende una molécula de ácido nucleico de plantilla viral que codifica PVS-RIPO.

15 ANTECEDENTES

[0003] Biofarmacéuticos basados en ácidos nucleicos son útiles para la protección de, o tratamiento de una variedad de enfermedades y condiciones. Por ejemplo, se pueden emplear vacunas basadas en ADN como vacunas protectoras o terapéuticas utilizadas en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas, se pueden utilizar vectores retrovirales recombinantes para terapia genética y se pueden producir virus oncolíticos que destruyen selectivamente las células tumorales. Se han identificado varios tipos de virus como agentes oncolíticos potenciales, por ejemplo, adenovirus, virus vaccinia y virus del herpes simple.

[0004] Poliovirus, que causa la poliomielitis en los seres humanos, es un pequeño virus de ARN de la familia *Picornaviridae*. Las formas atenuadas modificadas de poliovirus son potencialmente útiles como vehículos para el suministro de secuencias de ácidos nucleicos al cerebro humano, porque los poliovirus infectan el sistema nervioso central, posiblemente al cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a los receptores CD155, como se describe en Gromeier et al. (*Virology* 2000 273 (2): 248-57). Una aplicación potencial de las formas atenuadas modificadas de poliovirus es la producción de composiciones oncolíticas terapéuticas para tratar neoplasias cerebrales, tales como gliomas y meduloblastomas.

[0005] En el área de productos biofarmacéuticos basados en ácidos nucleicos, grandes cantidades de material de ácido nucleico altamente purificado son necesarias para aplicaciones clínicas y la fabricación de productos clínicos, tales como virus oncolíticos. Por consiguiente, existe la necesidad de procesos eficientes de producción y purificación de complejidad reducida y costes reducidos que generen cantidades suficientes de material de ácido nucleico de alta pureza.

40 RESUMEN

[0006] La invención proporciona un método de generación de un plásmido estable que comprende una molécula de ácido nucleico de plantilla viral, que comprende:

la introducción de ADN plásmido que comprende la molécula de ácido nucleico de plantilla viral en una o más células huésped, con lo que la generación de las una o más células huésped transformadas con el ADN plasmídico;
hacer crecer un cultivo en fase sólida de una o más células transformadas, generando así una o más colonias;
detectar la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico de plantilla viral en al menos una de las una o más colonias;
propagar un cultivo de células de al menos una colonia en donde se detectó la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico de plantilla viral; y
extraer el ADN plasmídico que comprende la molécula de ácido nucleico de plantilla viral de las células propagadas, en donde las células transformadas no se congelan entre las etapas de propagación y extracción; en donde la célula huésped es la cepa *E. coli* K12; y
en donde la molécula de ácido nucleico de plantilla viral codifica PVS-RIPO.

[0007] El proceso mejorado para generar plásmido de plantilla viral (tal como uno que incluye una plantilla de ADN para un virus de ARN) aborda el problema de la inestabilidad genética de los plásmidos que contienen el genoma viral (p. ej., de un recombinante de virus de la polio) en anfitrión (p. ej., células bacterianas), en las que típicamente se propagan los plásmidos. Por ejemplo, este proceso se puede aplicar a la producción de plantillas de ADN viral en células bacterianas cuando existe el problema de la inestabilidad genética de tales plantillas. El proceso de purificación viral mejorado, que se muestra en este documento para aumentar el rendimiento y/o la pureza del producto resultante y reduce el tiempo de purificación, es generalmente aplicable a la purificación de cualquier composición que contenga moléculas de ácido nucleico, como una composición basada en virus, y puede utilizarse para la purificación de virus vivos nativos o recombinantes, como los necesarios para aplicaciones clínicas.

[0008] En un ejemplo, el proceso mejorado para la producción de plásmido de plantilla viral es un método de generación de plásmido de ADN (p. ej., plásmido bacteriano) que contiene una secuencia plantilla viral (p. ej., una secuencia de ADN correspondiente para una ARN virus, tal como un poliovirus recombinante), que puede denominarse "plantilla de plásmido viral" o más específicamente "plantilla de ADN de plásmido de poliovirus recombinante". El proceso mejorado incluye transformar células huésped (p. ej., células huésped bacterianas) con el plásmido de plantilla viral (p. ej., ADN plasmídico de poliovirus recombinante atenuado), hacer crecer las células transformadas en medios sólidos y seleccionar colonias que contienen las secuencias de plásmido correctas (p. ej., secuencias de ADN plasmídico de poliovirus recombinante). Las células huésped que contienen secuencias de plásmido correctas (p. ej., el plásmido no está vacío, no se produjo recombinación) se propagan en cultivo líquido y el plásmido de plantilla viral (p. ej., ADN plasmídico de poliovirus recombinante) se extrae de las células huésped propagadas. Los pasos de propagación y extracción de células se realizan sin congelar el material producido en el paso de propagación, lo que reduce el riesgo de inestabilidad genética del plásmido y los errores resultantes en la secuencia de la plantilla viral. En algunos ejemplos, el plásmido de plantilla viral extraído se linealiza y se transcribe *in vitro* para generar ARN de virus desnudo infeccioso, que posteriormente se usa para infectar células de mamífero. Las células de mamífero infectadas pueden amplificarse en cultivo en un proceso de múltiples etapas que puede denominarse "expansión" y cultivarse para producir virus vivo, que posteriormente se purifica (p. ej., utilizando los métodos mejorados descritos).

[0009] En algunos ejemplos, el ADN plásmido introducido en la célula huésped es de una población (p. ej., a partir de un banco de células). En otros ejemplos, el ADN plasmídico introducido en la célula huésped se purifica o aísla.

[0010] La invención también proporciona un proceso de purificación para la obtención de una composición que comprende un virus vivo, que comprende:

la separación de un fluido acuoso que comprende el virus vivo en una columna de cromatografía de separación por tamaño, detección por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de una o más secuencias de ácido nucleico encontradas en el virus vivo en al menos una fracción del eluato de dicha columna de separación por tamaños;
recoger al menos una fracción positiva del eluato de dicha columna de separación por tamaños que contiene una o más secuencias de ácido nucleico encontradas en el virus vivo;
agrupar la al menos una fracción positiva;
separar la al menos una fracción positiva combinada en una columna de cromatografía de intercambio aniónico que no se une significativamente al virus, y
recolectar en al menos una fracción positiva del eluido de flujo continuo de dicha columna de cromatografía de intercambio aniónico que contiene el virus vivo
en donde el virus es PVS-RIPO, y
en donde el proceso de purificación no incluye un paso que utilice como resina CDM de unión a virus.

[0011] La detección rápida de la secuencia específica del ácido nucleico diana en fracciones de cromatografía mejora la consistencia de purificación general y robustez y reduce el número de etapas de cromatografía empleadas, reduciendo así su complejidad y los costes. La detección rápida también reduce el tiempo total de purificación y mejora los rendimientos y/o la pureza del ácido nucleico diana (p. ej., poliovirus recombinante vivo). Por tanto, el proceso de purificación ejemplar es rápido, eficaz y conduce a rendimientos y/o pureza inesperadamente mejorados de la molécula de ácido nucleico diana (p. ej., poliovirus recombinante vivo).

[0012] El método puede incluir además concentrar el eluato de flujo positivo.

[0013] En algunos ejemplos, este procedimiento de purificación no contiene ningún otro paso de separación de cromatografía después de la etapa de separación de cromatografía de intercambio aniónico. Por tanto, en algunos ejemplos, el método solo tiene dos pasos de separación cromatográfica. El proceso de purificación puede incluir además concentrar por diafiltración el poliovirus vivo de origen no natural eluido en el eluato de flujo continuo. En algunos ejemplos, el proceso de purificación se puede realizar en menos de 8 horas, como 4-8 horas. En algunas realizaciones, el rendimiento del proceso de purificación es $\geq 50\%$, como al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos 83%, como 50-60%, 50-80%, 60-80%, 70-85% o 50-85%. El rendimiento del poliovirus vivo no natural de la al menos una fracción positiva del eluato de la columna de cromatografía de intercambio aniónico puede ser $\geq 50\%$.

[0014] El fluido acuoso que contiene el virus vivo puede ser un medio de cultivo celular líquido obtenido mediante un procedimiento que incluye cultivar, en una o más rondas de cultivo celular, las células huésped infectadas por virus con el virus. El medio de cultivo celular líquido puede obtenerse, después de cultivar, separando el medio de cultivo celular líquido de las células huésped del virus, los restos de las células huésped del virus o ambos. El medio de cultivo celular puede obtenerse incubando el medio de cultivo celular líquido con una enzima nucleasa capaz de digerir ácidos nucleicos libres en solución pero no ácidos nucleicos virales encapsulados. Las células huésped del virus infectadas con el virus se pueden obtener mediante un proceso que comprende: proporcionar ADN plasmídico aislado de reserva de un plásmido bacteriano que comprende una secuencia de plantilla del virus; introducir el ADN plasmídico aislado

de la reserva en una o más células bacterianas, generando así una o más células bacterianas transformadas con el ADN plasmídico aislado de la reserva; hacer crecer un cultivo en fase sólida de una o más células bacterianas transformadas, generando así una o más colonias bacterianas; detectar la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico de la secuencia de plantilla del virus en al menos una de las una o más colonias bacterianas; propagar un cultivo de células bacterianas de la al menos una colonia bacteriana en donde se detectó la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico; extraer el ADN plasmídico que comprende la secuencia de plantilla del virus de las células bacterianas propagadas, en donde las células bacterianas no se congelan entre las etapas de propagación y extracción; generar ARN desnudo del virus (p. ej., del poliovirus de origen no natural) mediante traducción *in vitro* de la secuencia de plantilla; e introducir el ARN desnudo del virus en las células huésped virus, generando de ese modo células huésped de virus infectadas con el virus. El plásmido bacteriano puede ser un plásmido que tiene un origen de replicación de *E. coli* y en donde una o más células bacterianas son células de *E. coli*. Las células huésped del virus pueden ser células huésped de mamífero, como las células Vero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0015]

FIG. 1A muestra una imagen digital de la separación electroforética (gel de agarosa manchado con bromuro de etidio) resulta de constructos de vector de plásmido de *E. coli* basados en pUC19 aislado a partir de un cultivo líquido de *E. coli* cultivado de stock *E. coli* congelado transformado con ADN plásmido de plantilla para el PVS-RIPO de poliovirus oncolítico recombinante. El dibujo esquemático ilustra las secuencias de vector correctas e incorrectas aisladas del cultivo (1 - vector con inserción de transposón en la secuencia PVS-RIPO; 2 - secuencia de vector correcta ("PVS-RIPO_kan"); 3 - dímero pUC19 sin secuencia de plantilla viral; 4 - vector pUC19 "vacío" sin una secuencia de plantilla viral).

FIG. 1B es una imagen digital que muestra una versión expandida del gel de la Figura 1A y es un análisis en gel de agarosa del Lote de producción de plásmido PVS-RIPO L0311005 (carriles de la derecha 6-8) que contiene el Transposón IS10R integrado en comparación con la secuencia de vector correcta en el Lote de control del banco de accesiones PVS-RIPO L0305006 (carriles del lado izquierdo 2-4). Observe el cambio en el tamaño de la banda central debido a la integración del transposón en el carril 7 (prueba) al carril 3 (control), observe también el aumento en el peso molecular del plásmido linealizado en el carril 8 en comparación con el carril 4. Los carriles 1, 5 y 9 son 1 Kb más el marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen Inc.) donde la banda del marcador superior es aproximadamente 12 Kbp de tamaño. Carriles 2 y 6 son formas PVS-RIPO superenrolladas sin cortar y de círculo abierto, los carriles 3 y 7 son plásmido cortado con Mun I, y los carriles 4 y 8 son plásmido linealizado cortado con Sal I.

FIG. 2 muestra una comparación esquemática entre el proceso mejorado descrito para producir plásmido de plantilla viral (p. ej., para PVS-RIPO) (izquierda) y un procedimiento usado previamente (derecha).

FIG. 3 muestra una ilustración esquemática del proceso mejorado para producir ADN de plásmido de plantilla para PVS-RIPO.

FIG. 4 es una imagen digital que muestra la separación electroforética en agar de dos lotes (Lote 1 y Lote 2) de ADN plasmídico de plantilla para PVS-RIPO producido por el proceso mejorado descrito. La referencia es ADN plasmídico del Lote L0305006 de ACB. Las dos muestras de prueba son dos matraces separados del Lote de desarrollo PVS-RIPO L0401014, que no mostró inestabilidad del plásmido.

FIG. 5 es una ilustración esquemática del proceso de purificación mejorado de virus (p. ej., PVS-RIPO) del medio de cultivo de la célula huésped que contiene el virus.

FIG. 6 muestra la cromatografía de separación por tamaños empleada en el proceso de purificación mejorado del virus PVS-RIPO a partir del medio de cultivo de células Vero. El gráfico ilustra la comparación de la detección óptica continua de ácido nucleico en fracciones de cromatografía en Sepharose 6FF midiendo la absorbancia a 254 nm (línea superior) y la detección de la secuencia PVS-RIPO por RT-qPCR (línea inferior). La tabla muestra las cantidades de PVS-RIPO detectadas en las fracciones de cromatografía.

FIG. 7 es un diagrama de flujo que proporciona una descripción general de la producción del Lote de producto L0904010 con viales finales PVS-RIPO.

FIG. 8 es un mapa de ADN plasmídico PVS-RIPO (PVS-RIPO-kan/pUC 19).

FIG. 9 es un diagrama de flujo del proceso que muestra la producción del Lote de ADN plasmídico PVS-RIPO L0401014.

FIG. 10 es el Certificado de Análisis para Banco de células maestro DH5α *E. coli* Lote L0301014.

FIG. 11 es el Certificado de Análisis para Banco de células de trabajo DH5α *E. coli* Lote L0303011.

FIG. 12 es el Certificado de Análisis para el Lote de ADN plasmídico PVS-RIPO L0401014.

FIG. 13 es un diagrama de flujo que muestra el resumen de fabricación del Lote inicial de semillas de virus PVS-RIPO L0402026 (P0).

FIG. 14 es el Certificado de Análisis para Vero MCB Lote 2003-0049.

FIG. 15 es el Certificado de Análisis para Banco de Células de Trabajo Vero, Lote 217002-2.

FIG. 16 es un diagrama de flujo del proceso de fabricación de virus para semilla de virus maestra PVSRIPO Lote L0403006 (P1).

FIG. 17 es el Certificado de Análisis para semilla de virus maestra PVSRIPO Lote L0403006.

FIGS. 18A-18B es un diagrama de flujo de proceso para el Lote de expansión celular L0903010, el Lote de lisado de células infectadas L0904008 y la purificación de la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote

L0904009 (P2).

FIG. 19 es un Certificado de Análisis para agrupación de recolección PVS-RIPO Lote L0904008.

FIG. 20 es un Certificado de Análisis para masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L0904009.

FIG. 21 es un Certificado de Análisis para Producto en viales PVS-RIPO final Lote L0904010.

FIG. 22 es un Certificado de Análisis para Toxicología PVS-RIPO Lote L0603006.

FIG. 23 es una gran historia de fabricación de PVS-RIPO.

FIG. 24 es un diagrama de flujo que muestra el resumen del proceso de producción para el Lote de producto final en vial L1402001.

FIGS. 25A-25B es un diagrama de flujo del proceso que muestra el Lote de expansión celular L1310003, el Lote de lisado de células infectadas L1311003 y la purificación de la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L1405001.

FIG. 26 es un Certificado de Análisis para agrupación de recolección PVS-RIPO Lote L1311003.

FIG. 27 es un Certificado de Análisis para masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L1405001.

FIG. 28 es un Certificado de Análisis para producto en viales PVS-RIPO final Lote L1402001.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0016] Las secuencias nucleicas y de aminoácidos se muestran utilizando abreviaturas de una letra estándar para bases de nucleótidos, y el código de tres letras para los aminoácidos, como se define en 37 CFR 1.822. Sólo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida por cualquier referencia a la hebra mostrada. La lista de secuencias generada el 10 de junio de 2016 (3,08 kb) y presentada aquí se incorpora aquí como referencia.

[0017] SEQ ID NOS: 1-13 son secuencias de cebador y sonda de ácido nucleico usadas en ensayos de RT-PCR en tiempo real.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0018] A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, Genes VII, publicado por Oxford University Press, 1999; Kendrew y col. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994; y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995; y otras referencias similares.

[0019] Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella", se refieren tanto al singular como al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Como se usa en este documento, el término "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende una molécula de ácido nucleico" significa "que incluye una molécula de ácido nucleico" sin excluir otros elementos. Debe entenderse además que todos y cada uno de los tamaños de base dados para los ácidos nucleicos son aproximados y se proporcionan con fines descriptivos, a menos que se indique lo contrario. Aunque se pueden usar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados particulares. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Todas las referencias, incluidas las solicitudes de patente y las patentes, y las secuencias asociadas con los números de acceso de GenBank® enumerados (al 10 de junio de 2016) se incorporan aquí como referencia.

[0020] Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Adyuvante: Un compuesto, composición o sustancia que cuando se utilizan en combinación con un agente inmunogénico (tal como un virus purificado usando los métodos descritos) aumenta o altera o modifica de otro modo una respuesta inmune resultante. En algunos ejemplos, un adyuvante aumenta el título de anticuerpos inducidos en un sujeto por el agente inmunogénico. En otro ejemplo, si el agente antigénico es un agente antigénico multivalente, un adyuvante altera las secuencias epitópicas particulares que están unidas específicamente por anticuerpos inducidos en un sujeto.

[0021] Los ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund, B30-MDP, LA-15-PH, montanide, saponina, sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio (Amphogel, Wyeth Laboratories, Madison, NJ), alumbre, lípidos, proteína de lapa keyhole, hemocianina, la microemulsión MF59, un antígeno micobacteriano, vitamina E, polímeros de bloques no iónicos, dipéptidos de muramil, polianiones, sustancias anfipáticas, ISCOM (complejos inmunoestimulantes, como los descritos en la patente europea EP 109942), aceite vegetal, Carbopol, óxido de aluminio, emulsiones oleosas (tales como Bayol F o Marcol 52), toxina termolábil (LT) de *E. coli*, toxina del cólera (TC) y combinaciones de los mismos.

[0022] En un ejemplo, un adyuvante incluye un motivo de ADN que estimula la activación inmune, por ejemplo la respuesta inmune innata o la respuesta inmune adaptativa por células T, células B, monocitos, células dendríticas, y células asesinas naturales. Los ejemplos específicos no limitantes de un motivo de ADN que estimula la activación

inmune incluyen oligodesoxinucleótidos CG, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; 6,339,068; 6,406,705; y 6,429,199 e IL-2 u otros inmunomoduladores.

5 **[0023] Administración:** Para proporcionar o darle a un sujeto un agente, tal como un virus purificado usando los métodos descritos, por cualquier vía eficaz. Rutas ejemplares de administración incluyen, pero no se limitan a inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratumoral, e intravenosa), oral, transdérmica, intranasal, por inhalación y rutas.

10 **[0024] Patógeno atenuado:** Un patógeno con una capacidad disminuida o debilitada para producir enfermedad mientras que uno tiene la capacidad de estimular una respuesta inmune como la del patógeno natural. En otro ejemplo, un patógeno se atenúa seleccionando variantes avirulentas en determinadas condiciones de crecimiento (p. ej., véase Sabin y Boulger. J. Biol. Stand. 1:115-8; 1973; Sutter et al., 2003. Vacuna de poliovirus - vivo, págs. 651 - 705. En S. A. Plotkin y W. A. Orenstein (ed.), Vaccines, Cuarta ed. W.B. Saunders Company, Filadelfia). Un patógeno atenuado
15 ejemplar es el virus de la polio Sabin.

[0025] Contacto: La colocación en asociación física directa, incluyendo un sólido o un líquido. El contacto puede ocurrir *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, agregando un reactivo a una muestra (como uno que contiene células bacterianas que expresan un plásmido de plantilla viral), o *in vivo* administrándolo a un sujeto (como la administración
20 de un virus purificado usando los métodos divulgados).

[0026] Cantidad eficaz: La cantidad de un agente (tal como un virus purificado utilizando los métodos descritos) que es suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, tales como una respuesta inmune protectora, como una respuesta anti-cáncer.

25 **[0027]** Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de uno o más de: la condición del sujeto y la enfermedad que se está tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición de la enfermedad, la forma de administración y similares, que fácilmente puede ser determinada por un experto en la materia. El efecto terapéutico beneficioso puede incluir la habilitación de determinaciones de diagnóstico; mejora de una enfermedad, síntoma, trastorno o condición patológica; reducir o prevenir la aparición de una enfermedad, síntoma, trastorno o afección; y generalmente contrarrestar una enfermedad, síntoma, trastorno o condición patológica. En una realización, una "cantidad eficaz" (p. ej., de virus purificado usando los métodos descritos) es una cantidad suficiente para reducir el volumen/tamaño de un tumor (como un glioblastoma), el peso de un tumor, el número de metástasis, reducir el volumen/tamaño de una metástasis, el peso de una metástasis o combinaciones de los mismos, por ejemplo en al
30 menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 50%, al menos un 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% (en comparación con ninguna administración del agente terapéutico). En una realización, una "cantidad eficaz" (p. ej., de un virus purificado usando los métodos descritos) es una cantidad suficiente para aumentar la respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo, aumentar la producción de anticuerpos específicos para el inmunógeno en al menos un 10%, en al menos 20%, al menos 25%, al menos 50%,
35 al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 100%, al menos el 200%, al menos el 300%, al menos el 400%, al menos el 500% o al menos el 600% (en comparación con la no administración del agente terapéutico).

40 **[0028] Células huésped:** Células en las que un vector puede ser propagado y sus ácidos nucleicos expresados. La célula puede ser procariota o eucariota. El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped objeto. Por tanto, las células huésped pueden ser transgénicas, ya que incluyen moléculas de ácido nucleico que se han introducido en la célula, como una molécula de ácido nucleico de plásmido de plantilla viral. En un ejemplo, la célula huésped es una célula (como una célula de mamífero) en donde prolifera un virus (como PVS-RIPO). La proliferación del virus en las células huésped puede usarse para la producción del material viral (p. ej., células Vero usadas para la producción de PVS-RIPO) o, en algunos casos, para la expresión de proteínas. Por ejemplo, pueden usarse
45 baculovirus recombinantes para la expresión de proteínas recombinantes en células de insectos ("sistema de expresión de baculovirus"). La proliferación viral puede ocurrir *in vitro*, por ejemplo, en cultivo celular, o *in vivo*, cuando las células huésped virales son parte de un organismo.

50 **[0029] Respuesta inmunitaria:** Una respuesta de una célula del sistema inmune, como una célula B, células T, macrófagos, monocitos, o polimorfonucleocito, a un agente inmunogénico (tal como un virus purificado usando los métodos descritos) en un sujeto. Una respuesta inmune puede incluir cualquier célula del cuerpo involucrada en una respuesta de defensa del huésped, como una célula epitelial que secreta interferón o una citocina. Una respuesta inmune incluye, pero no se limita a una respuesta inmune innata o inflamación.

60 **[0030]** La respuesta puede ser específica para un antígeno particular (una "respuesta específica a antígeno"). En un ejemplo particular, una respuesta inmune es una respuesta de células T, como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+. En otro ejemplo, la respuesta es una respuesta de células B y da como resultado la producción de anticuerpos específicos contra el agente inmunogénico.

65 **[0031]** En algunos ejemplos, tal respuesta inmune proporciona protección para el tema desde el agente

inmunogénico o la fuente del agente inmunogénico. Por ejemplo, la respuesta puede proteger a un sujeto, como un ser humano o un sujeto veterinario, de la infección por un patógeno o interferir con la progresión de una infección por un patógeno. Una respuesta inmune puede ser activa e implicar la estimulación del sistema inmune del sujeto, o ser una respuesta que resulte de una inmunidad adquirida pasivamente.

[0032] Aumentar o disminuir: Un cambio estadísticamente significativo positivo o negativo, respectivamente, en cantidad de un valor de control (tales como un valor que representa ningún agente terapéutico). Un aumento es un cambio positivo, como un aumento de al menos 50%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en comparación con el valor de control. Una disminución es un cambio negativo, como una disminución de al menos 20%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o al menos 100% de disminución en comparación con un valor de control. En algunos ejemplos, la disminución es inferior al 100%, como una disminución de no más del 90%, no más del 95% o no más del 99%.

[0033] Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un virus purificado utilizando los métodos descritos) AH sido sustancialmente separado, producido aparte de, o purificado de otros componentes biológicos en la célula o medios en los que se produce el componente, tal como otras moléculas de ácido nucleico y proteínas (p. ej., ADN y ARN cromosómico y extracromosómico de la célula huésped y proteínas). Los virus aislados purificados usando los métodos descritos, o los plásmidos plantilla virales expandidos usando los métodos descritos en algunos ejemplos son al menos 50% puros, como al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99,9999% o al menos 100% puro, por ejemplo, medido por el ADN de la célula huésped residual (CH). En algunos ejemplos, los virus aislados purificados usando los métodos descritos, o los plásmidos plantilla virales expandidos usando los métodos descritos tienen menos pureza cuando se miden por proteína CH residual (PCH), como al menos 3% puro, al menos 4% puro o al menos 5% puro (tal como 3-4% puro), por ejemplo cuando se desea un aumento en el total de UFP. Incluso con una pureza de proteína de -3%, el nivel de PCH está dentro de los límites aceptables para un producto terapéutico. En algunos ejemplos, los virus aislados purificados usando los métodos descritos, o los plásmidos plantilla virales expandidos usando los métodos descritos, cuando se miden por PCH residual, son al menos 50% puros, como al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 99,9999% puro.

[0034] Vehículos farmacéuticamente aceptables: Los portadores farmacéuticamente aceptables útiles en esta invención son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de un virus purificado usando los métodos descritos.

[0035] En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de que se emplea la administración. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden habitualmente fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

[0036] Poliovirus (VP): un enterovirus de la familia *Picornaviridae* que es el agente causante de la poliomieltis (polio). El poliovirus tiene tres serotipos. Se proporcionan ejemplos de secuencias de poliomieltis en Toyoda et al., J. Mol. Biol. 174: 561-85, 1984.

[0037] Las formas no naturales de la virus de la polio incluyen el poliovirus oncolítico recombinante PVS-RIPO y la vacuna oral atenuada contra la polio Sabin (OPV), y se pueden generar usando los métodos descritos. PVS-RIPO es un virus oncolítico recombinante, vivo atenuado, no patógeno que contiene el poliovirus oral Sabin tipo 1 en donde el sitio de entrada ribosomal interno (IRES) se reemplaza con el IRES del rinovirus humano tipo 2 (HRV2), con potencial actividad antineoplásica (ver por ejemplo, Brown et al., Cancer 120: 3277-86, 2014 y Goetz et al., Cytokine Growth Factor Rev. 2010 21 (2-3): 197-20). La OPV incluye 57 sustituciones de nucleótidos que distinguen la cepa Sabin 1 atenuada de su parental virulento (el serotipo Mahoney), dos sustituciones de nucleótidos atenúan la cepa Sabin 2 y 10 sustituciones están involucradas en la atenuación de la cepa Sabin 3.

[0038] El factor atenuante primario común a las tres vacunas Sabin es una mutación situada en el sitio de entrada al ribosoma interno del virus (IRES) que altera las estructuras de bucle tallo, y reduce la capacidad de poliovirus de traducir su ARN plantilla dentro de la célula huésped. Se proporcionan ejemplos de secuencias de Sabin en los números de acceso de GenBank® E01572.1, E01571.1 y E01570.1, así como en Nomoto y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 79 (19): 5793-5797, 1982.

[0039] Otra forma de VP es la vacuna de la polio inactivada químicamente (VPI) desarrollada por el Dr. Jonas Salk. Esto se basa en tres cepas virulentas Mahoney (poliovirus tipo 1), MEF-1 (poliovirus tipo 2) y Saukett (poliovirus tipo 3). Estas cepas de VP se pueden generar usando los métodos descritos.

[0040] Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende que sea un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de virus purificada generada usando los métodos descritos es una en donde el virus está más enriquecido que el virus en una célula huésped o un extracto de célula huésped. En un ejemplo, una preparación se purifica de manera que el virus purificado represente al menos el 50% del contenido total de ácido nucleico de la preparación. En otros ejemplos, un virus se purifica para representar al menos el 60%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o incluso al menos el 99%, de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación purificada antes de la mezcla con otros ingredientes de la formulación, tales como un vehículo farmacéutico, excipiente, tampón, agente mejorador de la absorción, estabilizador, conservante, adyuvante u otro co-ingrediente. En algunos ejemplos, la preparación purificada es esencialmente homogénea, en donde otras especies macromoleculares no son detectables mediante técnicas convencionales. Tales preparaciones purificadas pueden incluir materiales en asociación covalente con el agente activo, tales como materiales mezclados o conjugados con el agente activo, que pueden desearse para producir un derivado o análogo modificado del agente activo o producir una formulación terapéutica combinatoria o conjugada.

[0041] Recombinante: Una molécula de ácido nucleico recombinante es una que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que se hace por una combinación artificial de dos segmentos separados de otro modo de secuencia. Esta combinación artificial se puede lograr usando métodos rutinarios, como por síntesis química o por manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética como las descritas en Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. El término recombinante incluye moléculas de ácido nucleico que se han alterado únicamente mediante la adición, sustitución o delección de una parte de la molécula de ácido nucleico. De manera similar, una proteína recombinante es una codificada por una molécula de ácido nucleico recombinante. Un virus recombinante incluye uno cuyos genes se han construido y/o colocado en un entorno no natural, por ejemplo, para expresión, por ejemplo usando técnicas de ingeniería recombinante.

[0042] Asunto: Un vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a murinos, simios, humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas. En una realización, el sujeto es un sujeto mamífero no humano, tal como un mono u otro primate no humano, ratón, rata, conejo, cerdo, cabra, oveja, perro, gato, caballo o vaca. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un tumor, como un glioblastoma, que puede tratarse usando el virus de la polio generado usando los métodos descritos. En algunos ejemplos, el sujeto es un animal/organismo de laboratorio, como un ratón, un conejo o una rata.

[0043] Transformar o transfectar: Un virus o vector "transforma" o "transduce" una célula huésped cuando transfiere ácido nucleico en la célula huésped. Una célula es "transformada" o "transfectada" por un ácido nucleico transducido en la célula cuando el ADN se replica de manera estable por la célula, ya sea por incorporación del ácido nucleico en el genoma celular o por replicación episomal.

[0044] Numerosos procedimientos de transfección son conocidos por los expertos en la técnica, tales como: métodos químicos (p. ej., transfección con fosfato de calcio), métodos físicos (p. ej., electroporación, microinyección, bombardeo de partículas), la fusión (p. ej., liposomas), endocitosis mediada por receptor (p. ej., complejos de ADN-proteína, complejos de envoltura viral/cápside-ADN) y por infección biológica por virus tales como virus recombinantes (Wolff, JA, ed, *Gene Therapeutics*, Birkhauser, Boston, EE. UU. 1994). En el caso de la infección por retrovirus, las partículas de retrovirus infectantes son absorbidas por las células diana, lo que da como resultado la transcripción inversa del genoma del ARN retroviral y la integración del provirus resultante en el ADN celular.

[0045] Transgen: Un gen exógeno suministrado por un vector. En un ejemplo, un transgén incluye una secuencia de plantilla viral, como la secuencia de plantilla de ADN viral para un virus de ARN, como la poliomielitis (un virus de la poliomielitis natural o un virus de la poliomielitis de origen no natural).

[0046] Tratado, tratamiento, y terapia: Cualquier éxito o indicio de éxito en la atenuación o mejora de una lesión, patología o condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión, disminución de síntomas o hacer la condición más tolerable para el paciente, ralentizando la tasa de degeneración o declive, haciendo que el punto final de la degeneración sea menos debilitante, mejorando el bienestar físico o mental del sujeto o prolongando la duración de la supervivencia. El tratamiento puede evaluarse mediante parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico, sangre y otras pruebas clínicas, y similares. En algunos ejemplos, el tratamiento con los métodos descritos da como resultado una disminución en el número, volumen y/o peso de un tumor (p. ej., un tumor cerebral) y/o metástasis.

[0047] En condiciones suficientes para: Una frase que se utiliza para describir cualquier entorno que permite una actividad deseada. En un ejemplo, la actividad deseada es la transformación de una célula huésped mediante un plásmido de plantilla viral, o el crecimiento de dicha célula huésped transformada. En un ejemplo, la actividad deseada es la detección de moléculas de ácido nucleico vírico diana, por ejemplo usando qPCR. En un ejemplo, la actividad deseada es el tratamiento de un tumor y/o la estimulación de una respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo usando virus purificados usando los métodos descritos.

[0048] Vacuna: Una composición inmunogénica que puede ser administrada a un animal o un ser humano para conferirle inmunidad, tal como inmunidad activa, a una enfermedad u otra condición patológica. Las vacunas se pueden utilizar de forma profiláctica o terapéutica. Por tanto, las vacunas pueden usarse para reducir la probabilidad de infección o para reducir la gravedad de los síntomas de una enfermedad o afección o limitar la progresión de la enfermedad o afección. En un ejemplo, una vacuna incluye uno o más virus purificados usando los métodos descritos (p. ej., un poliovirus natural o un poliovirus no natural).

[0049] Vector: Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula huésped, produciendo así una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en la célula huésped, como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes terapéuticos o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, haciendo que la célula exprese moléculas de ácido nucleico o proteínas distintas de las nativas de la célula. Un vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a conseguir la entrada del ácido nucleico en la célula, como una partícula viral, un liposoma, un recubrimiento proteico o similares. En un ejemplo, un vector es un plásmido, como un plásmido bacteriano.

Composiciones que contienen molécula de ácido nucleico

[0050] El término "composiciones que contienen molécula de ácido nucleico" y términos relacionados abarcan una variedad de composiciones y moléculas que contienen nucleótidos poliméricos. Ejemplos de composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico son composiciones que contienen ADN, ARN, dúplex de ADN/ARN, virus, plásmidos, vectores y nucleoproteínas. Las composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico pueden contener ácidos nucleicos naturales o ácidos nucleicos no naturales, que también se denominan modificados (por modificación genética u otros procesos, como selección o modificación química), artificiales, creados artificialmente, sintéticos, modificados genéticamente, manipulados genéticamente, manipulados, recombinantes, producidos de forma recombinante o por otros términos relacionados. Las composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a composiciones de ácido nucleico basadas en virus, virus recombinantes, virus basados en ARN recombinante (p. ej., poliovirus recombinantes), virus atenuados, plásmidos que contienen secuencias virales y plantillas de ADN viral.

[0051] PVS-RIPO es una forma atenuada del poliovirus Sabin tipo I creado por intercambio del sitio de entrada ribosomal cognado interno (IRES) del virus de la polio con su homólogo de rinovirus humano tipo 2 (HRV 2) para producir una cepa de poliovirus que no lo hace replicarse en células neuronales normales, pero que exhibe actividad oncolítica contra las células tumorales cerebrales. Tras la administración intratumoral de PVS-RIPO de poliovirus oncolítico recombinante, el poliovirus es captado selectivamente y se replica en las células tumorales que expresan CD155 (receptor de poliovirus, PVR o NECL5) provocando finalmente la lisis de las células tumorales. CD155, una molécula de adhesión celular oncofetal y antígeno tumoral, se expresa ectópicamente en ciertos cánceres, como el glioblastoma multiforme (GMB). Debido al IRES HRV2 heterólogo en este virus recombinante, PVS-RIPO solo se propaga en células no neuronales susceptibles (p. ej., GBM). PVS-RIPO y sus propiedades y aplicaciones se describen, por ejemplo, en Goetz et al., Cytokine Growth Factor Rev. 2010 21 (2-3): 197-20, Yang et al., J. Virol. Methods. 2009 155 (1): 44-54, Cello y col., J. Med. Virol. 2008 80 (2): 352-9, y Dobrikova et al., Molecular Therapy 2008 16 (11): 1865-1872.

Comparación de los métodos de purificación virales mejoradas y métodos anteriores

[0052] Los métodos anteriores para la producción y purificación de PVS-RIPO vivos se describe, por ejemplo, en Ouellette et al., BioProcessing J. 2005 4 (2): 31-38 ("Ouelette *et al.*"). El proceso descrito en Ouelette *et al.* implicó la preparación de ADN plasmídico PVS-RIPO a partir de células bacterianas transformadas con stock de plásmido PVS-RIPO, posterior linealización del ADN plasmídico mediante endonucleasa de restricción, síntesis *in vitro* de ARN viral usando ARN polimerasa T7 y electroporación del ARN viral en células Vero para generar el stock de semillas virales, que se utilizó para producir el virus PVS-RIPO en cultivo de células Vero. En el proceso de purificación descrito en Ouellette *et al.*, Se aisló el virus PVS-RIPO del sobrenadante del cultivo de células Vero, que se trató con la enzima Benzonase® y se sometió a una secuencia de cuatro pasos de separación por cromatografía en columna. El primer paso fue la cromatografía de exclusión por tamaño usando Sepharose 4FF, con el eluido de la columna monitoreado en cuanto a absorbancia UV a 280 nm y conductividad. El segundo paso fue la cromatografía en columna de intercambio aniónico utilizando resina Super Q 650M, que no se unía al virus (es decir, el virus se recogió en el flujo continuo). El tercer paso fue la cromatografía en columna de intercambio aniónico utilizando resina CDM de unión a virus. El segundo y el tercer paso se realizaron en conjunto, con las fracciones eluidas de la columna CDM probadas para detectar la presencia de PVS-RIPO por SDS-PAGE, y seleccionadas y agrupadas para el siguiente paso basándose en la presencia detectada de PVS-RIPO. El cuarto paso fue la cromatografía de exclusión por tamaño utilizando resina Sephadex G-25, con las fracciones probadas, seleccionadas y agrupadas como en el paso anterior. El cuarto paso se incluyó para la purificación adicional de PVS-RIPO y para eliminar el tampón con alto contenido de sal, en donde se eluyó PVS-RIPO de la columna CDM, ya que el poliovirus pierde infectividad tras una exposición prolongada a alto contenido de sal.

[0053] Aquí se incluye un procedimiento mejorado para la purificación de un virus. Los virus ejemplares que se pueden

generar y purificar usando estos métodos incluyen, pero no se limitan a virus de ADN (p. ej., un virus de ADN monocatenario, como los de una de las siguientes familias Anelloviridae, Bacillariodnaviridae, Bidnaviridae, Circoviridae, Geminiviridae, Inoviridae, microviridae, nanoviridae, Parvoviridae y Spiraviridae), virus de ARN (por ejemplo un *Picornavirus*, tales como un *Aftovirus* (p. ej., virus de la fiebre aftosa y el virus de la rinitis bovino), *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicpivirus*, *Enterovirus* (p. ej., cualquiera de los enterovirus AJ o rinovirus AC), *Erbovirus*, *Hepatovirus* (p. ej., hepatitis A), *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Parechovirus* (p. ej., parechovirus humano o virus de Ljungan), *Piscevirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* o *Tremovirus*; a *Rabdovirus* (como la rabia); un *Paramixovirus* (como el virus del sarampión, el virus sincitial respiratorio y los virus de la parainfluenza); un *Flavivirus* (p. ej., Virus del dengue, virus del Zika, virus del Nilo occidental, virus es el virus C y el virus de la encefalitis japonesa) y *Filoviridae* (como el Ébola)), o un retrovirus como el VIH o el HTLV. En un ejemplo, el virus generado y purificado usando estos métodos es un virus del Grupo IV o del Grupo VI, como la hepatitis C, la hepatitis E, el rinovirus o el VIH.

[0054] En un ejemplo, el virus generado y se purificó usando estos métodos es un poliovirus de origen natural o un poliovirus de origen no natural (p. ej., un poliovirus oncolítico atenuado recombinante ejemplificado por PVS-RIPO). En un ejemplo, el virus generado y purificado usando estos métodos es un poliovirus o una vacuna, como un poliovirus Sabin o un virus Salk nativo (que puede inactivarse químicamente después de la purificación).

[0055] Los métodos descritos incluyen una primera etapa de separación de cromatografía, que separa un fluido acuoso que contiene el virus (p. ej., virus vivo, tal como un poliovirus de origen no natural en vivo) en una cromatografía de separación por tamaño en columna, la detección de una o más secuencias de ácidos nucleicos encontradas en el virus (p. ej., virus vivo, como un poliovirus vivo no natural) en una o más fracciones eluidas de la columna de cromatografía de separación por tamaños mediante reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR), agrupando esas fracciones de una o más fracciones en las que se detecta una o más secuencias de ácidos nucleicos virales, generando así fracciones agrupadas. La qPCR y otros métodos de detección rápida que se pueden emplear se describen en este documento e incluyen métodos conocidos en la técnica.

[0056] Los métodos descritos incluyen un segundo intercambio aniónico, etapa de separación de cromatografía. El segundo paso de separación por cromatografía purifica adicionalmente las fracciones combinadas positivas del primer paso de cromatografía. Por tanto, las fracciones combinadas obtenidas después de la primera etapa de cromatografía se pueden aplicar a una columna de cromatografía de intercambio aniónico. La resina utilizada en la columna de cromatografía de intercambio aniónico no se une significativamente al virus, lo que significa que el virus (p. ej., un virus vivo, como un poliovirus vivo no natural) se eluye de la columna de cromatografía de intercambio aniónico en un eluato de flujo continuo, mientras que los contaminantes se unen a la resina. El uso de resina que no se une al virus y elución de flujo continuo en este paso, en contraste con una resina que se une al virus, evita la exposición del virus a un tampón de elución con alto contenido de sal que sería necesario para eluir el virus de una resina que se une al virus. La exposición a un tampón con alto contenido de sal puede resultar en la inactivación del virus, mientras que evitar la exposición al tampón con alto contenido de sal mejora el rendimiento del virus vivo. En un ejemplo, el proceso de purificación mejorado descrito no contiene ninguna etapa de separación por cromatografía adicional después de la etapa de separación por cromatografía de intercambio aniónico. Por tanto, en un ejemplo específico, el proceso de purificación mejorado contiene solo (p. ej., consta de) dos etapas de separación cromatográfica (separación por tamaños e intercambio iónico con el virus eluido en el flujo continuo). En algunos ejemplos, el proceso de purificación mejorado no incluye un paso que utilice como resina CDM de unión a virus. Después de la segunda etapa de separación por cromatografía, el proceso de purificación mejorado puede incluir además una etapa de concentración, por ejemplo, mediante diafiltración. Esto resulta en la elución del virus (p. ej., virus vivo, tal como un poliovirus de origen no natural en vivo) en el eluato de flujo a través.

[0057] En el proceso de purificación mejorado descrito en el presente documento, el fluido acuoso que contiene el virus (p. ej., virus vivo, tal como un poliovirus de origen no natural en vivo) que se aplica a la columna de separación por tamaño puede ser un cultivo celular líquido medio obtenido por cultivar, en una o más rondas de cultivo celular, células huésped de virus infectadas con el virus (p. ej., poliovirus de origen no natural). Las células huésped de virus infectadas con el virus que se va a purificar se pueden obtener mediante los procesos descritos en el presente documento. Después de cultivar las células huésped del virus infectadas con el virus y antes de la primera etapa de separación por cromatografía, el medio de cultivo celular que contiene las células huésped del virus infectadas con el virus puede separarse de las células huésped del virus, los restos de las células huésped del virus o ambos, por ejemplo por centrifugación o filtración. El medio de cultivo celular líquido también se puede tratar con una enzima nucleasa capaz de digerir ácidos nucleicos libres en solución pero no ácidos nucleicos virales encapsulados, como la enzima *Benzonase®*. Pueden usarse otras nucleasas, tales como una o más DNasas, una o más RNasas o mezclas de DNasas y RNasas. El tratamiento con nucleasa elimina o reduce sustancialmente los ácidos nucleicos libres para mejorar la seguridad, reducir la viscosidad de la recolección y mejorar la relación señal/ruido de los métodos de detección viral usados en el proceso de purificación, los métodos de detección discutidos en este documento.

[0058] El proceso de purificación mejorado descrito en el presente documento posee numerosas diferencias en los pasos involucrados, y el virus producido, en comparación con los procesos de purificación descritos anteriormente utilizados para la fabricación de virus purificados a gran escala (p. ej., poliovirus no naturales), tales como el proceso descrito en Ouelette *et al.* Por ejemplo, el proceso de purificación mejorado descrito en este documento proporciona

uno o más de rendimiento de virus mejorado, alta reproducibilidad de ejecución a ejecución, tiempo de ejecución reducido (es decir, el proceso mejorado es más rápido que los previamente conocidos) y la capacidad de seleccionar un compromiso deseado entre el rendimiento del producto y la pureza (es decir, mayor flexibilidad del proceso). La reducción del tiempo de ejecución del proceso mejorado se debe al menos en parte al hecho de que el proceso mejorado contiene menos pasos de purificación. La reducción en el número de pasos del proceso también conduce a una reducción en el costo de los materiales y disminuye la posibilidad de degradación viral. Dado que el tamaño de las fracciones de columna recolectadas después del primer paso de cromatografía se puede ajustar con precisión (agrandar o reducir) con pruebas rápidas y específicas de fracciones para detectar la presencia del producto viral (p. ej., mediante qPCR), variando el tamaño de la fracción y al seleccionar qué fracciones se agrupan para la purificación posterior después del primer paso de cromatografía, el proceso mejorado se puede ajustar para generar un producto viral más puro, generar un producto viral menos puro con un rendimiento mejorado o seleccionar fácilmente la combinación deseada de rendimiento y pureza.

[0059] Una diferencia entre el nuevo método y el método antiguo de la producción de virus es el número de pasos, a saber, una reducción en el número de pasos, incluyendo un número reducido de etapas de separación de cromatografía. Solo a modo de ilustración, la Tabla 1 muestra una comparación lado a lado de una realización ejemplar del proceso de purificación mejorado y del proceso descrito en Ouelette *et al.* Los pasos del proceso de los métodos se enumeran en orden de arriba a abajo en la Tabla 1. Ouelette *et al.* contiene cuatro pasos de purificación por cromatografía. En contraste, el proceso de purificación mejorado ilustrado en la Tabla 1 usa solo dos pasos de separación por cromatografía, a saber, el paso de cromatografía de separación de tamaño inicial, seguido de cromatografía de intercambio iónico en una resina que no se une a virus como el paso de cromatografía final. Estos pasos pueden ir seguidos de un paso de concentración. A diferencia de Ouelette *et al.*, el proceso de purificación mejorado no incluye una etapa de cromatografía de resina CDM de intercambio aniónico ("captura CDM") ni una cromatografía de separación por tamaños en resina Sephadex G25. La eliminación de los pasos de captura de CDM da como resultado un rendimiento mejorado de virus vivo en el proceso de purificación mejorado, ya que el virus ya no está en contacto con el tampón con alto contenido de sal utilizado para la elución de la columna de resina de CDM. No usar la columna de resina CDM también permite la eliminación del paso de separación de tamaño final usado en el proceso de Ouelette *et al.*, debido a que este paso final de separación por tamaños era necesario para eliminar el tampón con alto contenido de sal resultante del paso anterior de captura de CDM. A su vez, la omisión de la captura de CDM y la etapa final de cromatografía de separación por tamaños eliminó la necesidad de analizar las fracciones eluidas de estas columnas y seleccionar y agrupar las fracciones en función de la presencia detectada del virus. Por tanto, el proceso de purificación mejorado aquí descrito reduce el número de pasos (p. ej., reducción al doble del número de pasos de separación cromatográfica), lo que conduce a un proceso más simplificado y menos complejo. La reducción del número de pasos también conduce a una reducción del tiempo necesario para realizar el proceso. Por ejemplo, el proceso de purificación mejorado se puede realizar, en algunas realizaciones, en 8 horas o menos, o menos de 8 horas (tal como 4 a 8 horas, 4 a 6 horas, 6 a 8 horas o 7 a 8 horas).

Tabla 1. Comparación del proceso de purificación mejorado y del proceso descrito en Ouelette *et al.*

Proceso mejorado	Proceso de Ouelette y col.
Tratamiento del medio de cultivo celular separado de las células y/o restos celulares mediante una nucleasa capaz de digerir ácidos nucleicos libres en solución pero no ácidos nucleicos virales encapsulados (p. ej., enzima Benzonase®)	Tratamiento del medio de cultivo celular separado de las células y/o restos celulares mediante la enzima Benzonase®
Primera separación por cromatografía: columna de cromatografía de separación por tamaños ("filtración en gel", "exclusión por tamaños") (p. ej., columna Sepharose 6FF)	Primera separación por cromatografía: separación por tamaño en una columna Sephrose 4FF
Detección de secuencias virales específicas en las fracciones eluidas por qPCR	Detección de proteína en las fracciones eluidas controlando la absorbancia a 280 nm
Agrupación de al menos algunas de las fracciones en las que se detectan secuencias virales mediante qPCR	Agrupación de todas o algunas de las fracciones en las que las proteínas y los ácidos nucleicos que no se unen son detectados por absorbancia UV.
Segunda cromatografía: columna de intercambio aniónico (p. ej., Super Q), el virus se eluye en un flujo continuo	Segunda cromatografía: columna de intercambio aniónico (resina Super Q 650M), eluyendo el virus en un
Concentración del flujo recolectado (p. ej., por diafiltración)	Tercera cromatografía (realizada en conjunto con el segundo paso de cromatografía): columna de intercambio aniónico, resinas CDM de unión a virus
	Prueba de las fracciones eluidas de la columna CDM por SDS-PAGE

(Continuación)

Proceso mejorado		Proceso de Ouelette y col.
		Selección y agrupación de las fracciones en función de la presencia detectada del virus.
		Cuarta cromatografía: cromatografía de separación por tamaños, columna Sephadex G-25
		Prueba de las fracciones eluidas de la columna CDM por SDS-PAGE
		Selección y agrupación de las fracciones en función de la presencia detectada del virus.

[0060] Además, el método descrito es diferente del de Thomassen *et al.* (Plos One, 8: 83374, 2013). Por ejemplo, aunque Thomassen *et al.* utilizan dos pasos de cromatografía, no incorporan un paso analítico en tiempo real (PAT) en el proceso para determinar la ubicación exacta del virus durante la cromatografía de exclusión por tamaño (como la RT-PCR en tiempo real). En cambio, asumen que los valores de absorbancia en la columna se deben únicamente a las proteínas de la cápside viral basándose en los resultados de SDS-PAGE post-hoc. Sin embargo, los inventores han descubierto que este no es necesariamente el caso (ver la Figura 6 por ejemplo) e incorporan métodos tales como RT-qPCR en tiempo real para identificar las fracciones que contienen la mayor cantidad de virus antes del agrupamiento. Además, Thomassen *et al.* no comienzan con una plantilla de plásmido viral. En su lugar, comienzan con una reserva de virus. Como resultado de estas diferencias, el virus resultante generado no es tan puro como los obtenidos con los métodos descritos.

[0061] La reducción de la complejidad del proceso de purificación mejorado hace que sea adecuado para la fabricación a gran escala, por ejemplo generación de PVS-RIPO para uso clínico. El término "proceso de fabricación a gran escala" puede referirse a la cantidad total de un producto viral vivo producido por el proceso (salida del proceso). Para los productos virales vivos, como PVS-RIPO, el resultado del proceso se expresa típicamente en unidades formadoras de placa (UFP) o en dosis de infecciones de cultivo de tejidos (TCID₅₀). Por el contrario, la producción de material de virus inactivado puede expresarse en términos de masa y/o número de copias.

[0062] Además, el proceso de purificación mejorado elimina las dos etapas de separación de cromatografía que resultaron en rendimiento variable y pobre de un virus vivo. Es inesperado que al eliminar estas dos etapas de separación por cromatografía, el proceso de purificación mejorado aún lograra la pureza del producto de poliovirus de origen no natural purificado que era comparable a la pureza lograda por el proceso descrito en Ouelette *et al.* Se descubrió que las técnicas tradicionales de monitorización cromatográfica, como la monitorización de la absorbancia UV a 254 o 280 nm (p. ej., para detectar moléculas de ácido nucleico), hacían necesario el uso de pasos de separación cromatográficos adicionales después de la cromatografía de separación por tamaño seguida de elución de flujo del virus de la segunda columna de intercambio aniónico. En los procesos de purificación descritos anteriormente, las fracciones de cromatografía en columna de separación por tamaño con virus positivos seleccionadas mediante el control de la absorbancia UV a 254 o 280 nm dieron como resultado la recolección de las fracciones que contenían altos niveles de ADN contaminante, ARN no viral y proteínas, ya que la contribución del virus deseado para la absorbancia total del eluato fue relativamente pequeña. Por tanto, en el método anterior, una gran cantidad del material recogido no era relevante para las moléculas de ácido nucleico vírico deseadas (p. ej., ARN viral para un virus de la polio). Además, utilizando el método anterior, el rendimiento viral resultante (p. ej., en UFP) recuperado fue muy variable e impredecible (p. ej., podría recuperarse sólo un pequeño%, o hasta aproximadamente un 50% de recuperación). Este problema se resuelve mediante los métodos descritos que detectan ácidos nucleicos virales en las fracciones eluidas en la primera etapa de cromatografía (separación por tamaños) mediante un procedimiento de detección rápido y específico, como qPCR en tiempo real. Antes de esta solución, la presencia del producto viral en las fracciones de la columna de cromatografía no se determinaba específicamente, y la electroforesis, los ensayos de placa viral y otros ensayos específicos debían completarse después de que se agruparon las fracciones para verificar la presencia del virus en un producto obtenido después de una etapa de purificación particular. Por ejemplo, el proceso de Ouelette *et al.* (ilustrado en la Tabla 1) incluyó dos pasos de ensayo SDS-PAGE para detectar el producto viral. Estos ensayos empleados en Ouelette *et al.* aumentaron la duración del proceso y transmisión de información de valor limitado, ya que el tamaño (volumen) de las fracciones probadas era relativamente grande en relación con el tamaño de la columna. Por el contrario, el uso de un método de detección rápido y específico en el proceso descrito en este documento para probar fracciones de cromatografía (como qPCR, por ejemplo, RT-qPCR en tiempo real) permite probar rápidamente fracciones de volumen más pequeñas recolectadas después del primer paso de cromatografía y permite la selección de fracciones que contienen un alto número de copias de virus. El uso de una técnica de detección rápida y específica del virus, como la qPCR en tiempo real, permite determinar y cuantificar rápidamente qué fracciones de la columna de separación por tamaño contenían el virus de título más alto, y seleccionar dichas fracciones para combinarlas y aplicarlas posteriormente en una columna de intercambio iónico de no unión de virus. La purificación mejorada resultante lograda después del primer paso de cromatografía da como resultado un rendimiento mejorado de virus vivo y una complejidad y un coste reducidos.

[0063] El proceso mejorado para la producción de virus purificado (p. ej., poliovirus de origen no natural en vivo, tales

como un poliovirus oncolítico atenuado recombinante ejemplificado por PVS-RIPO) inesperadamente logra mayores rendimientos de virus infeccioso in vivo, en comparación con los procesos conocidos previamente, como el proceso descrito en Ouellette *et al.* El rendimiento de la purificación (también denominado rendimiento del proceso) se calcula como la relación entre el total de unidades formadoras de placa (ufp) del virus purificado obtenido después del último paso del proceso y los virus recolectados del cultivo de la célula huésped (p. ej., los virus en una célula de mamífero, como una célula Vero, que se utilizan como fuente del virus a purificar). Alternativamente, el rendimiento de la purificación se basa en el número de copias (a través de qPCR) o TCID₅₀. Los rendimientos de purificación logrados usando los métodos descritos son consistentemente $\geq 50\%$, tal como 50%-60% del máximo teórico, por ejemplo para PVS-RIPO. El máximo teórico es el 100% del título de ufp en la recolección que se retiene en la sustancia farmacológica a granel purificada final (es decir, sin pérdida de infectividad sobre una base de ufp total). Por lo tanto, el proceso mejorado conduce inesperadamente a un rendimiento de purificación de virus infecciosos vivos de aproximadamente $\geq 50\%$, por ejemplo, un rendimiento de purificación de al menos 50%, al menos 51%, al menos 52%, al menos 53%, al menos 54%, al menos 55%, al menos 56%, al menos 57%, al menos 58%, al menos 59%, al menos 60%, al menos 61%, al menos 62%, al menos 63%, al menos 64%, al menos 65%, al menos 66%, al menos 67%, al menos 68%, al menos 69%, al menos 70%, al menos 71%, al menos 72%, al menos 73%, al menos 74%, al menos 75%, al menos 76%, al menos 77%, al menos 78%, al menos 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, o al menos 85%, por ejemplo un rendimiento de purificación del 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84% u 85%, como un rendimiento de purificación de 50%-60%, 50-80%, 50-83%, 50-85%, 60- 83%, 60-85%, 70-83% o 70-85%. Por el contrario, el proceso descrito en Ouellette *et al.*, Da como resultado un rendimiento global de virus infecciosos vivos de sólo el 29%. Los rendimientos inferiores al 20-30% generalmente no se consideran económicos y presentan dificultades cuando se intenta escalar el proceso a volúmenes más grandes. Los rendimientos obtenidos utilizando otros protocolos de purificación de cromatografía viral conocidos, para virus como el virus del herpes simple (HSV), el adenovirus (p. ej., Serotipo 5) y el virus del sarampión, suelen ser inferiores al 50% y, a menudo, pueden ser inferiores al 20%. Los rendimientos de diferentes procesos de purificación también se pueden comparar comparando la cantidad total de producto generado por cantidad comparable de material de entrada. Por ejemplo, el proceso mejorado descrito en este documento que usa la misma cantidad o una cantidad comparable de material de entrada que Ouelette *et al.* (p. ej., comenzando con aproximadamente $\sim 1\text{E}13$ UFP) puede generar de manera confiable rendimientos en el rango de 5×10^{12} ufp. Por el contrario, el proceso descrito en Ouelette *et al.* solo generan rendimientos del orden de 1×10^9 a 5×10^{10} ufp (p. ej., comenzando con aproximadamente $> 3\text{E}10$ hasta aproximadamente $> 1,5\text{E}12$ UFP) con baja reproducibilidad. Por tanto, el proceso mejorado descrito en el presente documento puede generar de forma fiable 5 billones de ufp de producto viral vivo, en contraste con el alto rendimiento máximo de 50 mil millones de ufp generado por el proceso previamente conocido.

[0064] Los rendimientos obtenidos por el proceso de purificación mejorado no eran alcanzables con los procesos previamente descritos, tales como los descritos en Ouelette *et al.*, independientemente del nivel de pureza deseada, puesto que la "localización" y la cantidad de virus en las fracciones de columna eluidas no se conocieron con precisión hasta después de que se completó el método. Un método de detección que consume mucho tiempo, a saber, SDS-PAGE, se empleó en Ouelette *et al.* para detectar el virus en las fracciones eluidas durante las dos últimas etapas de cromatografía (intercambio iónico de unión a virus y cromatografía de separación por tamaños). Se descubrió que una combinación de los pasos de cromatografía tercero y cuarto y la detección lenta en el método descrito en Ouelette *et al.* condujo a una disminución de los rendimientos del virus de las infecciones vivas. La inactivación del virus (pérdida de infectividad) puede deberse a los pasos de la cromatografía (en particular, la cromatografía de intercambio iónico de unión a virus que requiere elución con un tampón con alto contenido de sal) y los retrasos provocados por el procedimiento de detección SDS-PAGE. En el método de purificación mejorado, usando un método rápido y específico para detectar el virus en las fracciones eluidas durante la primera cromatografía de eliminación permitido de posteriores etapas de purificación potencialmente inactivadoras y reducir el tiempo total de la purificación, dando como resultado un rendimiento mejorado inesperado del poliovirus infeccioso vivo no natural, tal como un poliovirus recombinante oncolítico atenuado ejemplificado por PVS-RIPO. Como resultado de los rendimientos de purificación inesperadamente mejorados, el proceso de producción proporcionado en este documento puede producir aproximadamente 3×10^{12} dosis infecciosas de cultivo de tejidos (TCID₅₀) de PVS-RIPO en una escala de producción de diez "fábricas de células" de 10 niveles comparables a las descritas en este documento. Debido a tal alto rendimiento, el proceso de purificación mejorado puede adaptarse o incorporarse en un proceso de fabricación a gran escala que genera el poliovirus vivo no natural, tal como un poliovirus recombinante oncolítico atenuado ejemplificado por PVS-RIPO.

[0065] Mientras que en algunos ejemplos una disminución de la pureza global (medida, por ejemplo, mediante la detección de proteína celular huésped residual (PCH) y la enzima Benzonase®) del producto final obtenido utilizando de los métodos de purificación mejorados se observó, en comparación para los procesos descritos anteriormente, el grado de pureza resultante del virus producido (p. ej., poliovirus vivo no natural) era aceptable para la fabricación clínica a gran escala. Se muestra aquí que se logró un aumento de 5 a 10 veces en el rendimiento con respecto a un proceso anterior, mientras que la disminución concomitante en la pureza general, medida por la enzima PCH residual y Benzonase®, permaneció dentro de los límites aceptables para la fabricación clínica. En algunos ejemplos, la cantidad de enzima Benzonase® en el producto final es menos de 50 ng/mL (p. ej., menos de 20 ng/mL, menos de 10 ng/mL, menos de 5 ng/mL o menos de 1 ng/mL), la cantidad de PCH en el producto final es menos de 10 µg/µL (como

menos de 5 µg/µL, menos de 2 µg/µL, menos de 1 µg/µL o menos de 0,5 µg/µL), o combinaciones de los mismos. Basándose en las enseñanzas del presente documento, un experto en la técnica apreciará que al variar los parámetros usados para seleccionar las fracciones después de las primeras etapas de cromatografía, se puede lograr una pureza mejorada del producto viral.

5 Generación de plásmidos de plantilla viral

[0066] La descripción proporciona un procedimiento mejorado para la generación de ADN de plásmido que contiene secuencias de plantilla virales. En la FIG. 2 se proporciona una comparación entre los métodos nuevo y antiguo, y los detalles del nuevo método se proporcionan en la FIG. 3. El proceso mejorado para generar plásmido de plantilla de ADN viral asegura que la plantilla de ADN viral utilizada para generar secuencias virales contenga las secuencias de plantilla virales correctas. El tiempo de propagación también puede ser limitado. En algunos ejemplos, los métodos descritos de preparación de plásmidos no incluyen la exposición de las células huésped transformadas a glicerol u otros reactivos que se añaden típicamente a los medios de almacenamiento (p. ej., DMSO). Por tanto, en algunos ejemplos, los métodos descritos de preparación de plásmidos no incluyen incubar las células huésped transformadas en medios que contienen glicerol u otros reactivos típicamente añadidos a los medios de almacenamiento (p. ej., DMSO), y las células huésped transformadas no se congelan.

[0067] Una visión general comparando el método descrito antiguo y el nuevo se proporciona en la FIG. 2. En ambos métodos, un plásmido de plantilla viral que contiene la secuencia viral y un marcador de selección (p. ej., resistencia a la kanamicina) se transduce en una célula huésped (p. ej., *E. coli*). Las células transformadas se cultivan en presencia de un medio de crecimiento adecuado que contiene el compuesto de selección, tal como kanamicina, para permitir la selección de transformantes. En el nuevo método, este crecimiento ocurre en medios sólidos, mientras que en el método anterior este crecimiento ocurre en medios líquidos. El crecimiento en cultivo sólido permite la selección de clones transformados individuales con el plásmido no defectuoso deseado identificado (control PAT). Los pasos de control PAT (Process Analytics Technology) en el nuevo método permiten el monitoreo en tiempo real y la toma de decisiones basada en datos durante el proceso de fabricación. Por ejemplo, PAT puede incluir un análisis electroforético rápido del plásmido para asegurarse de que esté intacto y del tamaño correcto mediante la selección clonal antes de la fermentación y el análisis de la "muestra a granel" después de la fermentación. Por el contrario, el método antiguo hace crecer células transformadas en medio líquido, lo que da como resultado la propagación tanto de plásmidos defectuosos como de plásmidos no defectuosos. En métodos anteriores, después de la transformación, el crecimiento en cultivo líquido y la selección de colonias mediante un marcador de selección (p. ej., resistencia a antibióticos), se permite que las células se procesen hasta un título alto y luego se realiza un banco celular. En esta etapa, las células transformadas se colocan en un medio de almacenamiento (que normalmente contiene glicerol) para crear un banco de células congeladas para su posterior fabricación. Los bancos que no son GMP generalmente se consideran bancos de células de adhesión (ACB), una parte de los cuales se usa para crear el primer banco de células maestras GMP (MCB) a través de la fermentación de medios líquidos. Los bancos de células se pueden almacenar indefinidamente, como se indica mediante el símbolo ≠ en la FIG. 2. Una parte del Lote de MCB se utiliza normalmente para generar un banco de células de trabajo (WCB) mediante la fermentación de medios líquidos que se utiliza en el proceso de fermentación del producto. En el nuevo método, tras el crecimiento en medio sólido y la selección de un clon verificado con el plásmido correcto, las células transformadas se volvieron a expandir en medio de crecimiento líquido en condiciones optimizadas para fabricar el plásmido (Fermentación). En el método anterior, las células almacenadas (cuyo plásmido no AH sido verificado) se expanden en medio de crecimiento líquido en condiciones optimizadas para fabricar el plásmido (Fermentación). Posteriormente, en ambos métodos, los cultivos líquidos se sedimentan y las células se rompen para liberar el ADN plasmídico (Purificación del Plásmido). Las etapas posteriores de cromatografía, filtración, lavado, intercambio de tampón y concentración pueden usarse para generar ADN plasmídico purificado con concentraciones residuales bajas de ADN cromosómico de la célula huésped, endotoxina (LPS) y/o proteínas de la célula huésped.

[0068] La dirección de proceso mejorado un problema de la inestabilidad genética de los plásmidos plantilla virales se propagan por el anfitrión (p. ej., células bacterianas). Utilizando métodos de purificación anteriores, cuando el plásmido PVS-RIPO se propaga en cultivo de *E. coli*, las secuencias de plantilla de PVS-RIPO son inestables y propensas a eventos de inserción de transposones bacterianos. Por ejemplo, el transposón bacteriano TN10/ISR10, presente en la mayoría de las bacterias Gram-negativas, puede insertarse rápidamente en las secuencias de plantilla virales, dando como resultado una plantilla de virus defectuosa. Producto del plásmido PVS-RIPO propagado en un cultivo bacteriano y proporcionado como stock de *E. coli* transformado congelado (como el stock de plásmido viral utilizado en Ouelette *et al.*, que fue fermentado antes de la purificación del plásmido - ver Ouelette *et al.*, Página 32, columna 1) contiene típicamente un número significativo de impurezas, que incluyen el vector pUC19 vacío, el vector pUC19 dimerizado o las inserciones de ADN del transposón de *E. coli* (ilustradas esquemáticamente en la FIG. 1).

[0069] Los métodos anteriores de generación de ADN plásmido que contiene secuencias de plantilla virales también se incluyen la introducción de un plásmido de plantilla viral en una o más células huésped (p. ej., bacterianas), pero posteriormente dichas células se cultivaron en medio líquido y luego "almacenadas" o congeladas (ver FIG. 2). Además, no se realizó ningún proceso de verificación para confirmar que el plásmido permanecía intacto. Un producto plásmido típico puede experimentar hasta tres o más procedimientos de fermentación y congelación de bancos de células antes de la fermentación con fines de fabricación. Se AH determinado que los bancos obtenidos

de ADN plasmídico que contienen plantilla viral contienen una gran población de plásmidos que se degradaron (p. ej., no incluían la secuencia de plantilla viral correcta, por ejemplo debido a eventos de transposones no deseados) y, por lo tanto, no eran óptimos. Fue difícil obtener el clon de longitud completa a partir del material de partida de estos bancos. En algunos ejemplos, al menos el 70% (como al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o incluso a veces el 100%) de la población de plásmidos no incluía la secuencia de plantilla viral de plásmidos correcta cuando se utilizaron los métodos de purificación anteriores. Se ha demostrado que el uso del nuevo método, que evita el paso de banco (p. ej., no hay paso de congelación), da como resultado una población de plásmidos menos degradada, posiblemente debido a menos eventos de inserción de transposones. Por ejemplo, el uso de los métodos descritos para producir plásmido de plantilla viral puede generar una población de ADN plasmídico que contiene secuencias de plantilla virales con al menos 50% de colonias genéticamente "estables" (como al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, o al menos 75%) según lo indicado por electroforesis en gel de agarosa (AGE) y mapeo RE de la población de plásmidos que contiene la secuencia de plantilla viral correcta (o menos del 50% de la población de plásmido que contiene la secuencia de plantilla viral incorrecta (como menos del 40%, menos del 45%, menos del 30% o menos del 25%).

[0070] El proceso mejorado descrito en el presente documento se dirigió a los problemas asociados con el método anterior mediante una o más de las siguientes características. En algunos ejemplos, el proceso mejorado proporciona el stock de plásmido de plantilla viral inicial (p. ej., plásmido de plantilla de ADN viral PVS-RIPO) como una composición que contiene stock de plásmido de plantilla viral aislado (p. ej., ADN de plásmido de PVS-RIPO), en lugar de utilizar células huésped transformadas (p. ej., *E. coli*) y realizar una transformación reciente de las células huésped (p. ej., *E. coli*) usando una reserva de plásmido de plantilla viral aislada (p. ej., ADN plasmídico PVS-RIPO). En algunos ejemplos, el proceso mejorado incluye probar las células transformadas para determinar la presencia de la secuencia de plásmido correcta (p. ej., usando electroforesis en gel de agarosa y mapeo de RE). En los métodos ejemplares descritos en el presente documento, la prueba se realiza en las colonias de células bacterianas cultivadas en medio sólido, pero se puede emplear cualquier técnica apropiada para probar las células bacterianas transformadas para determinar la presencia de secuencias de plantilla virales correctas y seleccionar las células en las que tales secuencias están presentes para una mayor propagación. Al incluir un paso de prueba o selección, que se ejemplifica mediante la detección de una o más secuencias de plantilla virales en colonias bacterianas cultivadas a partir de las células transformadas del stock de plásmido inicial, el proceso mejorado asegura que las células bacterianas que contienen la secuencia de plásmido de plantilla viral correcta o sustancialmente correcta se seleccionan para una mayor propagación. En algunos ejemplos, el proceso mejorado no incluye congelar las células huésped transformadas durante o entre las etapas de propagación y aislamiento, lo que también redujo el riesgo de inestabilidad genética de las secuencias de plantilla virales presentes en las células bacterianas. También se puede emplear un tiempo de propagación intencionalmente limitado en el proceso mejorado, para reducir el riesgo de amplificar un clon de plásmido que contiene secuencias de plantilla virales defectuosas.

[0071] Una visión general del método dado a conocer se proporciona en la FIG. 3, 100. El ADN plasmídico 110, 120 que contiene secuencias de plantilla virales, que también se puede denominar plantilla de ADN viral plasmídico, plásmido de plantilla de ADN viral, plásmido de plantilla viral, plásmido, plantilla de ADN viral y por otros términos relacionados, es un plásmido que contiene una o más secuencias de plantilla de ADN viral que especifican (es decir, que son complementarias o coincidentes con) secuencias de ADN o ARN viral. Se puede obtener un plásmido de plantilla viral en forma de una reserva de plásmido purificada, como un plásmido de un banco de plásmidos (110), o en alguna otra forma. En un ejemplo, el plásmido se proporciona en forma aislada (120), lo que significa que no está contenido en células bacterianas. Las secuencias de ADN o ARN virales pueden contener secuencias virales nativas, secuencias virales modificadas o manipuladas o secuencias no virales, tales como secuencias que codifican proteínas no virales para ser expresadas en la célula huésped. La plantilla de ADN viral se usa para sintetizar secuencias virales *in vitro* (p. ej., se puede emplear ARN polimerasa para sintetizar secuencias de ARN viral *in vitro* a partir de secuencias de plantilla de ADN viral) o *in vivo*, tras la introducción de secuencias de plantilla de ADN viral en una célula huésped.

[0072] Cualquier plásmido de plantilla viral se puede purificar con los métodos descritos. En algunos ejemplos, el plásmido de plantilla viral incluye una plantilla de ADN para un virus de ARN, como un virus de la polio (p. ej., plantilla para PVS-RIPO, virus de la polio inactivado (VPI), virus de la polio atenuado (es decir, vacuna Sabin). un ejemplo, el plásmido de plantilla viral incluye una plantilla de ADN para un virus de ARN de cadena positiva, tal como un *Picornavirus* (tal como *Aphthoviridae* [por ejemplo, virus de la fiebre aftosa (FMDV)], *Hepatitis A* o polio), *Cardioviridae*; *Enteroviridae* (p. ej., virus Cocksackie, Echovirus, Enterovirus y Poliovirus); *Rhinoviridae* (rinovirus, tales como rinovirus A, B o C)); *Togavirus* (p. ej., rubéola; alfavirus (como el virus de la encefalitis equina occidental, el virus de la encefalitis equina oriental y el virus de la encefalitis equina venezolana)); *Flavivirus* (p. ej., virus del dengue, virus del Zika, virus del Nilo Occidental, virus de la hepatitis C y virus de la encefalitis japonesa); y *Coronavirus* (p. ej., coronavirus del SARS, como la cepa Urbani). En un ejemplo, el plásmido de plantilla viral incluye una plantilla de ADN para un virus de ARN de cadena negativa, como un *ortomixiovirus* (como la gripe, como la gripe A o B), el *rabdovirus* (como la rabia), *Filoviridae* (como el Ébola) y *Paramixovirus* (como el virus del sarampión, el virus sincitial respiratorio y los virus de la parainfluenza). En algunos ejemplos, el plásmido de plantilla viral incluye una secuencia de virus de ADN, como una de un *Herpesvirus* (como el virus Varicela-zoster, por ejemplo, la cepa Oka; citomegalovirus; y virus Herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2), adenovirus (como el adenovirus tipo 1, tipo 14, tipo 5, tipo 40 o tipo 41), *poxvirus* (como el virus Vaccinia), virus de la hepatitis B

y *parvovirus* (como el *parvovirus* B19). En algunos ejemplos, el plásmido de plantilla viral incluye una plantilla de ADN o ARN para un retrovirus, como el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), como el subtipo C, VIH-2; virus de la anemia infecciosa equina; virus de inmunodeficiencia felina (VIF); virus de la leucemia felina (FeLV); virus de inmunodeficiencia de simios (VIS); y virus del sarcoma aviar.

[0073] Como se muestra en la FIG. 3, el plásmido de plantilla viral se introduce (p. ej., se transforma) en una o más células huésped, 130. Las células huésped ejemplares que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a: células de bacterias, arqueas, vegetales, hongos, levaduras e insectos, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus* (como *B. subtilis*), *Escherichia* (como *E. coli*, por ejemplo DH5 α , K12, o una cepa de *E. coli* derivada de K12), *Clostridium*, *Saccharomyces* o *Pichia* (como *S. cerevisiae* o *P. pastoris*), *Kluyveromyces lactis*, *Salmonella typhimurium*, células SF9, células C129, células 293, células de *Neurospora*, y células de mamíferos. La introducción del plásmido de plantilla viral en la célula huésped se puede realizar mediante cualquier método adecuado. Los métodos de transformación ejemplares incluyen, pero no se limitan a: electroporación o exposición de células huésped a cationes divalentes, por ejemplo, Ca²⁺, seguido de choque térmico.

[0074] Después de la transformación 130, las células huésped transformadas se cultivan en medio sólido (p. ej., placas de agar), en la presencia del marcador de selección (p. ej., antibióticos). El crecimiento de un cultivo en medio sólido de una o más células transformadas con el plásmido de plantilla viral se puede lograr mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, las células transformadas se pueden sembrar en estrías o diluir en placas sobre un medio sólido, tal como un medio de crecimiento bacteriano basado en agar. Se seleccionan colonias individuales y se expanden por separado en medio líquido (p. ej., en medio de 50 ml), 140. Puede emplearse la selección de las células transformadas usando un marcador de selección adecuado en medio líquido o sólido. Por ejemplo, la selección de un gen que confiere resistencia a los antibióticos contenido en el ADN plasmídico viral se puede lograr utilizando un medio de crecimiento que contenga el antibiótico, como, entre otros, medios que contengan kanamicina para la selección KanR de transformantes plasmídicos (u otros, tales como como medio que contiene ampicilina para la selección AmpR del plásmido transformante). Otros marcadores de resistencia a antibióticos que pueden usarse incluyen higromicina, cloranfenicol y puomicina. Además, se pueden utilizar otros métodos de selección, como la complementación con beta-galatosidasa alfa (utilizando *E. coli* lacZAM15 como huésped) y la siembra en placas con X-gal.

[0075] Después de dejar que las células huésped transformadas crezcan (p. ej., bajo condiciones de selección), se determina que las colonias bacterianas contienen secuencias virales plantilla correctas, 150. La detección de la presencia de una o más secuencias virales plantilla en una o más colonias bacterianas cultivadas en medio sólido se puede lograr mediante uno o más métodos de detección adecuados. Por ejemplo, se pueden realizar uno o más de una reacción de cambio de polimerasa (PCR), secuenciación de ADN, análisis de restricción, electroforesis en gel, transferencia u otros métodos. En un ejemplo, se usa electroforesis en gel de agarosa de mapeo de restricción, seguida finalmente por secuenciación completa del plásmido. La detección de la presencia de una o más secuencias de plantilla viral se realiza para verificar que las células de una o más colonias analizadas contienen una secuencia de ADN de plantilla viral correcta o sustancialmente correcta y no contienen una cantidad sustancial de impurezas, como "vacías". Vectores de plásmido que no contienen secuencias de plantilla virales, dímeros de plásmido y similares, o variaciones o errores de la secuencia de ADN viral, tales como delecciones, inserciones o sustituciones.

[0076] La propagación de las células transformadas de la una o más colonias en donde la presencia de la una o más secuencias de plásmido de plantilla viral se detectó puede lograrse por cualquier método adecuado, así como la extracción del plásmido viral a partir de las células propagadas. Por ejemplo, como se muestra en el paso 160, una colonia en donde se detectó la presencia de una o más células plasmídicas plantilla virales se puede usar para inocular un cultivo líquido de células transformadas, que luego se pueden hacer crecer ("fermentar") a un grado adecuado. A continuación, las células que contienen el plásmido pueden purificarse, por ejemplo, separarse del medio de cultivo mediante sedimentación, filtración u otro proceso de separación apropiado. El plásmido de plantilla de ADN viral se puede extraer (p. ej., purificar o aislar) de las células mediante técnicas apropiadas, 170. El plásmido de plantilla de ADN viral aislado resultante se puede analizar 180 para la cantidad de plásmido y la calidad de plásmido (p. ej., para determinar si el plásmido incluye la secuencia correcta). Por ejemplo, el paso 180 puede incluir determinar la concentración de ADN de la muestra resultante, la concentración de LAL (endotoxina) de *E. coli*, la pureza del ADN plasmídico en la muestra resultante o combinaciones de los mismos. Dichos métodos pueden incluir análisis de digestión por restricción y/o análisis de secuenciación. Después de la purificación, diafiltración y filtración estéril, el plásmido resultante se puede empaquetar, 190, por ejemplo, 1 ml en un vial de vidrio de 2-3 ml. En algunos casos, el método divulgado no incluye intencionalmente ninguna etapa de congelación o período entre las etapas de propagación y extracción (p. ej., etapas 130-170). El tiempo de propagación se puede limitar intencionalmente a aproximadamente 14 horas para el cultivo iniciador del plásmido y una fermentación principal de aproximadamente 20 horas.

[0077] En un ejemplo específico del proceso mejorado, las células *E. coli* se transformaron con un plásmido de plantilla ADN viral PVS-RIPO (se utilizaron dos lotes diferentes) usando choque térmico. Las células transformadas se cultivaron en medio sólido. Se cribaron las colonias resultantes de las células de *E. coli* para identificar las que contenían el plásmido PVS-RIPO correcto usando AGE (análisis de mapeo de scADN y RE). Se puede realizar un

cribado adicional mediante secuenciación de ADN plasmídico. Se seleccionaron células de *E. coli* que contenían el plásmido PVS-RIPO correcto para su posterior propagación, se propagaron en medio de cultivo celular líquido de *E. coli* que contenía LB-Soytone con 50 µg/µL de kanamicina, y se aisló el plásmido PVS-RIPO a partir de células de *E. coli* propagadas (la pasta de células se centrifugó y se lisó/purificó usando kits Qiagen EndoFree GigaPrep) sin congelar a las bacterias. La propagación se limita a una densidad celular predeterminada mediante la medición de OD_{600nm}, el uso de un control a base de gel entre el cultivo de semilla inicial y la fermentación principal, el uso de cultivos paralelos tanto para la fermentación inicial como para la principal, y el procesamiento inmediato del plásmido (es decir, sin pastas de células congeladas). FIG. 4 ilustra la pureza mejorada del plásmido PVS-RIPO obtenido mediante el proceso de producción de plásmido mejorado con respecto a las FIGS. 1A y 1B. Usando los métodos descritos, la recuperación de plásmido intacto de longitud completa (~ 10 kpb) con un alto porcentaje de ADN superenrollado (sc) (*p. ej.*, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos se logró al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99%, como el 70-95%, el 75-85% o el 80-90%). Además, no hubo indicios de pérdida de plásmido completa o parcial, pérdida de inserto de plásmido, recombinación o integración de transposones, utilizando el análisis de mapeo AGE y AGE/RE.

[0078] También se proporciona ADN de plásmido de plantilla viral producido usando los métodos descritos. Por ejemplo, una composición que contiene ADN plasmídico plantilla viral producido usando los métodos descritos puede incluir tampón, tal como Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0. En algunos ejemplos, el ADN plasmídico de plantilla viral resultante incluye plásmidos, al menos el 50% de los cuales contienen el plásmido de plantilla de ADN viral adecuado (*p. ej.*, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, tales como como 50-75%, 50-85% o 50-60% de los clones contienen una única construcción de plásmido del tamaño deseado y patrones de mapeo de restricción siguiendo los métodos descritos, por ejemplo, para PVS-RIPO pADN). En algunos ejemplos, una composición que contiene ADN plasmídico de plantilla viral producido utilizando los métodos descritos incluye menos plásmidos con eventos de inserción de transposones, menos plásmidos que se han dimerizado, menos plásmidos vacíos sin una secuencia de plantilla viral, o combinaciones de los mismos, en comparación con tales eventos observados cuando se utilizan otros métodos de purificación. Por lo tanto, en algunos ejemplos, una composición que contiene ADN plasmídico plantilla viral producido usando los métodos descritos incluye menos de aproximadamente 50% de plásmidos con eventos de inserción de transposones (como menos del 45%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%), menos del 10%, menos del 5% o menos del 1%, como 10-50%, 20-40% o 1-20%), menos de aproximadamente 25% de plásmidos dimerizados (como menos de 20%, menos del 15%, menos del 10% o menos del 5% como 1-25% o 10-20%), menos de aproximadamente el 25% de plásmidos vacíos (como menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, o menos del 5% tal como 1-25%, o 10-20%) sin una secuencia de plantilla viral, o combinaciones de las mismas.

[0079] ADN de plásmido de plantilla viral producido usando los métodos descritos se puede tratar adicionalmente, por ejemplo, linealizado, para producir la plantilla de ADN viral, y se introduce en células huésped. Por ejemplo, para virus basados en ARN, las secuencias de ARN viral pueden generarse a partir de una plantilla de ADN viral usando transcripción *in vitro* y usarse para transfectar células huésped virales. El virus clarificado de las células huésped transfectadas puede recolectarse y denominarse "banco viral maestro" (MVB). Un MVB contiene virus y no células huésped. Debido a su corta vida, las células infectadas generalmente no se recolectan en un banco de células. Los MVB contienen lisados de células post-transfección que contienen virus clarificado. A continuación, las células huésped virales infectadas se cultivan de una manera adecuada, como en un cultivo celular *in vitro*. El crecimiento de las células infectadas puede incluir una o más rondas de amplificación (expansión) de las células de mamífero infectadas en cultivo, lo que significa hacer crecer las células en cultivo y luego usar las células cultivadas para "sembrar" (iniciar) cultivos celulares adicionales, aunque esto puede no ser posible debido a la rapidez de los efectos citopáticos y la muerte celular después de la infección.

[0080] En un ejemplo del proceso mejorado, semilla viral principal (MVS) se crea en células Vero transformadas por el ARN viral generado por IVT; el virus MVB se crea utilizando las células Vero expandidas infectadas por MVS y posteriormente se aclara pero no se purifica; los lotes de producción utilizan células Vero infectadas con el virus del Lote MVB; en todos los casos, la expansión de Vero ocurre antes de la transfección (ARN viral a MVS) o infección (MVB) y producción. Sin embargo, la expansión celular requerida suele ser menor para generar pequeños bancos MVS/MVB en comparación con la fabricación de lotes de virus a gran escala. Por lo tanto, se usó ADN plasmídico PVS-RIPO, producido como se describe anteriormente, y se usaron las secuencias de ARN vírico desnudo resultantes para transfectar células de mamífero Vero. Los cultivos de Vero se expanden hasta el recuento de células deseado antes de la transfección de ARN o la infección viral. Para PVS-RIPO y otros virus, las células no se expanden después de la infección. La replicación y amplificación viral se produce en las células Vero infectadas para generar un Lote de recolección de PVS-RIPO.

Proceso de purificación empleando un método de detección rápida de secuencias de ácido nucleico en la cromatografía de las fracciones

[0081] En este documento se proporcionan procesos o métodos mejorados para obtener composición que contiene la molécula de ácido nucleico purificada o aislada. Los procesos de purificación mejorados incluyen la separación cromatográfica de una muestra que contiene una molécula de ácido nucleico deseada, como un virus. Se muestra en este documento que al detectar la composición que contiene la molécula de ácido nucleico deseada que se está

purificando (p. ej., el "analito") en fracciones de columna de cromatografía eluidas utilizando un método de detección rápida, como la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR), y seleccionando las fracciones basándose en los resultados de la detección (p. ej., seleccionar y combinar las fracciones que contienen la molécula de ácido nucleico deseada), se logró una purificación mejorada en comparación con un proceso, en donde la detección de la muestra se realiza mediante técnicas tradicionales de control por cromatografía, como el control de la absorbancia y la conductividad de la cromatografía eluido de la columna. Aunque se consiguieron mayores rendimientos de virus vivos infecciosos con el proceso de purificación mejorado descrito en este documento, el método no se limita a la purificación de virus vivos. Por ejemplo, los métodos descritos pueden usarse para purificar otros analitos, tales como un virus inactivado (p. ej., uno usado en una vacuna) y ácidos nucleicos virales purificados.

[0082] El proceso de purificación mejorado puede resultar en uno o más de los mayores rendimientos del analito, el aumento de pureza del analito, y la reducción del tiempo de purificación (véase la Tabla 2). El tiempo de purificación reducido conduce a una eficiencia de purificación mejorada y, en algunos casos, a una calidad mejorada del analito purificado. Por ejemplo, la purificación de PVS-RIPO utilizando el proceso de purificación mejorado se logró en 4-8 horas (en comparación con al menos 2 días o al menos 3 días con el método de Ouellette *et al.*), lo que conduce a una mejor infectividad (título) de PVS-RIPO purificado. En otras palabras, un tiempo de purificación más corto conduce a un mejor rendimiento y estabilidad del virus infeccioso vivo. Los parámetros, como el rendimiento y la pureza del analito obtenido mediante el proceso de purificación mejorado, o el tiempo de purificación, pueden manipularse ajustando los parámetros de purificación. Por ejemplo, se puede ajustar (aumentar o disminuir) una cantidad de fracciones de cromatografía que se recolectan y/o prueban mediante el método de detección rápida para detectar la presencia del analito, aumentando la resolución de la columna de cromatografía, agregando purificación adicional y/o pasos de detección o seleccionando diferentes tipos de métodos de detección rápida. En un ejemplo, los rendimientos generales del analito se pueden mejorar probando un gran número de fracciones de cromatografía y agrupando más fracciones que contienen analito para los pasos de preparación adicionales. En otro ejemplo, la pureza del analito se puede mejorar recolectando fracciones más pequeñas y agrupando un pequeño número de fracciones con el mayor contenido de analito para los pasos de preparación adicionales.

Tabla 2. Resultados mejorados de los métodos divulgados

	Método nuevo/divulgado	Métodos anteriores
Rendimiento de purificación *	Al menos el 50%, al menos el 51%, al menos el 52%, al menos el 53%, al menos el 54%, al menos el 55%, al menos el 56%, al menos el 57%, al menos el 58%, al menos el 59%, al menos 60%, al menos 61%, al menos 62%, al menos 63%, al menos 64%, al menos 65%, al menos 66%, al menos 67%, al menos 68%, al menos 69%, al menos el 70%, al menos el 71%, al menos el 72%, al menos el 73%, al menos el 74%, al menos el 75%, al menos el 76%, al menos el 77%, al menos el 78%, al menos el 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84% o al menos 85%, por ejemplo 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84% u 85%, como 50%-60%, 50- 80%, 50-83%, 50-85%, 60-83%, 60-85%, 70-83% o 70-85%	Menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 29%, menos del 20% o menos del 5%, como 20% a 50%, 20-30%, 10-30%, 5% a 30%, o 1% a 30%.
Rendimiento (porcentaje de recuperación basado en entrada (cosecha) frente a salida (producto) UFP)	La recuperación es al menos el 50% del material de partida, tal como al menos el 51%, al menos el 52%, al menos el 53%, al menos el 54%, al menos el 55%, al menos el 56%, al menos el 57%, al menos 58%, al menos 59%, al menos 60%, por ejemplo 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% o 60%, tal 50%- 60%, 50-55% o 55-60%. Por ejemplo, un rendimiento de al menos 5x10 ¹¹ ufp, 1x10 ¹² ufp, o al menos con 5x10 ¹² ufp 14 de 1x10 ¹⁴ ufp material de partida	La recuperación es variable e impredecible, como un pequeño % a 50%, como no más del 10%, no más del 5% o no más del 1%, como 1%-10%, 5%-10%, o del 1 al 5%. En otros ejemplos, se obtiene un rendimiento más alto, como alrededor del 50%. Por ejemplo, un rendimiento de 1x10 ⁹ a 5x10 ¹⁰ ufp con 1x10 ¹⁰ a 1x10 ¹³ ufp de material de partida

(Continuación)

	Método nuevo/divulgado	Métodos anteriores
5	Tiempo para realizar el ensayo de purificación	4 a 8 horas
10	Infectividad (título) del virus	2-3 días o 12-18 horas (teóricamente si se hace de forma continua)
15		Aproximadamente 3 x 10 ¹⁰ TCID ₅₀ a 3 x 10 ¹² TCID ₅₀ en una escala de producción de diez "fábricas de células" de 10 niveles
	* La relación entre el total de unidades formadoras de placa (ufp) del virus purificado obtenido después del último paso del proceso y los virus recolectados del cultivo de la célula huésped (p. ej., los virus en una célula de mamífero, como una célula Vero, que se utilizan como fuente del virus a purificar)	

[0083] Una visión general de los métodos mejorados se proporciona en la FIG. 5, 200. Las células huésped previamente infectadas con un plásmido de plantilla viral y que crecen en cultivo, como las células Vero infectadas con un virus de la polio (como PVS-RIPO), son lisadas por el virus. El sobrenadante resultante se incuba con una enzima nucleasa 210. La nucleasa puede digerir ARN y ADN libres en solución, pero deja intactos los ácidos nucleicos virales encapsulados (*es decir*, contenidos en partículas virales intactas). Por lo tanto, la nucleasa se incuba con el sobrenadante que contiene el virus deseado en condiciones que permiten la digestión (y por lo tanto la reducción y/o eliminación) del ADN de la célula huésped (p. ej., ADN_g, ADN_{mt}) y ARN (p. ej., ARN_t, ARN_r), otros contaminantes potenciales. ADN/ARN (*p. ej.*, virus endógenos/exógenos) si están presentes, y ARN viral libre no encapsulado. En un ejemplo, la nucleasa está presente a una concentración de 50 unidades/ml (o menos), por ejemplo a 2-8°C durante 16-24 horas. En algunos ejemplos, la nucleasa se usa a una temperatura más alta (p. ej., 25-37°C) durante tiempos más cortos, pero puede ocurrir la degradación de la cápside viral. En un ejemplo, la nucleasa es una endonucleasa, como la enzima Benzonase®. En un ejemplo, la nucleasa es una o más ADNasas, una o más ARNasas o combinaciones de una o más ADNasas y una o más ARNasas.

[0084] El sobrenadante digerido por nucleasa se somete entonces a cromatografía de separación por tamaño (o de filtración en gel), 220. Por ejemplo, el sobrenadante digerido por nucleasa se puede aplicar a una columna de separación por tamaño, tales como una que contiene una resina a base de agarosa (p. ej., Sepharose). En un ejemplo, la columna de separación por tamaños es una resina Sepharose 6 Fast Flow (FF), que tiene un alto caudal. En algunos ejemplos, el uso de una columna 6FF en lugar de una 4FF puede mejorar la pureza del virus y/o aumentar la velocidad de purificación. Una o más fracciones recolectadas de la columna se analizan para detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico diana (p. ej., mediante la detección de una secuencia diana del virus diana) usando qPCR (como RT-qPCR en tiempo real), 230. En algunos ejemplos, también se controlan otros parámetros del eluato, tales como la absorbancia (p. ej., a una o longitudes de onda de 280 nm, 215 nm o 254 nm) y/o conductividad. Las fracciones identificadas que contienen la molécula de ácido nucleico diana (p. ej., virus) se agrupan o combinan 240. En un ejemplo, una fracción positiva es una que tiene > 107 copias/ml (en donde copias se refieren a copias del genoma de ADN_c o ARN viral).

[0085] Las fracciones reunidas se someten a cromatografía de intercambio aniónico, 250. Por ejemplo, las fracciones reunidas se pueden aplicar a una columna que contiene resina Super Q 650M. En algunos ejemplos, se controlan los parámetros del eluato del intercambio aniónico, tales como la absorbancia (p. ej., a una o más longitudes de onda de 280 nm, 215 nm o 254 nm) y/o conductividad. En algunos ejemplos, el eluido del intercambio aniónico se controla para detectar la presencia del virus, por ejemplo, usando PCR (p. ej., RT-PCR en tiempo real). Por ejemplo, las fracciones que contienen al menos 5 x 10⁹ copias/mL pueden conservarse y agruparse, aunque esto puede expandirse a fracciones que contengan al menos 2 x 10⁹ copias/mL para mejorar el rendimiento a costa de la pureza (*p. ej.*, si el rendimiento es más deseado que una mayor pureza).

[0086] El pico de flujo resultante recogido de la columna de intercambio aniónico, que contiene la molécula de ácido(s) nucleico(s) diana, se puede concentrar usando diafiltración, 260. El permeado y/o sofocos resultantes pueden ser recogidos, agrupados, filtrados estérilmente, o combinaciones de los mismos. Si se desea, el permeado y/o las descargas resultantes se pueden analizar adicionalmente, por ejemplo, determinando el pH, BCA (contenido de proteína), contenido de Vero PCH, contenido de ADN de CH, LAL, realización de pruebas de placa (UFP) o combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, se añaden materiales adicionales a la preparación de la molécula de ácido nucleico purificada resultante, como uno o más de un adyuvante, albúmina de suero humano (HSA), azúcar (manitol, sacarosa, etc.), tensioactivo (p. ej., Tween/polisorbato), y similares.

Cromatografía

[0087] Los métodos para la obtención de una composición que contiene moléculas de ácido nucleico, como el virus purificado se describe, incluye la separación de una muestra que contiene las moléculas de ácido nucleico deseadas

mediante cromatografía de columna de líquido, la recogida de las fracciones eluidas de la cromatografía en columna, la detección en una o más de las fracciones de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de ácidos nucleicos usando un método de detección rápida, como RT-qPCR en tiempo real, y seleccionando una o más de las fracciones en las que se detecta la molécula de ácido nucleico diana en base a la concentración de umbral predeterminado ("límite") de la molécula de ácido nucleico diana (como un umbral de $>10^9$ copias/ml (*es decir*, copias del genoma viral determinado por RT-qPCR en tiempo real)). La cromatografía en columna abarca todos los métodos que permiten la separación de componentes de una muestra que contiene una molécula de ácido nucleico e implican una columna empaquetada con una fase estacionaria (medio de cromatografía) y una fase móvil (líquido d eluyente), en donde la muestra es soluble. La muestra se aplica a la columna, seguida de la aplicación del eluyente. Las fases estacionaria y móvil se seleccionan de tal manera que varios componentes de la muestra viajan a través de la fase estacionaria de manera diferente. Los métodos de cromatografía líquida ejemplares adecuados para la separación de muestras que contienen ácido nucleico son conocidos y descritos, por ejemplo, por McLaughlin, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 5 (8): 215-219 (1986) o McGrath et al., *J Virol.* 25 (3): 923-927 (1978). Por ejemplo, los métodos de cromatografía en columna de líquidos se pueden clasificar según el tipo de medio y/o el proceso de separación involucrado. Algunos ejemplos son la cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel), la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía hidrófoba y la cromatografía de afinidad. Algunos ejemplos de medios de cromatografía adecuados que se pueden usar con los métodos descritos son Q-Sepharose FF, SP-Sepharose, Superdex-75, Capto-Q, Source-Q, DEAE-Sepharcel, Zenix-C, Source-S, Phenyl/Butyl/Octo-Capto y similares.

[0088] El eluato de la columna se recoge típicamente en una serie de fracciones (muestras de un volumen predeterminado). Las fracciones pueden someterse a varios métodos de detección para determinar la presencia o ausencia de uno o más de los componentes de la muestra, que pueden denominarse analitos. También se puede emplear la monitorización continua del eluido, de modo que la detección se lleve a cabo de forma continua en un eluido de columna, que luego se recoja en fracciones. Los métodos de detección ejemplares son la detección de absorbancia en las longitudes de onda adecuadas para la detección de ácidos nucleicos y/o proteínas o la monitorización de la conductividad para detectar electrolitos, tales como sales. Las fracciones pueden analizarse para detectar la presencia o ausencia de moléculas biológicas usando una o más de las técnicas analíticas adecuadas, tales como pruebas de actividad enzimática, electroforesis, transferencia, etc. Las técnicas de detección típicamente empleadas durante la separación de muestras que contienen ácido nucleico carecen de especificidad. Por ejemplo, puede emplearse la detección midiendo la absorbancia a una longitud de onda adecuada, como 254 nm para el ARN, pero no permite la detección de una secuencia de ácido nucleico específica (*p. ej.*, secuencia diana viral) y, por lo tanto, la muestra resultante puede contener contaminantes indeseables, como los ARN de la célula huésped. Sin embargo, los métodos de detección más específicos pueden llevar mucho tiempo, lo que puede conducir a una degradación no deseada de la muestra mientras se obtienen los resultados de la detección.

[0089] En el proceso de purificación mejorado descrito, independientemente del tipo de medio de cromatografía empleada para la separación de la muestra que contiene una molécula de ácido nucleico (tales como ácidos nucleicos virales), el método incluye la detección o la medición de la molécula de ácido nucleico diana en una o más de las fracciones usando un método de detección rápida que puede detectar específicamente una o más secuencias en el analito que contiene moléculas de ácido nucleico. Un ejemplo de tal método es la detección RT-qPCR en tiempo real. Se pueden emplear otras técnicas de detección, como la monitorización de la absorbancia y la conductividad, junto con la detección rápida. Por ejemplo, cuando se emplea RT-qPCR real para una detección rápida, se pueden seleccionar fracciones para la detección de RT-qPCR en tiempo real basándose en los resultados de la monitorización de la absorbancia y la conductividad. Sin embargo, la selección de una o más de las fracciones en las que está presente la molécula de ácido nucleico diana se basa en la detección RT-qPCR en tiempo real de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra. Las fracciones se seleccionan en función del umbral predeterminado ("corte") de concentración de la secuencia de ácido nucleico diana presente en la muestra. Es decir, se seleccionan las fracciones que contienen una concentración de la secuencia de ácido nucleico diana igual o superior al valor umbral. Se pueden combinar luego múltiples fracciones. La composición resultante contiene una concentración más alta de la molécula de ácido nucleico diana que la muestra originalmente aplicada en la columna de cromatografía. También puede contener una concentración más baja de componentes de la muestra distintos del ácido nucleico deseado.

[0090] Los métodos de purificación descritos se emplearon ilustrativamente en un proceso de purificación de PVS-RIPO obtenido a partir de células Vero. El proceso de producción de PVS-RIPO implicó múltiples fábricas de células de diez niveles de células Vero infectadas por el Pasaje 1 (P1) PVS-RIPO obtenidas del banco viral maestro. El material recolectado (sobrenadante del medio celular) se trató con enzima Benzonase® y se purificó mediante dos etapas de cromatografía en columna, cromatografía de separación por tamaños en Sepharose 6FF y cromatografía de intercambio aniónico Super-Q 650M. Ambos pasos de cromatografía fueron de "flujo continuo" para PVS-RIPO, lo que significa que no se unió al medio de la columna y, por lo tanto, se eluyó en el eluido de flujo continuo. En el primer paso de cromatografía, se utilizó una columna de Sepharose 6FF para separar los contaminantes de menor peso molecular en el medio de cultivo celular y como paso de intercambio de tampón. Además de identificar el pico del virus principal mediante la monitorización continua de la absorbancia (absorción de UV a 260 nm/280 nm), se recogieron fracciones a lo largo del pico y se analizaron adicionalmente utilizando RT-qPCR en tiempo real. El cromatograma usualmente contenía dos picos de absorbancia UV definidos. En los procesos de purificación de PVS-RIPO anteriores, como el descrito en Ouellette *et al.* (que usó Sepharose 4FF, no 6FF) las decisiones de agrupamiento

de fracciones se basaron en el control de la absorción, lo que condujo a rendimientos de purificación de aproximadamente el 80% en esta etapa. Por el contrario, la detección de RT-qPCR condujo a rendimientos de aproximadamente el 100% en este paso. Sorprendentemente, el análisis de fracciones mediante RT-qPCR en tiempo real indicó que el pico principal del virus PVS-RIPO se encontraba aproximadamente cerca del pequeño pico de absorbancia UV inicial, mientras que el pico de absorbancia posterior más grande contenía solo trazas de PVS-RIPO. En algunos casos, el "pico inicial pequeño" de A254 y los resultados de RT-qPCR no se superpusieron completamente, lo que indica que el pico de A254nm inicial puede no deberse únicamente al ARN viral. Por lo tanto, la detección de RT qPCR fue inesperadamente crítica para determinar las fracciones apropiadas para recolectar (se usó un umbral de $>10^7$ copias/mL) para el procesamiento posterior. El aumento inesperado de la concentración de PVS-RIPO y la disminución de los contaminantes obtenidos después de la cromatografía en Sepharose 6FF hicieron innecesarios los pasos de cromatografía de intercambio aniónico CMD y Sephadex G-25 descritos en Ouellette *et al.* Las fracciones seleccionadas se combinaron y se purificaron adicionalmente en la segunda etapa de cromatografía SuperQ 650M. La columna SuperQ 650M se utilizó para eliminar los contaminantes de la proteína de la célula huésped del virus que no se une. Después de la purificación, la composición de PVS-RIPO se concentró, filtró y viajó.

[0091] El rendimiento promedio de producción de los PVS-RIPO vivos infecciosos obtenidos por el procedimiento descrito fue reproducible $\geq 50\%$, por ejemplo, en el rango de 50%-80%. El tiempo, el costo y la complejidad del proceso de purificación se redujeron significativamente, ya que empleó solo dos pasos de cromatografía en columna, en comparación con los cuatro pasos de cromatografía descritos en Ouellette *et al.* Este proceso mejorado de producción y purificación se puede emplear en la fabricación clínica de poliovirus recombinantes u otros virus, dando como resultado uno o más de: rendimientos de producción mejorados, infectividad y pureza del producto purificado final. Por ejemplo, los métodos descritos pueden usarse para la fabricación clínica de otros virus recombinantes, por ejemplo, los producidos a partir de vectores plásmidos inestables. Cualquier plásmido propagado en *E. coli* que contenga una secuencia de virus ARN nativo intacta (especialmente los de virus ARNss) es inherentemente inestable. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a VIH, virus linfotrópico de células T humanas (HTLV), rabia, hepatitis C, sarampión, ébola y otros virus hemorrágicos.

Detección de la diana en fracciones de cromatografía

[0092] Varios métodos de detección rápida para la detección de analito en fracciones de cromatografía se puede emplear en el proceso de purificación mejorado. El método de detección puede permitir la detección de secuencias de ácido nucleico (tales como secuencias de ADN, ADNc o ARN) en el analito que contiene ácido nucleico. Los métodos de detección ejemplares incluyen secuenciación de ácido nucleico, amplificación de ácido nucleico (p. ej., PCR) y detección directa usando sondas de ácido nucleico específicas de secuencia marcadas. En un ejemplo, el marcador está basado en fluorescencia o enzimático/colorimétrico. Por lo tanto, en algunos ejemplos, el método de detección incluye secuenciación directa rápida (como la de Illumina o métodos basados en nanoporos), reacción en cadena de ligasa (LCR), BIAcore (resonancia de plasmón de superficie) y Octeto (interferometría) utilizando sondas que se unen a una secuencia viral. En algunas realizaciones, se emplea PCR cuantitativa (qPCR). La PCR cuantitativa se refiere generalmente a un método que permite la cuantificación de las cantidades de la secuencia de ácido nucleico diana utilizada al comienzo de la reacción de PCR.

[0093] Las técnicas cuantitativas de PCR utilizan varios enfoques para la cuantificación. Un ejemplo de un método de PCR cuantitativa es RT-qPCR (PCR cuantitativa de transcripción inversa). Aquí, el término "PCR cuantitativa" abarca todas las técnicas basadas en PCR que permiten la cuantificación de las secuencias de ácido nucleico diana inicialmente presentes. El término "PCR en tiempo real" denota un subconjunto de técnicas de PCR cuantitativas que permiten la detección del producto de PCR a lo largo de la reacción de PCR o en tiempo real. Los principios de la PCR en tiempo real se describen generalmente en Held *et al.*, Genome Research 6: 986-994 (1996). Generalmente, la PCR en tiempo real mide una señal en cada ciclo de amplificación. Las técnicas convencionales de PCR en tiempo real se basan en fluoróforos que emiten una señal al final de cada ciclo de multiplicación. Ejemplos de tales fluoróforos son los tintes de fluorescencia que emiten fluorescencia a una longitud de onda definida al unirse al ADN de doble hebra, como el verde SYBR. Un aumento en el ADN de doble hebra durante cada ciclo de amplificación conduce a un aumento en la intensidad de la fluorescencia debido a la acumulación de producto de PCR. Otro ejemplo de fluoróforos utilizados en la PCR en tiempo real son las sondas informadoras fluorescentes específicas de secuencia. Los ejemplos de tales sondas son las sondas TaqMan® y las sondas FRET. Las sondas TaqMan® contienen un fluoróforo y un atenuador de fluorescencia, que reduce la fluorescencia emitida por el fluoróforo. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda es escindida por la actividad exonucleasa de la polimerasa de ADN, liberando el fluoróforo. La liberación de fluoróforo da como resultado un aumento de la señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto de PCR. Las sondas FRET emplean transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Se diseñan dos sondas de secuencia específica marcadas para unirse al producto de PCR durante la fase de hibridación de la PCR, lo que da como resultado una transferencia de energía de un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor. Esto da como resultado un aumento de la fluorescencia durante la fase de hibridación, que es proporcional a la cantidad de producto de PCR. El uso de una sonda indicadora de secuencia específica permite la detección de una secuencia diana con alta especificidad y permite la cuantificación incluso en presencia de amplificación de ADN no específica. Las sondas fluorescentes también se pueden utilizar en ensayos multiplex (para la detección de varios genes en la misma reacción) basados en sondas específicas con marcadores de diferentes colores. Por ejemplo, un ensayo multiplex puede usar varias sondas de secuencia específica, marcadas con una variedad de fluoróforos

(incluidos, entre otros, los siguientes: FAM, JA270, CY5,5 y HEX) en la misma mezcla de reacción de PCR.

Usando el virus purificado

5 **[0094]** Los virus purificados con los métodos descritos se pueden utilizar clínicamente, por ejemplo como una vacuna, tal como en el cáncer de inmunoterapia o para proporcionar una respuesta inmune protectora.

10 **[0095]** En un ejemplo, los poliovirus purificados, tales como PVS-RIPO, se usan para tratar un sujeto con cáncer, tales como glioblastoma. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar aproximadamente 1×10^8 TCID₅₀ por administración tumoral directa. Al menos dos semanas después, el sujeto puede someterse a una biopsia para confirmar el diagnóstico/recurrencia del cáncer. Una vez que se confirma el diagnóstico, se puede colocar al sujeto un catéter para la administración mejorada por convección del PVS-RIPO (5×10^7 TCID₅₀). Después de la colocación del catéter, se infunde al sujeto con PVS-RIPO durante 6,5 horas. El catéter se puede quitar una vez completada la infusión. Se pueden realizar resonancias magnéticas para controlar la terapia.

15 **[0096]** En un ejemplo, los poliovirus purificados, tales como un poliovirus Sabin atenuado, se utiliza para vacunar un sujeto para la protección contra la poliomielitis. Por ejemplo, el poliovirus Sabin atenuado purificado se puede administrar por vía oral en una sola dosis (generalmente dos gotas, que contienen 1.000.000 de unidades infecciosas de Sabin 1 (eficaz contra PV1), 100.000 unidades infecciosas de la cepa Sabin 2 y 600.000 unidades infecciosas de Sabin 3). Dicha vacuna también puede incluir pequeñas trazas de antibióticos (*p. ej.*, neomicina y estreptomycin), pero no conservantes.

20 **[0097]** En un ejemplo, los poliovirus purificados, tales como un virus de la polio inactivada, se utiliza para vacunar un sujeto para la protección contra la polio. Por ejemplo, la OPV purificada se puede administrar mediante inyección en una sola dosis (*p. ej.*, junto con la vacuna contra la difteria, el tétanos y la tos ferina acelular).

EJEMPLO 1

Producción de PVS-RIPO en cultivo celular

Cultivo celular

30 **[0098]** Se descongelaron dos viales de las células del Banco de Células Vero de Trabajo (Lote 217002-2). El contenido de cada vial se añadió a 9 ml de medio completo calentado (medio Eagle modificado por Dulbecco, DMEM, Invitrogen) con suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone). Se realizó un recuento celular y las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Todas las células se resuspendieron y se colocaron en un matraz de 75 cm². Se aflojó la tapa del matraz y se colocó en la incubadora. Este fue el pasaje 142 (pasaje 1 después de descongelar). Después de dos realimentaciones y una semana, las células se tripsinizaron y se redispersaron en un nuevo matraz de 75 cm² sembrado a 20.000/cm² (pasaje 143). Las células en este momento tenían una viabilidad del 92%.

40 **[0099]** El matraz de 75 cm² de células fue escalado hasta dos matraces de 225 cm² con siembra a 33.280 células/cm² (paso 144). Las células en este momento eran viables en un 94%. Tres días después, las células eran viables al 100%. Se combinaron ambos matraces de 225 cm². Las densidades celulares finales para varias muestras, obtenidas tanto antes como después de la combinación, oscilaron entre 213.000 y 234.000 células/cm², y la viabilidad celular en las muestras varió entre el 86% y el 96%.

50 **[0100]** A partir del cultivo obtenido a partir de los dos matraces de 225 cm² de células, tres 225 matraces cm² se sembraron (paso 145) para escalar hasta cámaras de cultivo de células de 10 niveles CellSTACKs®, que pueden ser también descritas como "fábricas de células" (Corning® Inc., Corning, Nueva York). Primero, las células de tres de 225 cm² se expandieron en seis matraces de 225 cm². Estos seis matraces de células (pase 147) se tripsinizaron y se combinaron. A partir de este conjunto, se sembraron una cámara CellSTACK® de cinco niveles, una cámara CellSTACK® de un solo nivel y cinco matraces de 225 cm² a 39.000 células/cm² (todos fueron de paso 148).

55 **[0101]** La cámara de CellSTACK® de cinco niveles (paso 148) se utilizó para sembrar una cámara de diez niveles y una de cuatro CellSTACK® a 42.000 células/cm². La cámara CellSTACK® de diez niveles se utilizó para una de las infecciones. El tiempo desde la siembra de la cámara CellSTACK® de diez niveles hasta la infección fue de 90 horas. Se contaron las células en una de las cuatro cámaras CellSTACKs® de un nivel para determinar cuánto virus se necesitaba para infectar la cámara CellSTACK® de diez niveles. El recuento de células en este punto era 332.932 células/cm² y las células eran viables al 96%. Se utilizó otra cámara CellSTACK® de un nivel como control.

60 **[0102]** El CellSTACK® de un solo nivel (paso 148) producido de los 225 matraces iniciales cm² se usó para hacer una cámara CellSTACK® de cinco niveles (paso 149). Esta cámara CellSTACK® de cinco niveles se usó luego para sembrar dos cámaras CellSTACKs® de diez niveles (paso 150) a 42.000 células/cm². El tiempo desde la siembra de las dos cámaras CellSTACK® de diez niveles hasta la infección fue de 94 horas. Estas dos cámaras CellSTACK® de diez niveles se utilizaron para las otras dos infecciones.

Infección

[0103] Un Lote MVB se utilizó para infectar las células de producción. El procedimiento para la producción de un Lote PVS-RIPO y un Lote MVB se resume a continuación: Se generó un Lote Vero MCB utilizando células Vero de una semilla de la Organización Mundial de la Salud. Las células Vero se recolectaron mediante tripsinización. Después de la centrifugación, las células se resuspendieron en una solución cioprotectora de suero bovino fetal (FBS) al 90% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL. Se produjo un Lote de Vero WCB mediante la expansión del Lote de Vero MCB de la siguiente manera: Se utilizó un vial del Lote de Vero MCB para iniciar una Vero WCB. Después de cuatro pases en DMEM, alto contenido de glucosa con L-glutamina, con Hepes que contenía FBS, se viajó la WCB a un volumen de 1 ml/vial y una concentración de $4,7 \times 10^6$ células/mL. Los viales que contenían el Lote Vero Master WCB se colocaron en nitrógeno líquido en fase de vapor. El Lote de ADN plasmídico PVS-RIPO se utilizó para producir un Lote de ARN PVS-RIPO mediante transcripción *in vitro*. Se linealizaron cuarenta (40) µg del Lote de ADN del plásmido PVS-RIPO mediante digestión con *Sal I*. El ADN linealizado se extrajo con fenol y cloroformo y se realizó una precipitación con etanol a $\leq -70^\circ\text{C}$ durante la noche. El ADN se resuspendió en 40 µl de agua destilada sin ADNasa/ARNasa. Se analizó una muestra del ADN plasmídico antes de la digestión/purificación y después de la digestión/purificación mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar el tamaño y la recuperación del producto.

[0104] Se utilizó veinte (20) µg del ADN linealizado como plantilla para sintetizar el ARN PVS-RIPO en dos reacciones idénticas. Cada reacción se realizó utilizando 10 µg de ADN linealizado. Para preparar las reacciones, se añadieron 10 µg de ADN plasmídico linealizado a la mezcla de reacción de transcripción *in vitro* (RiboMAX Large Scale RNA Production System, Promega) hasta un volumen final de 100 µl. Las reacciones de transcripción se incubaron a 37°C durante 2,5-3 horas. Cuando se completaron las reacciones, los tubos de reacción se colocaron a $\leq -70^\circ\text{C}$ para su almacenamiento. Se utilizaron células Vero de un banco de células de trabajo calificado (WCB) en la etapa de electroporación. Se expandieron dos viales de un Lote de WCB de células Vero en DMEM con L-glutamina, sin rojo de fenol, se enriquecieron con FBS al 10% y se incubaron a 37°C y CO_2 al 5% durante tres pases.

[0105] Las células Vero se trataron con tripsina mediante la adición de tripsina-EDTA (0,05% de tripsina, EDTA 0,5 mM) y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 4-6 minutos. Las células tripsinizadas se recogieron y centrifugaron a aproximadamente 4°C y 1000 RPM durante 10 minutos. Las células recolectadas se suspendieron en 100 ± 2 ml de PBS (sin calcio ni magnesio). Se utilizó una muestra de la suspensión celular para determinar el recuento celular. Las células restantes se recogieron por centrifugación a un ajuste de 1000 RPM y 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el PBS clarificado y se resuspendió el sedimento celular en PBS reciente hasta una densidad celular calculada final de $1,25 \times 10^7$ células/mL. Se combinaron aproximadamente 55 µg de PVS-RIPO ARN y 9 ml de las células Vero expandidas y se transfirieron a cubetas en alícuotas de 0,8 ml. El contenido de las cubetas se sometió a dos descargas eléctricas a 0,5 kilovoltios y 0,25 microFaradios utilizando una unidad de electroporación Bio-Rad Gene Pulser II. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos, el contenido de la cubeta se transfirió a matraces T75 con medio DMEM/F12 (Invitrogen). Los matraces T75 se incubaron a 33°C y CO_2 al 5%. Se observaron efectos citopáticos completos al tercer día de incubación.

[0106] Se recogió el contenido del matraz y se aclaró mediante centrifugación para producir el Lote de semilla de virus inicial (IVS). La expansión de las células Vero fue la siguiente: las células Vero se sembraron en dos matraces T25 que contenían DMEM, con L-glutamina, sin rojo fenol (DMEM, Invitrogen) con FBS al 10% (Hyclone) y se incubaron en una incubadora de CO_2 a 37°C y 5% CO_2 . Las células Vero se expandieron aún más a cincuenta matraces T162 después de pasar las células tres veces. El día tres del tercer pase, se examinó el contenido de los cincuenta matraces T162 bajo un microscopio para determinar el estado de las células. Se seleccionaron cuarenta y tres matraces que eran cultivos puros y al menos 95% confluentes. Se examinaron las células en uno de los matraces T162 seleccionados para determinar el número de células y la viabilidad y se incubó otro matraz como matraz de control de calidad celular. De los 41 matraces restantes, uno se mantuvo como control negativo después de la inoculación con mezcla de DMEM:Nutrientes mezcla F12 1:1 sin rojo fenol (DMEM/F-12, Invitrogen). El Lote de semillas de post-electroporación de PVS-RIPO se sacó del almacenamiento, se descongeló a temperatura ambiente y se diluyó usando medio DMEM/F-12. Los cuarenta matraces T162 (que contienen las células Vero expandidas) se infectaron con el Lote de semillas post-electroporación PVS-RIPO a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5. Los matraces inoculados se incubaron a 33°C y CO_2 al 5% después de la adición de medio de cultivo celular DMEM/F-12 nuevo. Los matraces infectados con virus y los matraces de control se controlaron durante la incubación para determinar atributos tales como contaminación visible, el estado de las células y el porcentaje de confluencia.

[0107] En 70 horas después de la infección, la incubación se terminó y los matraces se examinaron para atributos tales como la contaminación visible, condición de la célula y el porcentaje de confluencia y después se recogieron. Los contenidos de los matraces se transfirieron a botellas de centrifuga y se centrifugaron a 4°C y 2500 RPM durante 33 minutos para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes que contenían el virus PVS-RIPO se combinaron en una botella giratoria de 850 cm². Los sobrenadantes combinados se transfirieron a dos botellas de PETG de 30 ml y veinticuatro de 125 ml en alícuotas de 20 ml y 80 ml, respectivamente. Además, se llenaron doce crioviales de 2 ml con alícuotas de 1 ml. El sobrenadante restante (3,8 ml en total) se transfirió a tres crioviales de 2 ml para un total de quince crioviales de 2 ml etiquetados como Lote de semilla de virus maestro PVS-RIPO. Se congelaron once crioviales de 2 ml, veintitrés botellas de PETG de 125 ml y dos botellas de PETG de 30 ml a $\leq -70^\circ\text{C}$ y posteriormente se

transfirieron a un almacenamiento controlado de $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Cuatro de los crioviales de 2 ml se sometieron a análisis de proceso/control de calidad biofarmacéutico para el título (por ufp y TCID₅₀), partículas de virus y pruebas de liberación de secuencia de ADN. El resto de las pruebas de liberación se realizó según corresponda y se desarrollaron los procedimientos de manipulación de materiales PVS-RIPO.

[0108] Las tres cámaras CellSTACK® de diez niveles con cultivo celular producidas en la sección anterior se lavaron con salina de tampón de fosfato Dulbecco (DPBS, Invitrogen) y después se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 en DMEM/F-12 (Invitrogen). Se descongeló una alícuota de 80 ml del banco viral maestro P1 (lote n° L0403006) y se utilizaron alícuotas de 21 ml para infectar cada cámara de células de diez niveles a 33°C durante 72 horas en una incubadora de CO₂ al 5%. Las fábricas de células de diez niveles se recolectaron 70 horas después de la infección, después de confirmar visualmente el efecto citopático (CPE) del 100% utilizando un microscopio. El material cosechado se centrifugó a 3.800 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se procesó inmediatamente (lote n° L1308002B, ver Tabla 3) o se almacenó a -70°C durante hasta nueve días (lote n° L1308002C y L1308002D, ver Tabla 3) antes de la purificación.

EJEMPLO 2

Purificación de PVS-RIPO

[0109] Las cosechas de cada una de tres cámaras CellSTACK® de diez niveles se purificaron de acuerdo con el protocolo esquemáticamente ilustrado en la FIG. 5, a saber, tratamiento con nucleasa, seguido de cromatografía de filtración en gel, seguido de análisis de qPCR, seguido de cromatografía de intercambio aniónico, seguido de concentración mediante diafiltración. El protocolo de purificación se repitió para cada uno de los tres ciclos de producción.

Tratamiento con nucleasa

[0110] Enzima de Benzonase® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) es una endonucleasa que digiere tanto ARN libre como ADN en solución. Los ácidos nucleicos virales completamente encapsulados (*es decir*, contenidos en partículas virales intactas) no se ven afectados. La enzima Benzonase® es necesaria para reducir y/o eliminar 1) el ADN de la célula huésped (ADNg, ADNmt) y ARN (ARNt, ARNr); 2) otros ADN/ARN potencialmente contaminantes (p. ej., virus endógenos/exógenos) si están presentes; y 3) ARN viral libre no encapsulado. La eliminación de los ácidos nucleicos libres es necesaria por razones de seguridad, reduciendo la viscosidad de la recolección y mejorando la relación señal/ruido de los métodos de detección viral posteriores como A254nm y RT-qPCR. El rendimiento de la enzima Benzonase® depende de la solución tampón que la contenga.

[0111] Se añadieron 100 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) a cada una de las tres cosechas clarificadas para obtener una concentración final de MgCl₂ 1 mM antes de la adición de enzima Benzonase®. Las adiciones de la enzima Benzonase® se basaron en el volumen de la recolección para lograr la concentración final de la enzima Benzonase® en cada recolección de 50 µg/ml. Luego, cada botella de recolección se incubó a 2-8°C durante 16-24 horas.

Cromatografía de filtración en gel

[0112] Una columna BPG de 10 cm (diámetro interno (d.i.)) (GE Healthcare-Biosciences, Pittsburgh, PA) estaba lleno con 3.140 ml de resina de Sepharose 6 Fast Flow (FF) (GE Healthcare-Biosciences) a una altura de la cama de 40 cm. Antes de su uso, la columna de relleno se desinfectó con NaOH 0,5 N y se dejó reposar durante 26-28 horas a temperatura ambiente. Se usó agua para lavar la columna y la columna se almacenó en NaOH 0,05 M hasta el proceso de purificación. Antes de la purificación, la columna se lavó abundantemente con NaCl 5 M y se dejó reposar en una solución de NaCl 5 M durante 24 horas antes del inicio del proceso de purificación. Después, la columna se cargó con dos volúmenes de columna de Na₂HPO₄ 4,7 mM, NaCl 1 M pH 7,5 y se equilibró con tres volúmenes de columna de Na₂HPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5, a un caudal de 50 mL/min.

[0113] Para cada una de las tres purificaciones, la recolección tratada con enzima Benzonase® se aplicó en una columna de una sola inyección, 25% volumen de la columna, a 30 cm/h. La columna se eluyó usando Na₂HPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5, tampón. La absorbancia del eluato se controló continuamente usando tres longitudes de onda (280/215/254 nm) y también se midió la conductividad de forma continua. Las fracciones eluidas de cada etapa de la columna de cromatografía Sepharose 6 FF se recogieron en volúmenes de 150-200 ml. Las fracciones seleccionadas de los tres experimentos se analizaron mediante RT-qPCR en tiempo real (ver Ejemplo 3) y se agruparon en base al número de copias de PVS-RIPO ($>1 \times 10^7$ copias/mL) del análisis de RT-qPCR en tiempo real. A continuación, el material reunido se purificó en la segunda etapa de cromatografía.

Cromatografía de intercambio aniónico

[0114] Una columna XK de 2,6 cm (d.i.) se rellenó con 53 ml de resina Super Q 650M (Toyopearl®, Tosoh Bioscience, Tessenderlo, Bélgica) a una altura de lecho final de 10 cm. La columna empaquetada se desinfectó con

NaOH 0,5 N y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. La columna empaquetada se lavó abundantemente con agua para eliminar el NaOH, luego la columna se lavó abundantemente con NaCl 5 M y se dejó reposar en una solución de NaCl 5 M durante 24 horas.

[0115] La columna se carga luego con Na₂HPO₄ 4,7 mM, NaCl 1 M, pH 7,5, y se equilibró con Na₂HPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5, a un caudal de 10 mL/min. Para cada una de las tres purificaciones, las fracciones combinadas de Sepharose 6 FF se aplicaron en una única inyección de columna. La columna se eluyó usando tampón de Na₂HPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5. La absorbancia del eluato se controló continuamente usando tres longitudes de onda (280/215/254 nm) y la conductividad también se controló continuamente. El pico principal recogido fue el pico de flujo continuo; los contaminantes unidos a la columna. Después de la recogida del pico principal, la columna se rayó usando Na₂HPO₄ 4,7 mM, NaCl 1 M pH 7,5 y el pico de tira se recogió en un recipiente secundario y, en un caso, se analizó mediante SDS-PAGE.

Concentración/diafiltración

[0116] El pico de flujo recogido después de la columna Super Q 650M luego se concentró a aproximadamente 50 ml y se diafiltró con 500 ml de Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. En cada etapa de concentración, los filtros de filtración de flujo tangencial (TFF) se lavaron con 2 x 25 ml de Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. El permeado se recogió y, en un caso, se analizó mediante SDS-PAGE. Los enjuagues y PVS-RIPO purificado concentrado se combinaron y se añadió 20% de albúmina de suero humano (HSA) (Baxter Pharmaceuticals, Deerfield, IL) a PVS-RIPO purificado a una formulación final de Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, 0,2% de HSA.

Agrupamiento y viales

[0117] Los tres lotes de PVS-RIPO definitiva formulados se agruparon y filtraron de forma estéril usando un filtro de 0,2 mm Millipak® 20. A continuación, se dispensó el material filtrado estéril en viales de vidrio de 3 ml a un volumen de 0,5 ml. Los viales se almacenaron a -70°C.

EJEMPLO 3

Análisis de PVS-RIPO purificado

[0118] Las fracciones seleccionadas de filtración en gel y cromatografía de pasos se ensayaron en el ensayo de placas (NIH, National Cancer Institute-Frederick, Biopharmaceutical Development Program (BDP) Standard Operating Procedure (SOP) 22163 Plaque Assay for Poliovirus). Se realizó TCID₅₀ (ensayo BDP SOP 22165 TCID₅₀ para poliovirus usando células Hep-2C) al final de cada una de las tres pruebas de purificación en el material a granel final antes de la combinación. Las fracciones de la cromatografía de flujo rápido en Sepharose 6 se ensayaron mediante qPCR en tiempo real (métodos de PCR cuantitativa (qPCR) de BDP SOP 22195 para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos) para controlar PVS-RIPO.

[0119] Las fracciones de Sepharose 6 FF se ensayaron para el ARN viral total PVS-RIPO utilizando un amplicón basado en TaqMan® RT-qPCR (Applied Biosystems® Inc., Foster City, CA) dirigido a la región HRV-2 IRES en PVS-RIPO. Las muestras de fracciones se extrajeron utilizando un kit de mini-preparación de ARN viral Qiagen® (Valencia, CAQ) antes de la amplificación RT-qPCR en tiempo real. Los cebadores TaqMan® y una sonda marcada con colorante fluorescente dual se diseñaron con el software ABI Primer Express (Applied Biosystems Inc.). El amplicón HRV-2 IRES (PVS1) de 71 pb consistía en un cebador directo: 5'-(AAC CCA ATG TGT ATC TAG TCG TAA TGA) (SEQ ID NO: 1); cebador inverso: 5'-(TGA AAC ACG GAC ACC CAA AG) (SEQ ID NO: 2); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(CAA TTG CGG GAT GGG ACC AAC T) -[TAMRA] (SEQ ID NO: 3). Los cebadores y las sondas se diluyeron a 10 y 5 pmol/μl, respectivamente, con agua libre de nucleasas (NFW). La reacción consistió en 25 μl TaqMan® 1-step RT-PCR 2X Master Mix con colorante ROX, 1 μl de inhibidor de RNasa, 1 μl de NFW, 1 μl de cebador directo, 1 μl de cebador inverso, 1 μl de sonda TaqMan® y 20 μl de muestra para una 50 μl de volumen de reacción final. (La mezcla maestra de RT-PCR 2X de 1 paso con colorante ROX "está disponible comercialmente en Applied Biosystems Inc.) Las mezclas de reacción se cargaron en una placa de 96 pocillos, se cubrieron con película óptica y se amplificaron con un sistema de detección de secuencia de 96 pocillos ABI modelo 7900HT (Applied Biosystems Inc.) utilizando un perfil de qPCR de 5 pasos (2:00 min, 50,0°C; 45 min a 60,0°C (paso RT); 5:00 min, 95,0°C; 45 ciclos de 20 s, 94,0°C; 1:00 min, 62,0°C) Se hicieron curvas estándar de ADNc de amplicón para cuantificación a partir de ADN plasmídico PVS-RIPO y se diluyeron en serie 10 veces en NFW de 1 ng a 1 fg por reacción. En cada ensayo se emplearon controles de inhibición de PCR, extracción, tampón/NTC y transcripción inversa.

[0120] Los productos de purificaciones de cada una de las tres carreras de purificación demostraron resultados consistentes. La Tabla 3 muestra los rendimientos de la purificación. El rendimiento total de PVS-RIPO fue del 60% o superior. La variabilidad de recuperación detectada probablemente se debió en parte a la variación del ensayo de placa. En consecuencia, en las etapas críticas del proceso se analizaron muestras mediante un ensayo de dilución de punto final. Los resultados de la masa purificada formulada final de este ensayo fueron 5,83 x 10¹¹, 3,77 x 10¹¹ y 2,98 x 10¹¹ TCID₅₀, respectivamente. Estos resultados muestran rendimiento y concentración constantes en las tres purificaciones.

[0121] La comparación de los perfiles cromatográficos de la columna de Sepharose FF 6 y la columna de Super Q 650M de las tres carreras de purificación mostraron consistencia de purificación en dos etapas de cromatografía de intercambio de filtración en gel y de aniones. Los cromatogramas de Sepharose 6FF contenían dos picos definidos. El análisis de fracciones por RT-qPCR en tiempo real indicó que el pico principal de PVS-RIPO estaba ubicado dentro del pequeño pico inicial, como se ilustra en la FIG. 6. El pico grande inmediatamente siguiente parecía ser sal residual. Cuando se monitorizó específicamente a una longitud de onda de 254 nm, una superposición comparativa del cromatograma monitorizado ópticamente y los resultados de RT-qPCR en tiempo real mostraron que algunas de las fracciones que contenían PVS-RIPO no aparecían dentro del pico detectado ópticamente. Por lo tanto, los resultados de RT-qPCR en tiempo real fueron críticos para determinar qué fracciones contenían PVS-RIPO (se empleó el límite de $>10^7$ copias/mL) y deberían agruparse para su procesamiento posterior. Los cromatogramas SuperQ 650M mostraron un gran pico de flujo continuo. En el paso de purificación de SuperQ 650M, algunos contaminantes extraños en un proceso de flujo continuo. Inmediatamente después de la recogida del pico principal, apareció un pico grande cuando la columna se depuró con Na_2HPO_4 4,7 Mm, tampón NaCl 1 M pH 7,5. En un esfuerzo por confirmar que el material PVS-RIPO no se perdió durante todo el proceso, se realizó un análisis SDS-PAGE en una muestra recolectada de este pico, así como en una muestra del permeado del paso de concentración. Ambos ensayos indicaron que PVS-RIPO no estaba presente en ninguna de las muestras.

[0122] Durante el proceso de concentración/diafiltración final, la aparición del virus cambiado de translúcido a opalescente, ya que se hizo más concentrada. Las tres muestras finales concentradas exhibieron el mismo aspecto. Cuando se agruparon y filtraron, el aspecto cambió de opalescente a un producto transparente/translúcido. El TCID_{50} 1,4 X de 10^{12} antes de la filtración y 2,4 X 10^{12} después de la filtración indicó que no hubo pérdida de producto del proceso de filtración. Se determinó que la concentración final del producto PVS-RIPO antes de dividir en porciones en los viales era de $6,09 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$.

TABLA 3. Resumen de los resultados de la purificación

Fábrica de células 1X 10 niveles, 750 mL por fábrica de células L1308002B Procesada inmediatamente después de la cosecha					
Pasos de purificación	Título (Ufp/mL)	Volumen (mL)	Total de Ufp	% recuperación de pasos	% recuperación general
Cosecha Benzonase®	4×10^8	728	$2,912 \times 10^{11}$		
Pico principal de Sepharose 6FF	$1,1 \times 10^8$	1565	$1,72 \times 10^{11}$	59%	59%
Pico principal de Sepharose Q650M	8×10^7	2005	$1,6 \times 10^{11}$	93%	55%
Formulado con 0,2% de albúmina de suero humano (HSA) - masa final purificada	$1,4 \times 10^9$ (Ufp/mL) $4,7 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$	124	$1,74 \times 10^{11}$ Ufp $5,83 \times 10^{11} \text{ TCID}_{50}$	109%	60%
Fábrica celular de 1 X 10 niveles, 750 ml por fábrica celular L1308002C procesada después del almacenamiento a - 70°C					
Cosecha Benzonase®	$1,0 \times 10^8$	734	$7,34 \times 10^{10}$		
Pico principal de Sepharose 6FF	$4,17 \times 10^8$	1762	$7,35 \times 10^{10}$	100%	100%
Pico principal Q650M	$5,3 \times 10^7$	2075	$1,075 \times 10^{11}$	146%	146%
Formulado con 0,2% de HSA	$1,4 \times 10^9$ (Ufp/mL) $2,8 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$	135	$1,89 \times 10^{11}$ UFP $3,77 \times 10^{11} \text{ TCID}_{50}$	56%	83%
Fábrica celular de 1 a 10 niveles, 750 ml por fábrica de células L1308002D Procesada después del almacenamiento a - 70°C					
Cosecha Benzonase®	$2,96 \times 10^8$	762734	$7,25 \times 10^{11}$		
Pico principal de Sepharose 6FF	$1,22 \times 10^8$	1957	$2,39 \times 10^{11}$	106%	106%
Pico principal de Sepharose Q650M	$7,17 \times 10^7$	2568	$1,84 \times 10^{11}$	77%	82%
Formulado con 0,2% de HSA	$1,12 \times 10^9$ (ufp/mL) $2,35 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$	127	$1,42 \times 10^{11}$ Ufp $2,98 \times 10^{11} \text{ TCID}_{50}$	56%	83%

(Continuación)

Tres lotes de purificación combinados Lote N° L1310001					
	Título (Ufp/ mL)	Volu men (mL)	Total de Ufp	Título (TCID ₅₀ / mL)	TCID ₅₀ total
Granel purificado	1,92x10 ⁹	385,0	7,40 x 10 ¹¹	3,62 x 10 ⁹	1,39 x 10 ¹²
Granel filtrado purificado	1,42x10 ⁹	396,5	5,63 x 10 ¹¹	6,09 x 10 ⁹	2,41 x 10 ¹²

EJEMPLO 4**Purificación de una composición de vacuna**

[0123] La purificación de virus herpes simplex (HSV-1) para el uso clínico utiliza tratamiento con enzima Benzonase® seguido por cromatografía de Q-Sepharose XL y Sepharose 4FF. La filtración estéril no se emplea debido al tamaño de la cápside del HSV. Los problemas son los mismos que con PVS-RIPO en el sentido de que la ubicación de la fracción viral frente al ADN/ARN o las proteínas de la célula huésped no es evidente de inmediato mediante las mediciones de las columnas A280 o A260. Por tanto, la qPCR se puede utilizar como se describe en el presente documento para ayudar en la identificación de fracciones que contienen HSV-1. Como alternativa a la RT-qPCR en tiempo real, se puede utilizar un enfoque de resonancia de plasmina de superficie (BIAcore) o interferometría de superficie (Octet) para cuantificar las densidades del epítipo (unión) de la cápside de HSV-1 en el chip BIAcore o el sensor Octet. De esta manera se identifica de forma única la ubicación y las cantidades del virus en las fracciones de columna.

EJEMPLO 5**Química, fabricación, e información de control para quimeras de Poliovirus oncolíticas no patógenas (PVS-RIPO) Producto en vial final Lote L0904010**

[0124] Este ejemplo describe métodos utilizados para muchos productos PVS-RIPO L0904010 para uso en terapia glioblastoma. Se proporciona un resumen en la FIG. 7. Brevemente, el ADN del plásmido PVS-RIPO purificado, Lote L0401014, se transcribió para producir ARN PVS-RIPO. A continuación, se sometió a electroporación el ARN de PVS-RIPO en células Vero calificadas y se expandió para producir la semilla viral inicial, Lote L0402026 (P0). El Lote de semilla viral inicial L0402026 se expandió en células Vero calificadas para producir el Lote de semilla viral maestra L0403006 (P1). El Lote de semillas virales maestras L0403006 se expandió y purificó para producir la masa filtrada purificada Lote L0904009 (P2). La masa filtrada purificada Lote L0904009 se llenó para producir el Lote L0904010 de FVP. El virus purificado concentrado resultante se formuló en fosfato de sodio 50 mM en cloruro de sodio al 0,9%, pH 7,4 + albúmina de suero humano al 0,2%, y se esterilizó por filtración.

[0125] La secuenciación de longitud completa se realizó para secuencia de ADN de plásmido PVSRIPO-kan/pUC19 (Lote L0401014). El Lote L0401014 se produjo y purificó según las Buenas Prácticas de Fabricación (CGMP) actuales y se utilizó posteriormente para producir el Lote de semilla de virus maestro L0403006 y, posteriormente, la masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L0904009 y el Lote de producto en vial final L0904010. Se encontró que la secuencia era 100% homóloga a la secuencia de referencia del plásmido PVS-RIPO Lote L0305007. Una búsqueda BLASTn realizada en el ADN plasmídico indicó que no estaban presentes secuencias oncogénicas, de toxinas o virales inesperadas.

[0126] La secuenciación de la secuencia del genoma PVS-RIPO también se realizó utilizando el material de semilla de virus maestro Lote L0403006, la masa purificada estéril Lote L0904009, y producto en vial final Lote L0904010 y confirmó 100% de homología con la secuencia de referencia PVS-RIPO Lote L0401014.

Materiales

[0127] Las materias primas de origen animal utilizadas en la fabricación de PVS-RIPO incluyen Benzonase®, suero bovino fetal (FBS), albúmina de suero humano, y la tripsina-EDTA. Los fabricantes de materias primas proporcionaron documentación que indica que:

- (1) La preparación enzimática Benzonase® se produjo de manera recombinante mediante fermentación microbiana utilizando casaminoácidos de leche bovina en el medio de crecimiento de fermentación. La leche proviene de países en los que no se han registrado casos de EEB en animales criados localmente desde 1990 y se considera apta para el consumo humano.
- (2) El FBS se fabricó a partir de sangre fetal bovina recolectada en mataderos inspeccionados por el USDA ubicados en los Estados Unidos y resultó negativo para los virus bovinos analizados.
- (3) La HSA era de Baxter Healthcare Corporation, una instalación autorizada por la FDA de EE. UU. Para

fabricar y preparar derivados del plasma para la venta para su uso en humanos. El plasma se recolectó en los EE. UU. Exclusivamente de donantes estadounidenses y de acuerdo con las regulaciones aplicables de la FDA de EE. UU.

(4) La tripsina era de origen porcino y de Estados Unidos/Canadá. La tripsina cruda se probó y resultó negativa para parvovirus porcino y se irradió antes de la formulación.

Construcciones genéticas

a. Plásmido de PVS-RIPO

[0128] El ADN PVS-RIPO recombinante (7,7 kb) se clonó en un vector pUC19 modificado (que lleva el gen de resistencia de kanamicina en lugar del gen de resistencia a ampicilina), y después transformado en las células *E. coli* competentes DH5a para amplificar el ADN plásmido. El mapa del plásmido PVS-RIPO-kan/pUC 19 se muestra en la FIG. 8.

b. Genoma de virus PVS-RIPO

[0129] El genoma del virus PVS-RIPO consiste en una región 5' no traducida (5'-NTR), un bastidor PVS-RIPO de lectura abierto (ORF), y una región 3' no traducida (3'-NTR). El 5'-NTR contiene un sitio de entrada ribosómico interno de rinovirus humano de tipo 2 (HRV-IRES). El marco de lectura abierto PVS-RIPO codifica una sola proteína, que se procesa proteolíticamente en la proteína estructural del virus (P1) y las proteínas no estructurales (P2 y P3). P1, P2 y P3 se seguirán procesando. El genoma de PVS-RIPO es el mismo que el de la cepa Sabin de poliovirus de tipo 1 atenuado, excepto por la región HRV-IRES. El genotipo de PVS-RIPO es 5'- hoja de trébol [PV1 (M); N° de acceso a Genbank® NC_002058; nt 1-109]- sitio de escisión para la endonucleasa de restricción EcoRI - IRES [HRV2; N° de acceso a Genbank® X02316; nt 105-610]- marco de lectura abierto [PV1 (S); Número de acceso a Genbank® V01150; nt 743-7369; nt 748 (t a a)]- 3'UTR [PV1 (S); nt 7370-7441]-poli (A).

Producción de ADN de plásmido PVS-RIPO

[0130] El proceso de producción de ADN plasmídico de Lote L0401014 PVS-RIPO se ilustra en la FIG. 9.

a. Descripción y prueba del sistema de célula huésped

[0131] El sistema de célula huésped, *E. coli* DH5a, se obtuvo de Invitrogen y luego cualificado y ampliarse a BDP para producir el banco de células maestro *E. coli* DH5a (MCB) Lote L0301014, y posteriormente, el banco de células de trabajo *E. coli* DH5α (WCB) Lote L0303011.

[0132] El *E. coli* DH5 MCB Lote L0301014 fue producido por la expansión de un vial (aproximadamente 1 ml) de Invitrogen *E. coli* DH5a Lote 1159251 en tres matraces de 500 ml conteniendo cada uno 150 ml de medio de cultivo preparado estéril (sodio cloruro de 10 g/mL, soja de 10 g/mL y extracto de levadura de 5 g/mL). El vial congelado se descongeló en una incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante cinco minutos. El medio de cultivo inoculado se incubó a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y 150 ± 10 rpm durante aproximadamente 18 horas. Se combinó una solución de glicerol con el contenido del matraz 1 (DO600 = 4,31) hasta una concentración final de glicerol del 20%. La suspensión de células se viajó a $1,0 \pm 0,2$ ml/vial, lo que produjo 144 viales llenos. Los viales llenos se congelaron a $\leq -70^\circ\text{C}$ usando un congelador de velocidad controlada y se colocaron en almacenamiento controlado a $\leq -70^\circ\text{C}$. Las especificaciones y los resultados de la prueba de liberación para *E. coli* DH5 α MCB Lote L0301014 se proporcionan en el Certificado de Análisis en la FIG. 10.

[0133] El *E. coli* DH5 WCB Lote L0303011 fue producido por la expansión de dos viales (un total aproximado en los dos viales = 2 ml) de *E. coli* DH5a MCB Lote L0301014 en tres matraces de siembra de primera etapa de 125 ml (volumen de inóculo de aproximadamente 400 mL) cada uno con 40 mL de medio de cultivo preparado estéril (cloruro de sodio 10 g/mL, soja 10 g/mL, extracto de levadura 5 g/mL y sulfato de magnesio heptahidratado 5 g/mL) y luego en dos de dos litros de segunda etapa frascos de semillas (volumen de inóculo de aproximadamente 4 ml), cada uno de los cuales contiene 390 ml del mismo medio de cultivo estéril preparado. Los viales congelados se descongelaron en una incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante cinco minutos. Los cultivos inoculados se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y a un ajuste de velocidad de 235 rpm. Los matraces de semillas de la primera etapa se incubaron durante la noche (durante aproximadamente 16 horas) a una DO600 = 2,5, y los matraces de semillas de la segunda etapa se incubaron aproximadamente 2,6 horas a una DO600 = 0,361. El contenido del matraz de siembra 1 de la segunda etapa se centrifugó en los siguientes ajustes durante siete minutos: $1600 \times g$ y 4°C . El sedimento celular se resuspendió en una solución de cloruro cálcico 100 mM/glicerol al 15% v/v y se centrifugó en los siguientes ajustes durante cinco minutos: $1100 \times g$ y 4°C . El sedimento de células resultante se resuspendió en una solución de cloruro cálcico 100 mM/glicerol al 15% v/v (para una concentración final de glicerol del 15%) y se viajó a un volumen de 0,15 ml/vial, produciendo 95 viales llenos. Los viales llenos se congelaron en un baño de hielo seco/etanol y se colocaron en almacenamiento controlado a $\leq -70^\circ\text{C}$. Las especificaciones y los resultados de la prueba de liberación para *E. coli* DH5α WCB Lote L0303011 se proporcionan en el Certificado de Análisis en la FIG. 11.

b. Purificación de ADN de plásmido original PVS-RIPO para producción de ADN plasmídico purificado PVS-RIPO Lote

L021217

[0134] El ADN plasmídico PVS-RIPO original fue proporcionado por la Escuela de Medicina de la Universidad de Duke. Este material se utilizó para generar ADN plasmídico adicional que se purificó. Se transformaron diez microlitros (µL) del ADN del plásmido PVS-RIPO original en células competentes DH5α de *E. coli* (Nº de catálogo de Invitrogen 18263-012). El ADN plasmídico extraído de los dieciocho transformantes resultantes usando los kits Plasmid Mini y Maxi (Nºs de catálogo de Qiagen 27104 y 12165 respectivamente) y el ADN plasmídico PVS-RIPO original recibido de la Escuela de Medicina de la Universidad de Duke se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y digestión con enzimas de restricción. Los resultados de los análisis demostraron que se observaron múltiples bandas que variaban de 2,5 kb a 10,3 kb. Se seleccionaron diez de los transformantes para una investigación adicional. Basándose en el análisis de digestión con enzimas de restricción, se secuenció el ADN de uno de los transformantes identificados como S-1 y se encontró que tenía una inserción de 1,3 kilobase (Kb) que se determinó mediante BLASTn que era el minitransposón bacteriano IS10R. Otras colonias aparecieron como un vector vacío (aproximadamente 2,5 kb), un vector dímero (aproximadamente 5,0 kb) o ADN plasmídico PVS-RIPO (aproximadamente 10 kb).

[0135] La electroforesis de gel de agarosa se usó para analizar más a fondo el patrón de bandas del ADN plasmídico PVS-RIPO original recibido de la Escuela Médica de la Universidad de Duke. Se escindieron ocho bandas del gel, luego se purificaron usando el kit de extracción de gel MiniElute (Qiagen Cat Nº 27104) y se almacenaron a -20°C. El ADN purificado de cada una de las ocho bandas se transformó en células competentes DH5α, y los transformantes seleccionados se cultivaron a 37°C durante la noche en medio líquido Soy-LB suplementado con 50 µg/µL de kanamicina. El ADN, purificado utilizando kit QIAprep spin Mini (Qiagen Cat Nº 27106), se analizó por electroforesis en gel de agarosa y la enzima de restricción digestión. Dos clones, identificados como nº 6-3 (de la transformación de la banda nº 6) y nº 5-3 (de la transformación de la banda nº 5), parecían poseer el tamaño de plásmido correcto y se seleccionaron para una investigación adicional.

[0136] Los dos clones, Nº 6-3 y Nº 5-3, fueron cada uno expandidos en medio de soja-LB que contiene 50 µg/µL de kanamicina a 37°C y 120 revoluciones por minuto (RPM), y las células recogidas. Se utilizó QIAfilter plasmid Mega Kit (Qiagen Cat Nº 12281) para la purificación del ADN. El análisis de digestión de restricción indicó que el ADN plasmídico purificado de cada uno de los dos clones tenía el patrón de restricción correcto y el inserto de 1,3 Kb estaba ausente. Al Lote expandido del clon nº 6-3 se le asignó el Nº de Lote L021217 y se secuenció el ADN del Lote L021217 purificado. Se encontró que la secuencia resultante era 100% homóloga a la secuencia correcta esperada. El Lote L021217 se congeló a ≤ -70°C en alícuotas de 1 ml.

c. Banco de adhesión ADN plasmídico PVS-RIPO purificado Lote L0305007 Preparación y ensayo

[0137] El banco de adhesión purificado Lote L0305007 de ADN plasmídico PVS-RIPO se produce a partir de ADN plasmídico PVS-RIPO purificado Lote L021217. Se retiraron dos viales de ADN plasmídico purificado Lote L021217 y seis viales del banco de células de trabajo competente DH5α Lote L030301 del almacenamiento controlado a ≤ -70°C y se descongelaron en paquetes fríos (0 a -20°C). Se combinó el contenido de los seis viales del Lote L030301 del banco de células de trabajo competentes DH5α descongelados y se dividieron en alícuotas de 100 ml en cada uno de los tres tubos refrigerados. El Lote de ADN purificado L021017 se diluyó 5 veces en TrisHC1 10 mM sin endotoxina, EDTA 1 mM, pH 8,0. Se añadió un microlitro del Lote de ADN diluido L021217 a dos de los tubos enfriados y se utilizó el tercer tubo como control negativo. Los tres tubos se sellaron y se incubaron durante aproximadamente 30 minutos en paquetes fríos. A continuación, los tres tubos se sometieron a choque térmico colocándolos en un baño de agua a 40 ± 2°C durante aproximadamente 42 segundos. Los tubos se dejaron enfriar en paquetes fríos durante aproximadamente 4 minutos. Trabajando en una cabina de seguridad biológica (BSC), se agregaron aproximadamente 900 µL de medio Soytone-LB (consulte la Tabla 4 para la formulación del medio Soy-LB) a cada uno de los tres tubos y los tubos se incubaron a una temperatura de 37°C y 120 RPM durante aproximadamente una hora. Se distribuyeron uniformemente alícuotas (100, 200 y 400 µL) de cada uno de los dos tubos que contenían las soluciones de preparación de plásmido en una placa de agar Soytone-LB + 50 µg/mL Kanamicina (consulte la Tabla 5 para obtener información sobre la formulación de la placa de agar Soy-LB) para un total de seis platos. El contenido del tubo de control negativo (200 µL) se distribuyó uniformemente en una placa de agar Soytone-LB + 50 µg/mL de Kanamicina. Los siete placas se incubaron durante la noche a un entorno de 37°C.

Tabla 4: Formulación de medio Soja-LB

Componentes	Fabricante y Nº de catálogo	Cantidad por litro
Soytone	Difco SE50MAF	10,0 g
Cloruro de sodio	JT Baker 3629-07	10,0 g
Extracto de levadura	Difco 0127-08	5,0 g

Tabla 5: Formulación en placa de agar Soja-LB

Componentes	Fabricante y N° de catálogo	Cantidad por litro
Soytone	Difco SE50MAF	10,0 g
Cloruro de sodio	JT Baker 3629-07	10,0 g
Extracto de levadura	Difco 0127-08	5,0 g
Agar	Difco 214530	15,0 g

[0138] Seis cultivos iniciadores se prepararon utilizando 250 ml de matraces de agitación cada uno conteniendo 50 ± 1 ml de Soytone estéril que contiene medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina. Las placas de agar Soytone-LB + 50 $\mu\text{g/mL}$ de Kanamicina inoculadas se examinaron para determinar el crecimiento de colonias y cada uno de los seis cultivos iniciadores se inoculó con una única colonia. Los matraces inoculados se incubaron a una temperatura de 37°C y 120 RPM durante la noche.

[0139] Se extrajo una muestra de un mililitro de cada matraz de cultivo iniciador para el análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y los matraces de cultivo se almacenaron a 2 - 8°C. Se seleccionó un matraz para proporcionar un inóculo de aproximadamente 3 ml (0,5%) en cada uno de los cuatro matraces de cultivo de 2 L (que contienen 600 mL de medio de soja-LB suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina). Los matraces inoculados se incubaron a una temperatura de 37°C y 120 RPM durante la noche.

[0140] Los cultivos se recogieron por centrifugación a un valor de 4°C, 6.000 x g durante aproximadamente 15 minutos. El sobrenadante se decantó como residuo y se recogió un total de 16,1 gramos de pasta celular. La pasta celular se dividió en cuatro sub-lotes y se purificó utilizando el kit Qiagen EndoFree Plasmid Giga (Qiagen Cat. N° 12391). Después de la purificación, cada uno de los cuatro sub-lotes se almacenó a 2-8°C. Los cuatro sub-lotes se agruparon y diluyeron hasta una concentración final de $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ usando Tris-HCl 10 mM sin endotoxina, EDTA 1 mM, pH 8,0. El ADN plasmídico de PVS-RIPO purificado se introdujo en alícuotas de $1,0 \pm 0,1$ ml en crioviales de 2 ml, se marcaron como Lote L0305007 de ADN plasmídico PVS-RIPO y se almacenaron a $\leq -70^\circ\text{C}$ para su uso posterior en la fabricación. En la Tabla 6 se proporciona un resumen de la prueba para el ADN plasmídico PVS-RIPO Lote L0305007.

Tabla 6: ADN plasmídico PVS-RIPO Lote L0305007 Resumen de la prueba

Prueba	Método	Especificación	Resultados/N° de prueba de control de calidad
Identidad			
Secuencia de ADN	Commonwealth Biotechnologies, Inc.	100% homólogo a la secuencia de referencia PVS-RIPO	100% homólogo al plásmido de referencia PVS-RIPO (Clon N° 6-3) QC-018312
Contenido			
Concentración de ADN por absorbancia a 260 nm	BQC SOP 01114	$\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$ $E_{1 \text{ mg/mL}}^{260 \text{ nm}} = 20$	0,345 $\mu\text{g/mL}$ QC-018311
Pureza			
Relación A260nm/A280nm	BQC SOP 01114	1,75 - 2,00	1,87 QC-018311
Información adicional			
Tamaño total (ADN linealizado)	BQC SOP 00676, 00689, 22120	Resultados del informe, se espera que se ajusten al tamaño aproximado predicho a partir del mapa de plásmidos después de la digestión de restricción de sitio único con Sal I, lineal, 1 fragmento, 9945 pb.	Los patrones de bandas y los pesos moleculares concuerdan con el lote de control (Clon N° 6-3) y los patrones/pesos esperados. Tamaño de banda calculado de Sal I (lineal): 9945 pb QC-018314
Mapa de restricción	BQC SOP 00676, 00689, 22120	Resultados del informe, se espera que se ajusten al patrón de restricción Mun I predicho por la secuencia de nucleótidos (4 bandas, 1537, 2220, 2907 y 3281 pb)	Los patrones de bandas y los pesos moleculares concuerdan con el lote de control (Clon N° 6-3) y los patrones/pesos esperados. Tamaño de banda calculados de Mun I: 1537, 2220, 2907, 3281bp QC-018314

d. Fermentación y purificación de ADN para la producción de ADN plasmídico de PVS-RIPO purificado Lote L0401014

[0141] ADN plasmídico de PVS-RIPO purificado Lote L0305007 y un banco de células de trabajo competente GMP DH5 alfa Lote L0303011 fueron utilizados para la transformación de ADN para producir ADN plasmídico de PVS-RIPO purificado Lote L0401014. Las células competentes (Lote L0303011 del banco de células de trabajo competente DH5α) se descongelaron, se mezclaron suavemente y se transfirieron a tubos de microcentrifuga de polipropileno refrigerados (sobre hielo húmedo) en alícuotas de 100 µL.

[0142] El ADN purificado Lote L0305007 se diluyó 10 veces en endotoxina libre de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 1 mM. Se añadió un microlitro del ADN diluido a los tubos de microcentrifuga que contenían las alícuotas de células competentes. El contenido de los tubos de microcentrifuga se mezcló suavemente. Las suspensiones de células competentes/ADN purificado se incubaron en hielo durante 30 ± 1 minutos, seguido de una etapa de choque térmico durante 45 ± 2 segundos en un baño de agua a $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Las suspensiones de células competentes/ADN purificado se colocaron en hielo húmedo durante dos minutos. Se añadió medio Soy-LB a temperatura ambiente (0,9 mL) a cada tubo de microcentrifuga. La formulación del medio Soy-LB se describe en la Tabla 4. Las suspensiones se agitaron a una velocidad de 120 RPM a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 61 minutos y se esparcieron, en alícuotas de 100 µL, 200 µL y 400 µL, en placas de agar selectivas (placas de agar Soy-LB) preparadas con 50 µg/mL de kanamicina. El medio de agar selectivo se describe en la Tabla 5. Las placas se incubaron durante 20 horas 58 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y se examinaron al día siguiente para determinar el crecimiento de colonias.

[0143] Doce (12) cultivos iniciadores se prepararon utilizando 50 ml de medio de soja-LB que contiene 50 µg/mL de kanamicina en matraces de 250 ml con deflectores. Cada uno de los 12 cultivos iniciadores se inoculó con una única colonia fresca de una placa de agar selectiva. Los 12 cultivos iniciadores se cultivaron durante 22 horas hasta una densidad óptica a una absorbancia de 600 nm (DO600) mayor que o igual a 1. La incubación se llevó a cabo en un agitador/incubador a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ajustado a una velocidad de 120 RPM. Al día siguiente, cada uno de los 12 cultivos iniciadores se analizó mediante digestión de restricción usando *Mun I* y se encontró que las bandas estaban dentro del 10% de los tamaños predichos (informe de prueba QC-020628). Se usó uno de los cultivos iniciadores para proporcionar un inóculo de 3 ml (0,5%) en cada uno de los cuatro matraces de agitación de 2 litros que contenían 600 ml de medio Soy-LB enriquecido con 50 µg/mL de kanamicina. Los matraces de agitación de 2 litros inoculados se cultivaron en un agitador/incubador durante 18,5 horas. La incubación se realizó a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ a una velocidad de 120 RPM. Los cultivos se probaron mediante digestión por restricción y se encontró que eran concordantes con los controles y los patrones esperados. Los cultivos se recolectaron por centrifugación a 4°C y $6.000 \times g$ durante 15 minutos. Las células se recogieron, se dividieron en cuatro sub-lotes y se purificaron usando el kit Qiagen EndoFree Plasmid Giga (Qiagen Cat. Nº 12391). Cada uno de los cuatro sub-lotes se probó mediante digestión de restricción y se encontró que era concordante con los controles y los patrones esperados. Los cuatro sub-lotes se agruparon y diluyeron hasta una concentración final de $0,3 \pm 0,2$ µg/mL usando Tris-HCl 10 mM sin endotoxina, EDTA 1 mM, pH 8,0. El ADN plasmídico de PVS-RIPO purificado se introdujo en alícuotas de $1,0 \pm 0,1$ ml en crioviales de 2 ml, se marcaron como Lote de ADN plasmídico PVS-RIPO L0401014 y se almacenaron a $\leq -70^\circ\text{C}$ para su uso posterior en la fabricación.

[0144] Las pruebas, métodos, especificaciones y resultados llevados a cabo para calificar ADN plasmídico de PVS-RIPO Lote L0401014 se muestran en el Certificado de Análisis (FIG. 12).

Producción de semilla de virus inicial de PVS-RIPO Lote L0402026 (P0)

[0145] El proceso de fabricación para producir la semilla virus inicial de PVS-RIPO Lote L0402026 (P0), realizado en la instalación de producción Virus BDP, se resume en la FIG. 13 y se describe a continuación.

a. Descripción y prueba del sistema de células huésped

[0146] Vero MCB Lote 2003-0049 se generó usando células Vero (World Health Organization [WHO] Seed, 134^º Pasaje, octubre de 1987). Las células Vero se recolectaron mediante tripsinización. Después de la centrifugación, las células Vero se resuspendieron en una solución crioprotectora de suero bovino fetal (FBS) al 90% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL. Un resumen de las pruebas de liberación, métodos, especificaciones y resultados del Vero MCB Lote 2003-0049 se incluye en el Certificado de Análisis que se muestra en la FIG. 14.

[0147] El Vero WCB Lote 217002-2 fue producido por la expansión del Vero MCB Lote 2003-0049. Se utilizó un vial de Vero MCB Lote 2003-0049 para iniciar Vero WCB. Después de cuatro pases en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), glucosa alta con L-glutamina, con Hepes que contiene FBS, la WCB se viajó a un volumen de 1 ml/vial y una concentración de $4,7 \times 10^6$ células/mL. Los viales etiquetados como Vero Master WCB Lote 217002-2 se colocaron en nitrógeno líquido en fase de vapor. Un resumen de las pruebas de liberación, métodos, especificaciones y resultados del Vero WCB Lote 217002-2 se incluye en la FIG. 15. Una de las pruebas de liberación fue una prueba de tumorigenicidad realizada en banco de células de trabajo Vero Lote 217002-2 utilizando células que habían sido pasadas cuatro veces. Los resultados de la prueba demostraron que Vero WCB no era tumorigénico en estas condiciones. Se utilizó Vero WCB, Lote 217002-2 durante toda la producción del virus PVS-RIPO. El pasaje inicial de

la WCB fue el pasaje 142.

b. Transcripción In Vitro (L0402001) para sintetizar PVS-RIPO ARN

[0148] El ADN plasmídico de PVS-RIPO Lote L0401014 fue utilizado para producir ARN de PVS-RIPO Lote L0402001 por transcripción *in vitro*. Se linealizaron cuarenta (40) µg de ADN de plásmido PVS-RIPO Lote L0401014 mediante digestión con *Sal I*. El ADN linealizado se extrajo con fenol y cloroformo y se realizó una precipitación con etanol a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ durante la noche. El ADN se resuspendió en 40 µL de agua destilada libre de ADNasa/ARNasa. Se analizó una muestra del ADN plasmídico antes de la digestión/purificación y después de la digestión/purificación mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar el tamaño y la recuperación del producto.

[0149] Se usaron veinte (20) µg del ADN linealizado como plantillar para sintetizar el ARN de PVS-RIPO en dos reacciones idénticas. Cada reacción se realizó utilizando 10 µg de ADN linealizado. Para configurar las reacciones, se agregaron 10 µg de ADN plasmídico linealizado a la mezcla de reacción de transcripción *in vitro* (RiboMAX Large Scale RNA Production System, Promega, Cat. Nº P1300) hasta un volumen final de 100 µL. Las reacciones de transcripción se incubaron a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2,5 - 3 horas. Cuando se completaron las reacciones, los tubos de reacción se colocaron a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para su almacenamiento.

[0150] Para comprobar el tamaño del producto y estimar los rendimientos de ARN a partir de las reacciones, las mezclas de reacción se diluyeron 1 a 10 o 1 a 20 usando agua DNasa/RNasa destilada libre y tampón de muestra de RNA. Las mezclas de reacción diluidas se cargaron luego en un gel de agarosa desnaturalizante de ARN [Reliant Gels, 1,25% SeaKem Gold en 1X MOPS Buffer, Lonza (anteriormente conocido como Cambrex) Cat. Nº 54948 junto con el estándar de escalera de ARN (RNA Ladder 0,24 - 9,5 kb, Invitrogen, Cat. Nº 15620-016). Se encontró que los productos de transcripción de ARN *in vitro* observados en el gel de agarosa tenían el tamaño esperado. La concentración estimada de ARN en la mezcla de reacción fue de 6,6 µg/mL.

c. Electroporación para producción de semilla de virus inicial PVS-RIPO (Lote L0402026)

[0151] Se utilizaron células Vero de un banco de células de trabajo cualificado (WCB) Lote 217002-2 en la etapa de electroporación. El Vero WCB se estableció en el BDP y se describe en este documento. Se expandieron dos viales de célula Vero WCB Lote L217002-2 en medio de Eagle modificado de Dulbecco con L-glutamina, sin rojo de fenol (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal al 10% y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante tres pasajes. Las células Vero se tripsinizaron añadiendo tripsina-EDTA (0,05% de tripsina, 0,53 mM de EDTA) e incubando a una temperatura de 37°C y 5% de CO_2 durante 4 a 6 minutos. Las células tripsinizadas se recogieron y centrifugaron a aproximadamente 4°C y 1000 RPM durante 10 minutos. Las células recolectadas se suspendieron en 100 ± 2 ml de PBS (sin calcio ni magnesio). Se utilizó una muestra de la suspensión celular para determinar el recuento celular. Las células restantes se recogieron por centrifugación a un ajuste de 1000 RPM y 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el PBS clarificado y el sedimento celular se resuspendió en PBS reciente hasta una densidad celular calculada final de $1,25 \times 10^7$ células/mL.

[0152] Se combinaron aproximadamente 55 µg de ARN de PVS-RIPO (lote de transcripción *in vitro* L0402001) y $9 \pm 0,2$ ml de las células Vero expandidas y se transfirieron a cubetas en alícuotas de $0,8 \pm 0,01$ ml. El contenido de las cubetas se sometió a dos descargas eléctricas a 0,5 kilovoltios (kv) y 0,25 microFaradios (mF) utilizando una unidad de electroporación Bio-Rad Gene Pulser II. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos, el contenido de la cubeta se transfirió a matraces T75 con medio DMEM/F12 (Invitrogen, Cat. Nº 21041-025). Los matraces T75 se incubaron a una temperatura de 33°C y 5% de CO_2 . Se repitió el mismo proceso para generar un total de veinte matraces T75 de células Vero transfectadas con ARN de PVS-RIPO. Dos matraces de control adicionales contenían solo las células Vero post-electroporación y las células Vero no sometidas a electroporación. Se controló el contenido de los matraces para determinar los efectos citopáticos (CPE) durante el período de incubación. Se observó CPE completo al tercer día de incubación en todos los matraces que contenían células Vero transfectadas con ARN de PVS-RIPO.

[0153] Trabajar en un gabinete de seguridad biológica, los contenidos de los matraces se recogieron y luego se clarificaron por centrifugación para producir el inóculo de virus inicial Lote L0402026 (P0). Después de la centrifugación a una configuración de 2500 RPM durante 32 minutos, se recogieron los sobrenadantes que contenían el virus PVS-RIPO. A continuación, los sobrenadantes se combinaron y se transfirieron a seis botellas de glicol de tereftalato de polietileno (PETG) de 125 ml en alícuotas de 60 ml y a cuatro crioviales de 2 ml en alícuotas de 1 ml. Las muestras se enviaron a Process Analytics (también conocido como control de calidad biofarmacéutico) para realizar pruebas en el proceso. Las seis botellas se etiquetaron como semilla de post-electroporación PVS-RIPO Lote L0402026 y se transfirieron a un almacenamiento a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Producción y prueba de semilla de virus maestra PVS-RIPO Lote L0403006 (P1)

[0154] El proceso de fabricación de semilla de virus maestra PVS-RIPO Lote L0403006 (P1) se resume en la FIG. 16.

a. Expansión de las células Vero

[0155] Dos viales de células Vero (WCB Lote 217002-2) se sembraron en dos matraces de 25 cm² (T25) que contenían DMEM con L-Glutamina, sin rojo fenol (DMEM, Invitrogen Cat. Nº 21063) con 10% FBS (Cat. Nº Hyclone SH30070.03IR) y se incubó en una incubadora de CO₂ a 37°C y 5% de CO₂. Las células Vero se expandieron adicionalmente a cincuenta matraces de 162 cm² (T162) después de pasar las células tres veces. En el tercer día de incubación del tercer pase, se examinó el contenido de los cincuenta matraces T162 bajo un microscopio para determinar el estado de las células. Se seleccionaron cuarenta y tres (43) matraces que eran cultivos puros y al menos 95% confluentes. Se examinaron las células de uno de los matraces T162 seleccionados para determinar el número de células y la viabilidad, y se incubó otro de los matraces seleccionados como matraz de "control de calidad celular". De los 41 matraces T162 seleccionados restantes, un matraz se mantuvo como control negativo después de la inoculación con DMEM: Mezcla de nutrientes F12, Mezcla 1:1 sin rojo fenol (DMEM/F12, Cat. Nº de Invitrogen 21041).

b. La infección y la recolección de semilla de virus maestra PVS-RIPO (L0403006)

[0156] La semilla de post-electroporación de PVS-RIPO Lote L0402026 fue retirada de almacenamiento a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ y se descongelaron a temperatura ambiente. El Lote L0402026 de semillas post-electroporación de PVS-RIPO se diluyó usando medio DMEM/F12 y los cuarenta matraces T162 (que contenían las células Vero expandidas) se infectaron con el Lote L0402026 de semillas post-electroporación de PVS-RIPO a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5. Los matraces inoculados se incubaron a 33°C y CO₂ al 5% después de la adición de medio de cultivo celular DMEM/F12 nuevo.

[0157] Matraces infectados con virus y matraces de control fueron controlados durante la incubación para los atributos como la contaminación visible, la condición de las células, y el por ciento de confluencia. A las 70 horas después de la infección, se terminó la incubación y se examinaron los matraces para determinar atributos tales como contaminación visible, estado celular y porcentaje de confluencia, y luego se transfirieron a una cabina de seguridad biológica (BSC) para su recolección. El contenido de los matraces se transfirió a botellas de centrífuga y se centrifugó a 4°C y 2500 RPM durante 33 minutos para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes que contenían el virus PVS-RIPO se combinaron en una botella giratoria de 850 cm². Los sobrenadantes combinados se transfirieron a dos botellas de PETG de 30 ml y veinticuatro de 125 ml en alícuotas de 20 ± 1 ml y 80 ± 5 ml, respectivamente. Además, se llenaron doce crioviales de 2 ml con alícuotas de $1 \pm 0,2$ ml. El sobrenadante restante (3,8 ml en total) se transfirió a tres crioviales de 2 ml para un total de quince crioviales de 2 ml. Las botellas y viales de PETG se etiquetaron cada uno como semilla de virus maestra PVSRIPO Lote L0403006. Se congelaron once crioviales de 2 ml, veintitrés botellas de PETG de 125 ml y dos botellas de PETG de 30 ml a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se transfirieron a un almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Cuatro de los crioviales de 2 ml se enviaron a Process Analytics (PA)/Control de calidad biofarmacéutico (BQC) para el título (por ufp y TCID₅₀), partículas de virus y pruebas de liberación de secuencias de ADN. El resto de las pruebas de liberación se realizó a medida que se desarrollaron los ensayos apropiados y los procedimientos de manipulación de materiales PVS-RIPO. La botella PETG restante de 125 ml (20 ± 1 ml relleno) se congeló a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

[0158] Los sobrenadantes en el matraz de infección simulada (control negativo), también se recogieron y colocaron en viales. Se fabricaron dos botellas PETG de 30 ml cada una con 20 ± 1 ml del material de control del proceso y cuatro crioviales de 2 ml cada una con $1 \pm 0,2$ ml del material de control del proceso y se etiquetaron como "Control de proceso PVS-RIPO". Las dos botellas PETG de 30 ml se transfirieron a PA/BQC para su análisis. Los cuatro crioviales de 2 ml se congelaron a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ y se colocaron en el almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

[0159] Las pruebas de entregas del inóculo de virus de PVS-RIPO del Lote maestro L0403006 se resume en el Certificado de Análisis incluido en la FIG. 17

c. Ensayo de virus adventicio in vitro

[0160] Las pruebas de virus adventicio in vitro se realizaron en la semilla de virus maestra PVS-RIPO del Lote L0403006. El ensayo se realizó para evaluar la presencia de contaminantes virales adventicios en el artículo de prueba mediante la observación de tres tipos de líneas celulares indicadoras de efectos citopáticos (CPE), hemadsorción (HAD) y hemaglutinación (AH). Las células utilizadas para la detección de agentes adventicios son Vero, MRC-5 y A549. Todos son susceptibles a la infección por PVS-RIPO con el CPE resultante. Por lo tanto, el PVS-RIPO en la muestra de prueba debe neutralizarse para realizar la prueba. Incluimos controles de interferencia en el ensayo y utilizamos Adenovirus 3, Parainfluenza 3 y Herpesvirus. Los virus se diluyeron a 10 ufp y 100 ufp y se sometieron al mismo procedimiento de neutralización que el PVS-RIPO. Se incluyeron controles neutralizados simulados. Todos los virus se detectaron en el mismo período de tiempo y en las mismas concentraciones que en los controles neutralizados simulados. No parecía haber ningún efecto detectable por el anticuerpo o el propio procedimiento de neutralización sobre la detección de estos otros virus modelo.

[0161] Para realizar la prueba, los cultivos de células de tres indicadores utilizados fueron: MRC-5, una célula embrionaria humana masculina normal de cultivo; Vero, una línea renal de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); y A549, un carcinoma de pulmón humano masculino adulto. Estos cultivos de células indicadoras se

inoculacion con la muestra de prueba que había sido neutralizada con antisuero de poliovirus tipo I y se examinaron al menos tres veces por semana durante al menos 28 días. [El procedimiento de neutralización se realizó antes de la inoculación utilizando el siguiente procedimiento: el artículo de prueba se centrifugó a 1400 rpm durante 10 minutos a 2-8°C y luego se mezcló con un volumen igual (3,0 ml) de una dilución 1:2,5 de antisuero de poliovirus tipo I obtenido de la FDA (Evgenia Dragunsky/CBER) e incubado a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante una hora. A continuación, se dosificó cada línea celular con 0,2 mL/pocillo de esta solución y se incubó durante una hora a $36 \pm 2^\circ\text{C}$, después de lo cual se retiró el inóculo y se lavaron las células con 2,0 ml del medio apropiado. Esta solución de lavado se retiró luego y se reemplazó con 2,0 ml de medio fresco y las células se devolvieron a la incubadora a $36 \pm 2^\circ\text{C}$.]

[0162] Los cultivos se examinaron en busca del desarrollo de cualquier cambio en la morfología atribuible a la presencia de agentes virales. Al final del período de incubación, los cultivos se analizaron para determinar la hemaglutinación y la hemadsorción utilizando eritrocitos de pollo, cobaya y humanos. Se utilizó parainfluenza 3 como control positivo en el ensayo. Los virus utilizados para los controles de interferencia fueron Adenovirus 5, Herpesvirus y Parainfluenza 3 neutralizados con antisuero de Poliovirus Tipo I obtenido de la FDA. Se usó DMEM con FBS al 10% como control negativo para las células Vero y MRC-5, y se usó F-12K con FBS al 10% como control negativo para las células A549.

d. Ensayo de virus adventicio in vivo (AVA)

[0163] La semilla de virus maestra PVS-RIPO Lote L0403006 se evaluó en busca de virus adventicio *in vivo* en cobayas (versión Europea modificada), ratones adultos, ratones lactantes, y huevos de gallina embrionados de acuerdo con un procedimiento aprobado. El propósito de este ensayo fue evaluar la muestra de prueba para detectar la presencia de virus que podría haber estado presente en la línea celular pero que no causó ningún efecto discernible en el sistema de cultivo celular. Para completar la prueba AVA *in vivo* en el MVS Lote L0403006, la muestra de prueba se neutralizó para evitar una posible toxicidad no específica en los animales de prueba debido a la alta concentración de muestras de prueba PVS-RIPO utilizadas en el ensayo. La toxicidad inespecífica debida a la carga viral PVS-RIPO podría interferir con la detección de otros agentes adventicios que pudieran estar presentes en la muestra. Para determinar si el anticuerpo podría tener un efecto sobre la detección de otros agentes adventicios, se establecieron controles de interferencia con el anticuerpo en un ensayo in vitro, como se describió anteriormente.

[0164] Los conejillos de Indias son susceptibles a un número de agentes virales, incluyendo paramixovirus (Sendai) y reovirus. Se inoculan cobayas con el artículo de prueba por vía intramuscular e intraperitoneal y se mantienen en prueba durante un mínimo de 28 días. La muestra de prueba se descongeló en un baño de agua a 37°C y luego se mezcló en partes iguales con el anticuerpo neutralizante. La mezcla de artículo de prueba/anticuerpo neutralizante se mantuvo en un baño de agua a 37°C durante una hora con un mezclado suave cada veinte minutos. Se inocularon cinco cobayas adultos con una inyección intramuscular de 0,2 ml y una inyección intraperitoneal de 5,0 ml del artículo de prueba preparado. Se inocularon otros cinco cobayas adultos con una inyección intramuscular de 0,2 ml y una inyección intraperitoneal de 5,0 ml de Medio Esencial Mínimo de Eagles como control negativo. Se observó a cada animal diariamente durante 28 días en busca de morbilidad o mortalidad.

[0165] Los ratones adultos son susceptibles a un número de agentes virales, incluyendo virus coxsackie y miembros del grupo flavivirus (virus de la encefalitis San Luis y virus de la encefalitis japonesa). Los ratones lactantes recién nacidos son susceptibles a una amplia gama de virus que incluyen togavirus, bunyavirus, flavivirus, picornavirus (poliovirus, virus coxsackie grupos A y B, echovirus) y virus del herpes. Los huevos de gallina embrionados se inoculan a través de la alantoides y el saco vitelino. La inoculación por vía alantoidea favorece la replicación de ortomixovirus (virus de la influenza) y paramixovirus (parainfluenza, paperas y sarampión) en las células entodérmicas de la alantoides. La inoculación a través del saco vitelino favorece la propagación de virus del herpes, rickettsias, micoplasmas y bacterias. El subpaso de materiales de ratones lactantes inoculados y huevos embrionados inoculados en nuevos sistemas de prueba sirve para aumentar la sensibilidad de este ensayo, ya que cualquier agente viral presente en el inóculo original se amplificaría en los nuevos sistemas de prueba.

Huevos embrionados

[0166] El artículo de prueba y el anticuerpo neutralizante se descongelaron usando un baño de agua a $37 \pm 2^\circ$. El artículo de prueba y el anticuerpo neutralizante se mezclaron en una proporción de 1:1 y se incubaron durante 60 minutos. Antes de la inoculación, tanto el Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) utilizado para el control negativo como la dilución del anticuerpo del artículo de prueba se filtraron a través de filtros de baja unión a proteínas de acetato de celulosa de 0,45 micrones.

[0167] Seis (6) huevos/vía de inoculación sirvieron como controles de entrega. Estos se examinaron al trasluz cada día laborable para comprobar su viabilidad y se enfriaron al final del período de incubación. Estos huevos no se recolectaron ni examinaron después de haberlos enfriado.

[0168] Prueba alantoidea: la cavidad alantoidea de doce huevos (10 días de edad) se inoculó con 0,5 ml del artículo de prueba preparado. Los huevos se incubaron a $37-38^\circ\text{C}$ durante 3 días. Los embriones se examinaron al trasluz cada día laborable para comprobar su viabilidad. Los embriones que murieron antes del final del período de incubación

se enfriaron y todos los embriones se examinaron al final del período de incubación. Los fluidos alantoideos del pasaje 1 (P1) se recolectaron, agruparon y almacenaron a -60°C o menos hasta que se analizaron para determinar la actividad de hemaglutinación (AH) o hasta que se subpasaron en un segundo conjunto de diez huevos (11 días de edad). Antes de la inoculación en el segundo conjunto de huevos, el material subpasado se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad y se filtró a través de un filtro de baja unión a proteínas de acetato de celulosa de 0,45 micras. El segundo conjunto de huevos se incubó en las mismas condiciones que el primer conjunto. Los fluidos alantoideos del pase 2 (P2) se recolectaron, combinaron y almacenaron a -60°C o menos hasta que se analizaron para determinar la presencia de AH, después de lo cual se examinaron los embriones. Para establecer controles negativos, este procedimiento se ejecutó en paralelo para dos conjuntos adicionales de huevos embrionados utilizando EMEM filtrado de 0,45 micrones como inóculo inicial.

[0169] Prueba de Yolk Sac: El saco vitelino de doce huevos embrionados (6 días de edad) se inoculó con 0,5 ml del artículo de prueba preparado. Los huevos se incubaron a 37-38°C durante 9 días. Los embriones se examinaron al trasluz cada día laborable para comprobar su viabilidad. Los embriones que murieron antes del final del período de incubación se enfriaron y todos los embriones se examinaron al final del período de incubación. Los sacos vitelinos P1 se recolectaron, lavaron y combinaron. Se preparó una suspensión de saco vitelino al 10% y se almacenó a -60°C o menos hasta que se subpasó en un segundo conjunto de doce (12) huevos (6 días de edad). Antes de la inoculación en el segundo conjunto de huevos, el material subpasado se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad y se filtró a través de un filtro de baja unión a proteínas de acetato de celulosa de 0,45 micras. El segundo conjunto de huevos se incubó en las mismas condiciones que el primer conjunto, después de lo cual se examinaron los embriones. Para establecer controles negativos, este procedimiento se ejecutó en paralelo para dos conjuntos adicionales de huevos embrionados utilizando EMEM filtrado de 0,45 micrones como inóculo inicial.

[0170] El ensayo de hemaglutinación se llevó a cabo en placas de microtitulación haciendo diluciones en serie de dos veces de líquidos alantoideos agrupados tanto P1 como P2, los correspondientes controles negativos P1 y P2, el tipo de stock influenza virus A, que sirvió como control positivo. EMEM sirvió como control negativo del ensayo. Se añadieron por separado eritrocitos lavados de pollo, cobaya y de tipo O humano como suspensiones al 0,5%. Se observó la actividad de AH en placas replicadas después de la incubación a 2-8°C y 37± 2°C durante 1-2 horas.

[0171] El artículo de prueba se consideró negativo para la presencia de contaminantes virales adventicios detectables si al menos el 80% de los embriones inoculados sobrevivieron el periodo de prueba (con exclusión de los que mueren debido a un traumatismo o la contaminación bacteriana), fueron normales en apariencia; y los fluidos alantoideos recolectados de los embriones inoculados no produjeron hemaglutinación.

Ratones adultos y lactantes

[0172] El artículo de prueba congelado se descongeló en un conjunto de baño de agua a 37°C y luego se mezcla en partes iguales con el neutralizante del anticuerpo. El artículo de prueba/neutralización de mezcla de anticuerpos se mantuvo en un conjunto de baño de agua a 37°C durante una hora con mezclado suave cada quince minutos. Se inocularon veinte (20) ratones adultos con el artículo de prueba preparado y cinco (5) ratones adultos se inocularon con el artículo de control (EMEM). A cada ratón de prueba o control se le inyectó una inyección intracerebral de 0,03 ml y una inyección intraperitoneal de 0,5 ml del material apropiado. Los animales se observaron diariamente en busca de signos clínicos sugestivos de infección. El día 21 después de la inoculación, se sacrificaron los ratones.

[0173] Veinte (20) ratones lactantes recién nacidos fueron inoculados con el artículo de prueba preparado y 20 ratones recién nacidos lactantes fueron inoculados con el artículo de control. A cada ratón se le administró una inyección intracerebral de 0,01 ml y una inyección intraperitoneal de 0,1 ml del material apropiado. Los animales se observaron diariamente para detectar signos clínicos anormales. El día 14 después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y los tejidos se recolectaron, homogeneizaron y combinaron dentro del grupo de prueba o del grupo de control. Los tejidos se homogeneizaron con EMEM y se centrifugaron a baja velocidad. Los homogeneizados de tejido se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 micrómetros de baja unión a proteínas cargado en jeringas de tamaño apropiado para inyección. Se inocularon veinte (20) ratones lactantes recién nacidos con el sobrenadante de tejido de los ratones de prueba y se inyectaron 20 ratones con el sobrenadante de tejido de los ratones de control (inyecciones intracerebrales de 0,01 ml y intraperitoneales de 0,1 ml). El día 14 después de las inyecciones de los homogeneizados de tejido, se sacrificaron los ratones.

[0174] El artículo de prueba se consideró negativo para la presencia de contaminantes virales adventicios detectables si al menos el 80% de los ratones lactantes y al menos 80% de los ratones adultos sobreviven el período de ensayo sin observaciones clínicas adversas consistentes con un agente contaminante adventicio transmisible.

Producción de masa purificada estéril PVS-RIPO Lote L0904009 (P2)

[0175] El proceso de fabricación para producir masa purificada estéril PVS-RIPO Lote L0904009 (P2) se ilustra en las FIGS. 18A-18B. Masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 se fabricó utilizando el Banco de Células de Trabajo Vero (WCB) Lote 217002-2 y el MVS Lote L0403006 como materiales de partida. Se expandieron tres viales del Lote 217002-2 de Vero WCB para producir el Lote de expansión celular L0903010 en diez fábricas de células de

6360 cm². El Lote de expansión celular L0903010 se infectó con el Lote L0403006 de PVS-RIPO MVS y el material recolectado (agrupación de recolección Lote L0904008) se utilizó para la producción de la masa purificada PVS-RIPO Lote L0903007 y, posteriormente, la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009.

5 a. Iniciación y expansión de las células Vero

[0176] Se utilizaron células Vero de la expansión de células Lote L0903010 para la producción de la recolección de células Lote L0904008. A lo largo de la expansión, las células Vero se cultivaron en DMEM complementado con L-glutamina y suero bovino fetal (FBS) irradiado al 10% y se incubaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Tres viales del Banco de Células de Trabajo Vero (WCB) Lote 217002-2, se descongelaron en un baño de agua a 37 ± 2°C y se utilizaron para sembrar un matraz de T-162 cm² a una densidad de aproximadamente 50.864 células/cm² (pase 1 de congelación). Las células se expandieron de matraces T-162 cm² a fábricas de células de 6360 cm², fábricas de células de 636 cm² y matraces T-150 cm² utilizando el medio de crecimiento y las condiciones descritas anteriormente para un total de cinco pases de congelación (consulte las FIGS. 18A-18B).

15 b. Infección de células Vero

[0177] Para producir el lisado de células infectado Lote L0904008, célula Vero Lote L0903010 (diez fábricas de células de 6360 cm², tres fábricas de células de 636 cm², y cinco matraces T-150 cm²) que contiene las células sanas a 95 - 100% de confluencia y no se utilizaron signos visibles de contaminación. Se retiraron cuatro botellas de semilla de virus maestra PVSRIPO (MVS) Lote L0403006 (botellas PETG de 125 ml con alícuotas de MVS de 80 ml) de un almacenamiento controlado a ≤ -70°C, se descongelaron en un baño de agua a 33-38°C y se utilizaron en el proceso de infección a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 ufp/célula. El medio de infección formulado se preparó añadiendo 265 ml del Lote L0403006 de MVS descongelado al medio de infección preparado (DMEM/F12 con L-glutamina sin Hepes y rojo fenol) para un volumen total de aproximadamente 8 litros.

[0178] Las diez fábricas de células de 6360 cm² se prepararon para la infección por el lavado con aproximadamente 750 ml de lavado de medio (DMEM/F12 con L-glutamina y sin Hepes y rojo de fenol) y luego llenado con aproximadamente 750 ml del medio de infección preparado formulado. También se prepararon controles positivos y negativos. Las fábricas de células infectadas y los controles se incubaron a una temperatura de 33°C, una concentración de CO₂ del 5% y una humedad del 80%. A las 70 horas después de la infección, se observaron efectos citopáticos (CPE) del 100% en nueve fábricas de células y CPE del 80% en una fábrica de células, y los resultados esperados se anotaron en cada uno de los matraces de control.

35 c. Recolección y clarificación de lisado de células infectadas

[0179] La suspensión celular infectada por virus PVS-RIPO Lote L0904008 fue cosechada de cada fábrica de células y se agruparon en una bolsa de medio estéril. Se tomaron muestras de la suspensión de células infectadas para la prueba de liberación del Lote L0904008 de agrupación de recolección PVS-RIPO. El Certificado de Análisis que resume las pruebas, especificaciones, métodos y resultados de las pruebas de liberación de agrupación de recolección PVS-RIPO Lote L0904008 se incluye en la FIG. 19.

[0180] La suspensión de células infectadas se transfirió a 1 L de botellas de policarbonato de centrífuga en aproximadamente 750 ml de alícuotas. La suspensión de células infectadas se centrifugó a 4°C y 3800 x g durante aproximadamente 20 minutos. El sobrenadante clarificado de cada una de las botellas de centrífuga se combinó en una bolsa de medio estéril de 10 litros y se transfirió al Grupo de Purificación a temperatura ambiente.

d. Tratamiento de Benzonase de recolección final

[0181] Para reducir el nivel de ADN genómico huésped durante la producción de masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007, la recolección PVS-RIPO Lote L0904008 clarificada se incubó con enzima Benzonase®. Antes de la adición de la enzima Benzonase®, se añadió cloruro de magnesio, con mezcla, a la recolección de PVS-RIPO Lote L0904008 clarificada hasta una concentración final de 1 mM. Se añadió enzima Benzonase®, mezclando, hasta una concentración final de 50 unidades/mL. La bolsa se incubó a 2-8°C durante 16 horas. El lisado tratado con enzima Benzonase® se retiró de 2-8°C y se tomaron muestras. La muestra analizada mediante un ensayo de placa para determinar el título del virus.

e. Cromatografía de Sepharose 6 Fast-Flow

[0182] El paso de cromatografía de Sepharose 6 FF proporciona intercambio de tampón y la purificación parcial del agrupamiento de virus de contaminantes de bajo peso molecular de la célula huésped durante la producción de masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007. Se usó una columna de cromatografía empaquetada con resina Sepharose 6 Fast Flow (FF) (GE Healthcare-Biosciences, Piscataway, NJ) para tamponar el intercambio del virus en un tampón de fosfato de baja conductividad en preparación para una purificación adicional. Antes de cargar el lisado tratado con enzima Benzonase®, la columna de Sepharose 6FF se lavó abundantemente con NaCl 5 M, se cargó con NaPO₄ 4,7 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 y se equilibró con NaPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5. Se cargó el lisado tratado

con Benzonase en la columna Sepharose 6FF en dos inyecciones iguales el 19 de mayo de 2009. El producto se eluyó con NaPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5 y la fracción del pico principal PVS-RIPO de ambas inyecciones se recogió en la misma bolsa receptora. Se analizó una muestra del eluato recogido usando un ensayo de placa para determinar el título del virus. El pico principal PVS-RIPO se almacenó a 2-8°C.

f. Cromatografía de flujo Q650M

[0183] Después de la etapa Sepharose 6 FF, el eluato Lote L0903007 fue aplicado a un flujo de Q650M A través de cromatografía de columna para eliminar los contaminantes de proteínas de la célula huésped restantes del virus no vinculante. La columna de cromatografía se rellenó con resina Super Q 650M y se preparó lavando con NaCl 5M, seguido de carga con NaPO₄ 4,7 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 y equilibrado usando NaPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5. La columna se cargó con PVS-RIPO Sepharose 6FF Main Peak y se recogió el flujo que contenía el producto de virus. El tampón usado durante la elución fue NaPO₄ 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5. La concentración de NaCl del pico principal de Q650M recogido se ajustó a NaCl 150 mM usando NaCl 5M. El material del pico principal de Q650M se muestreó y luego se almacenó a 2-8°C. Se analizó una muestra usando un ensayo de placa para determinar el título del virus.

g. Concentración y diafiltración por filtración de flujo tangencial

[0184] El pico principal Q650M material de Lote L0903007 fue retirado de almacenamiento de 2 - 8°C y se concentraron usando una membrana de ultrafiltración de fibra hueca (GE Healthcare UFP-50-C-4MA). El material de virus concentrado se diafiltró luego contra el tampón de formulación (NaPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Se analizaron muestras de la solución PVS-RIPO diafiltrada mediante ensayo de placa para determinar el título del virus. Se añadió HSA (25%) al Lote L0903007 de PVS-RIPO diafiltrado hasta una concentración final del 0,2%. Se analizaron muestras del PVS-RIPO formulado mediante ensayo de placa y contenido microbiano.

h. Alícuota, Muestreo y almacenamiento a granel de PVS-RIPO

[0185] La masa purificada de PVS-RIPO formulado Lote L0903007 fue trasladado a una cabina de seguridad biológica de clase 100 y se dispensan en nueve botellas PETG de 125 ml en un volumen de aproximadamente 30 ml cada una. Las nueve botellas de masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007 se etiquetaron, se congelaron en un baño de etanol/hielo seco y se almacenaron a ≤ -70°C para su uso posterior en la fabricación. La masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007 se transfirió a un almacenamiento controlado a ≤ -70°C.

i. Masa estéril purificada Lote L0904009 (P2)

[0186] Nueve botellas dla masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007 se retiraron de ≤ -70°C almacenamiento controlado y se transfiere a un ≤ -70°C congelador. Las nueve botellas de masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007 se descongelaron en un baño de agua a 24-31°C; la temperatura del producto fue de 11-17°C). El tiempo total de descongelación fue de 43 minutos. El contenido de los nueve contenedores se combinó en una botella de PETG de 1 L para producir un volumen total final de 271,09 mL. La masa purificada PVS-RIPO Lote L0903007 se bombeó a través de un filtro Millipak 20 (Millipore) estéril de 0,2 micrones que había pasado las pruebas previas al uso y se había humedecido previamente con diluyente (NaPO₄ 50 mM en NaCl al 0,9%, pH 7,4 + 0,2% HSA). El filtro se lavó abundantemente usando el mismo diluyente después de la filtración del producto dando una cantidad total de 283,24 ml de producto filtrado. El filtro pasó las pruebas de integridad posteriores a la filtración. Se recogieron muestras (25,5 ml) y se enviaron a Process Analytics/Control de calidad biofarmacéutico para las pruebas de liberación de la masa estéril purificada Lote L0904009 dejando un volumen final total de 257,74 ml. La masa estéril purificada Lote L0904009 procedió luego al paso de llenado. Las pruebas de liberación, los métodos, las especificaciones y los resultados del Lote L0904008 del grupo de recolección de PVS-RIPO se proporcionan en la FIG. 19.

Descripciones de los métodos de prueba para la agrupación de recolección de PVS-RIPO Lote L0904008

a. Título del virus (ensayo TCID₅₀)

[0187] Este ensayo se realizó para determinar el título de virus PVS-RIPO en la agrupación de recolección de PVS-RIPO Lote L0904008, masa estéril purificada Lote L0904009 y Producto en Vial Final Lote L0904010 por TCID₅₀ en células indicadoras Hep-2C. Se agregaron cien microlitros (100 µl) de medio de dilución (RPMI-1640 con L-glutamina 4 mM y FBS al 1%) a cada pocillo de placas de 96 pocillos separados (proporcionando placas separadas para cada estándar de referencia, control positivo y muestras de prueba). Las diluciones iniciales del estándar de referencia de poliovirus tipo 1 de la FDA (1:10000), el poliovirus de control positivo tipo 1 de Sabin Original (1:1000000) y las muestras de prueba (1:1000000) se prepararon con el medio de dilución (RPMI-1640 con 4 mM L-Glutamina y FBS al 1%). Se añadió una alícuota de 100 µl de cada dilución final a cada uno de los ocho pocillos de la primera columna de la placa de 96 pocillos respectiva. Con una pipeta multicanal calibrada, se hicieron diluciones en serie 1:2 en cada placa de 96 pocillos extrayendo 100 µl de cada pocillo en la columna 1, transfiriéndolos a los pocillos adyacentes en la columna 2, mezclando bien y repitiendo el proceso para la siguiente columna en las series. Para el estándar de referencia de la FDA, la dilución terminó en la columna 11 y la columna 12 se usó como pocillos de control negativo (que solo contienen medio de dilución). Se descartaron los 100 µl en exceso de la columna 11. Para el control positivo

y los artículos de prueba, el esquema de dilución continuó en una segunda placa de 96 pocillos, terminando en la columna 23 con la columna 24 utilizada como pocillos de control negativo. A continuación, se añadieron diez mil células Hep-2C en medio de crecimiento (RPMI-1640 con L-glutamina 4 mM y FBS al 10%) (0,1 ml a 1×10^5 células/mL) a cada pocillo de cada placa de 96 pocillos y se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ en una incubadora humidificada de CO_2 al 5% durante 10 días. Las placas se examinaron para determinar los efectos citopáticos (CPE) los días 1, 3, 7 y 10. Una vez finalizado el ensayo, se ingresó el número de pocillos que exhibían CPE para cada muestra en los campos correspondientes de la plantilla del programa de cálculo proporcionada por la FDA. El programa calcula el $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ para cada muestra, según la respuesta del estándar de referencia de poliovirus tipo 1 de la FDA.

b. Carga biológica extendida

[0188] La carga biológica es una estimación del número de microorganismos aeróbicos viables presentes en una muestra acuosa. La prueba de carga biológica del Lote L0904008 de la piscina de recolección PVS-RIPO se realizó utilizando un sistema Milliflex-Sensor II, un dispositivo de filtración rápido y de alto rendimiento para la detección y enumeración de microorganismos.

[0189] Se diluyeron las muestras de ensayo duplicadas (2,5 ml) a 50 ml con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) y se añadió directamente en la parte superior de embudos de filtración Milliflex separados. Se preparó un control negativo filtrando 100 mL de PBS. Se aplicó vacío a cada dispositivo de filtración para absorber la muestra de prueba o el control en la membrana del filtro. Se retiró el embudo y se aplicó la membrana del filtro al tipo apropiado de agar para promover el crecimiento de cualquier microorganismo presente. Una de las membranas de filtro de las muestras de prueba duplicadas se aplicó a agar de soja triptico (TSA) (utilizado para ayudar en el crecimiento de bacterias) y la otra membrana de filtro se aplicó a agar de dextrosa de Sabouraud (SDA) (utilizado para ayudar en el crecimiento de bacterias de levadura y moho). Tanto el medio TSA como el SDA se probaron para la promoción del crecimiento como parte de las pruebas de liberación de materia prima. La muestra de TSA se incubó a $30\text{-}35^\circ\text{C}$ durante 120 horas y la muestra de SDA se incubó a $20\text{-}25^\circ\text{C}$ durante 120 horas en posición invertida. Después del período de incubación, se examinó el crecimiento de las placas de agar y se enumeró el número de colonias (si se observó) y se informó como unidades formadoras de colonias/ml.

c. La detección de micoplasma (PTC), utilizando células NIH/3T3

[0190] La detección de micoplasma se realizó en agrupación de recolección Lote L0904008 utilizando un procedimiento tanto indirecta como directa.

[0191] El método indirecto de detección permite la visualización de micoplasma, particularmente micoplasma no cultivable, haciendo crecer el micoplasma en células 3T3 NIH/(línea de células de embrión de ratón suizo) y luego tinción utilizando una mancha de fluorocromo de unión a ADN. En el ensayo se utilizaron controles tanto negativos como positivos. Los controles positivos incluyeron una especie de micoplasma de citoadsorción fuerte (*M. hyorhinis*) y una deficiente (*M. orale*). La tinción de los cultivos con fluorocromo de unión a ADN permite la detección de micoplasmas según el patrón de tinción observado. En los cultivos negativos solo se observa la fluorescencia del núcleo celular, mientras que en los cultivos positivos se observa fluorescencia nuclear y extranuclear.

[0192] El cultivo directo es un método sensible y específico para la detección de micoplasma. Los medios de agar y caldo utilizados suministran los nutrientes junto con el carbono y la energía necesarios para el crecimiento de micoplasmas cultivables. En el ensayo directo se utilizaron controles tanto positivos como negativos. Los controles positivos incluyeron un micoplasma fermentativo (*M. pneumoniae*) y un micoplasma no fermentativo (*M. orale*). Este procedimiento se basa en el protocolo descrito en 1993 "Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals" en el Anexo N° 2 según lo recomendado por la FDA, Centro de Evaluación e Investigación de Productos Biológicos.

d. Endotoxina por lisado de amebocitos de limulus (LAL)

[0193] El contenido de la endotoxina (LAL) de la agrupación de recolección de PVS-RIPO Lote L0904008, masa estéril purificada Lote L0904009 y el producto en viales final PVS-RIPO Lote L0904010 se determinó utilizando la prueba cinética cromogénica. La prueba se basa en la reactividad del lisado de amebocitos de Limulus, un derivado de los amebocitos de polifemo de Limulus, para determinar la endotoxina en el artículo de prueba. El procedimiento está diseñado para cumplir con las recomendaciones establecidas en la Guía de la FDA sobre la validación de la prueba de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) como prueba de endotoxinas de producto final para fármacos parenterales, productos biológicos y dispositivos médicos humanos y animales, publicada en diciembre de 1987.

[0194] Los pirógenos son materiales que producen fiebre que más a menudo se originan a partir de las paredes celulares bacterianas Gram-negativas. Los pirógenos de las paredes de las células bacterianas se denominan endotoxina bacteriana y se detectan fácilmente mediante sistemas de prueba de LAL cromogénico cinético. El método LAL cromogénico cinético proporciona una cuantificación directa del nivel de endotoxina detectado y es especialmente útil para la detección de niveles bajos de endotoxina. Los reactivos y estándares se preparan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0195] La prueba se realiza con la pipeta de 25 µL de la muestra de ensayo en cada uno de los cuatro depósitos de muestras en la endotoxina cartucho PTS licencia-Endosafe. El PTS extrae y mezcla la muestra de prueba con el reactivo LAL en dos canales y con el reactivo LAL y el control de producto positivo (PPC) en los otros dos canales. La muestra se incuba y luego se combina con el sustrato cromogénico. Después de mezclar, la densidad óptica de los pocillos se mide y analiza frente a una curva estándar específica de Lote archivada internamente. El PTS realiza simultáneamente pruebas por duplicado y promedia los resultados de acuerdo con las pautas de la USP. El ensayo es válido si el coeficiente de variación (CV) es <25% entre las dos réplicas de la muestra y el CV es <25% entre las dos réplicas de PPC. Los resultados son válidos si la recuperación de PPC es del 50 al 200%. El límite de detección de este ensayo es 0,005 EU/mL.

e. Estabilidad de virus por rct40

[0196] Se utilizó el ensayo para determinar el título de PVS-RIPO en la agrupación de recolección Lote L0904008, Producto en Viales Final Lote L0904010 y los controles a 36°C y 40°C por la formación de placas en células indicadoras Vero. Se comparan los títulos log₁₀ del virus a 36°C y 40°C y si la reducción logarítmica entre 36°C y 40°C es de al menos cinco, se determina que la muestra es sensible al crecimiento a 40°C y se considera haber pasado la prueba. El título de la muestra a 33°C también se determina para poder compararlo con el título de la muestra previamente determinado a 33°C. Los controles positivos incluyeron el control RCT 40+: Poliovirus 1 Sabin Clon S33 Lote L0406008 y RCT 40- Control: Poliovirus 1 Sabin Clon S71 Lote L0406004. El control negativo fue DMEM que contenía FBS al 10%.

[0197] Las células Vero se sembraron y se dejaron crecer hasta haberse alcanzado 80 a 100 por ciento de confluencia. Se retiró el medio de crecimiento y se dosificó a las células Vero con 0,2 ml de muestra de prueba o de control. Después, las placas replicadas se incubaron a 33°C, 36°C y 40°C durante aproximadamente una hora. Se eliminó el inóculo y se cubrió la hoja de células con agarosa/2 X Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM). Se dejó solidificar la agarosa y se incubaron placas replicadas a 33°C, 36°C y 40°C hasta que las placas se formaron completamente en los controles positivos (2 días). A continuación, las placas se recubren con agarosa/2 X EMEM que contiene rojo neutro en la oscuridad y se cuentan las placas cuando el rojo neutro había teñido la hoja celular. Se determinó el valor medio de placa. El título (ufp/mL) se calculó usando la fórmula: Valor medio de placa x factor de dilución/volumen inoculado.

f. Agentes adventicios in vivo

[0198] La agrupación de recolección de PVS-RIPO Lote L0904008 se evaluó en busca de virus adventicios in vivo en ratones adultos, ratones en período de lactancia, y huevos de gallina embrionados. El propósito de este ensayo fue evaluar la muestra de prueba para detectar la presencia de virus que podría haber estado presente en la línea celular pero que no causó ningún efecto discernible en el sistema de cultivo celular. Antes de la prueba de AVA in vivo del Lote L0904008 del grupo de recolección PVS-RIPO, se realizaron estudios de I + D según QC-040664 para evaluar el enfoque utilizado para completar esta prueba. Estos estudios de I + D demostraron que no se observaron efectos adversos en la lactancia de ratones cuando se les administró una dosis de preparaciones de lisado de virus PVS-RIPO a una concentración de 2×10^8 ufp/ml. Por lo tanto, la prueba de AVA in vivo se realizó en el Lote L0904008 de agrupación de recolección de PVS-RIPO sin incluir un tratamiento con anticuerpos neutralizantes. El material se probó sin diluir ($2,14 \times 10^9$ TCID₅₀/mL) en huevos de gallina embrionados. A continuación, el material se diluyó a 2×10^8 ufp/ml y se probó en ratones adultos y lactantes.

[0199] Los ratones adultos son susceptibles a un número de agentes virales, incluyendo virus coxsackie y miembros del grupo de flavivirus (virus de la encefalitis de San Luis y virus de la encefalitis japonesa). Los ratones lactantes son susceptibles a una amplia gama de virus que incluyen togavirus, bunyavirus, flavivirus, picornavirus (poliovirus, virus coxsackie grupos A y B, echovirus) y virus del herpes. Los huevos de gallina embrionados se inoculan a través de la alantoides y el saco vitelino. La inoculación por vía alantoidea favorece la replicación de ortomixovirus (virus de la influenza) y paramixovirus (parainfluenza, paperas y sarampión) en las células entodérmicas de la alantoides. La inoculación a través del saco vitelino favorece la propagación de virus del herpes, rickettsias, micoplasmas y bacterias. El subpaso de materiales de ratones lactantes inoculados y huevos embrionados inoculados en nuevos sistemas de prueba sirve para aumentar la sensibilidad de este ensayo, ya que cualquier agente viral presente en el inóculo original se amplificaría a través de este pase en serie.

Huevos embrionados

[0200] Seis (6) huevos/vía de inoculación sirvieron como controles de entrega. Estos se examinaron al trasluz cada día laborable para comprobar su viabilidad y se enfriaron al final del período de incubación. Estos huevos no se recolectaron ni examinaron después de haberlos enfriado.

[0201] Prueba alantoidea: la cavidad alantoidea de doce (12) huevos (10 días de edad) se inoculó con 0,5 ml de artículo de prueba. Los huevos se incubaron a 37-38°C durante 3 días. Los embriones se examinaron al trasluz cada día laborable para comprobar su viabilidad. Los embriones que murieron antes del final del período de incubación se

enfriaron y todos los embriones se examinaron al final del período de incubación. Los fluidos alantoideos del pase 1 (P1) se recolectaron, agruparon y almacenaron a -60°C o menos hasta que se analizaron para determinar la actividad de hemaglutinación (AH) o hasta que se subpasaron en un segundo conjunto de doce (12) huevos (10 días de edad). Antes de la inoculación en el segundo conjunto de huevos, el material subpasado se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad y se filtró a través de un filtro de baja unión a proteínas de acetato de celulosa de 0,45 micrómetros. El segundo conjunto de huevos se incubó en las mismas condiciones que el primer conjunto. Los fluidos alantoideos del pase 2 (P2) se recolectaron, combinaron y almacenaron a -60°C o menos hasta que se analizaron para determinar la presencia de AH, después de lo cual se examinaron los embriones. Para establecer controles negativos, este procedimiento se ejecutó en paralelo para dos conjuntos adicionales de huevos embrionados utilizando EMEM filtrado de 0,45 micras como inóculo inicial. El ensayo de AH se realizó en placas de microvaloración haciendo diluciones en serie al doble de los fluidos alantoideos combinados P1 y P2, los correspondientes controles negativos P1 y P2 y el virus de la influenza tipo A, que sirvió como control positivo. EMEM sirvió como control negativo del ensayo. Se añadieron eritrocitos lavados de pollo, cobaya y tipo O humano por separado como suspensiones al 0,5%. Se observó la actividad de AH en las placas replicadas después de la incubación tanto a 2-8°C como a 37 ± 2°C durante 1-2 horas.

[0202] Prueba de saco vitelino: El saco vitelino de doce (12) huevos embrionados (6 días de edad) se inoculó con 0,5 ml de artículo de prueba filtrado de 0,45 micras. Los huevos se incubaron a 37-38°C durante 9 días. Los embriones se examinaron al trasluz cada día laborable para comprobar su viabilidad. Los embriones que murieron antes del final del período de incubación se enfriaron y todos los embriones se examinaron al final del período de incubación. Los sacos vitelinos P1 se recolectaron, lavaron y combinaron. Se preparó una suspensión de saco vitelino al 10% y se almacenó a -60°C o menos hasta que se subpasó en un segundo conjunto de doce (12) huevos (6 días de edad). Antes de la inoculación en el segundo conjunto de huevos, el material subpasado se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad y se filtró a través de un filtro de baja unión a proteínas de acetato de celulosa de 0,45 micras. El segundo conjunto de huevos se incubó en las mismas condiciones que el primer conjunto, después de lo cual se examinaron los embriones. Para establecer controles negativos, este procedimiento se ejecutó en paralelo para dos conjuntos adicionales de huevos embrionados utilizando EMEM filtrado de 0,45 micrones como inóculo inicial.

[0203] El artículo de prueba se consideró negativo para la presencia de contaminantes virales adventicios detectables si al menos el 80% de los embriones inoculados sobrevivieron el periodo de prueba (con exclusión de los que mueren debido a un traumatismo o la contaminación bacteriana), fueron normales en apariencia; y los fluidos alantoideos recolectados de los embriones inoculados no produjeron hemaglutinación.

Ratones adultos y lactantes

[0204] Veinte (20) ratones adultos se inocularon con el artículo de prueba preparado y ratones de cinco (5) de adultos se inocularon con el artículo de control. Los animales se observaron diariamente en busca de signos clínicos sugestivos de infección. El día 21 después de la inoculación, se sacrificaron los ratones. Se inocularon veinte (20) ratones lactantes recién nacidos con el artículo de prueba preparado y se inocularon 20 ratones lactantes recién nacidos con el artículo de control. Los animales se observaron diariamente para detectar signos clínicos anormales. El día 14 después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y los tejidos se recolectaron, licuaron y combinaron dentro del grupo de prueba o del grupo de control. Los tejidos se homogeneizaron con EMEM y se centrifugaron a baja velocidad. Se inocularon veinte (20) ratones lactantes recién nacidos con el sobrenadante de tejido de los ratones de ensayo y se inyectaron 20 ratones con el sobrenadante de tejido de los ratones de control. Los sobrenadantes de tejido se filtraron primero a través de un filtro de 0,45 mm y se cargaron en jeringas de tamaño apropiado para inyección. El día 14 después de la inyección, se sacrificaron los ratones. El artículo de prueba fue negativo considerado para la presencia de contaminantes virales adventicios detectables si al menos 80% de los ratones lactantes y al menos 80% de los ratones adultos sobreviven el período de ensayo sin observaciones clínicas adversas consistentes con la presencia de un agente transmisible.

[0205] Prueba de liberación, métodos, especificaciones y resultados de la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 están dentro del Certificado de Análisis en la FIG. 20.

Descripciones de los métodos de prueba para la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009

a. Secuenciación del genoma completa

[0206] Un análisis de secuencia 4X integral de masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 y producto en viales final Lote L0904010 se realizó según un procedimiento aprobado. El ARN viral se aisló del artículo de prueba y el genoma se transcribió de forma inversa y se amplificó en secciones de aproximadamente 1200 pb. El análisis de la secuencia de ADN de los amplicones se obtuvo utilizando oligonucleótidos. Los cebadores se diseñaron con una separación de aproximadamente 250 bases, para que tuvieran aproximadamente un 50% de contenido de GC, tuvieran una longitud de entre 18 y 24 pb, y se colocaron de manera que ambas cadenas de ADNc viral amplificado se secuenciaran con dos lecturas de cada cadena.

[0207] La secuenciación de ciclo de ADN de terminador de tinción fluorescente de los artículos de ensayo y el plásmido

de control pGEM3Z se llevó a cabo utilizando el BigDye v1,1 Sequencing Kit. Para las muestras de prueba: se combinaron 2,0 µL de tampón de secuenciación Big Dye 5x con 2 µL de cebador 2 µM, 20 ng de producto de PCR purificado y ddH₂O hasta un volumen final de 10 µL. Para las reacciones de control de pGEM3Z que sirven como controles de reacción y de instrumentos: se secuenciaron 200 ng de pGEM3Z con 20 ng (aproximadamente 3,2 pmol) de cebador M13F-20 (5' GTAAAACGACGGCCAGT-3', SEQ ID NO: 4). Las reacciones de control se realizaron con cada configuración de secuenciación y se analizaron en el ABI3130xl. Las reacciones de secuenciación del ciclo se realizaron utilizando el termociclador PTC-225 Peltier. Antes del análisis, las reacciones de secuenciación se purificaron a partir de terminadores de tinte no incorporados, sales y compuestos de bajo peso molecular utilizando cartuchos de filtración en gel Centriflex. Los datos de la secuencia se recopilaron de los ordenadores de secuenciación y los datos se recortaron y alinearon en una serie contigua de fragmentos (conocida como "contig") utilizando el software Sequencher versión 4,7 (GeneCodes, Ann Arbor, MI). La secuencia de ADN alineada se comparó con la secuencia de referencia y se identificaron los desajustes o polimorfismos de bases, si los hubiera, entre la muestra de prueba y las secuencias de referencia.

[0208] Análisis de la secuencia de ADN utiliza una secuencia de referencia obtenida a partir de Process Analytics/Biopharmaceutical Quality Control Test Report QC037657 (Toxicology Xenograph Study Virus Lote 022208, muestra proporcionada por el Dr. M. Gromeier, Universidad de Duke, Durham, NC). Se encontró que la secuencia de masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L0904009 y Producto en Viales Final Lote L0904010 era 100% homóloga en todas las posiciones de base 7303 en comparación con la secuencia del plásmido viral clonado contenida en las secuencias de referencia del plásmido PVS-RIPO de QC020658 (plásmido GMP Lote L0401014) y a la secuencia de ADNc viral de la secuencia de la semilla viral maestra (MVS), Lote L0403006, QC022271.

b. ADN de célula huésped (Vero)

[0209] la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 fue probado para carga de ADN genómico Vero utilizando un amplicón de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa basada en TaqMan® (qPCR) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) dirigido a la duplicación intragenética del gen de nectina-la específico de Cercopithecus aethiops (Vero), un gen de copia única (GenBank® N° de acceso AF308635). El límite de detección para el ensayo es 1 ng de ADN genómico de Vero por mL. Se usó ADN genómico de células Vero (ADNg) como control positivo (100 ng - 1 pg), se usó un pico de ADNg Vero de 5 ng del artículo de prueba como control de inhibición de la PCR, el resultado del control negativo deseado no fue una reacción de control de prueba con agua libre de nucleasa, y el control de extracción fue tampón salino tamponado con fosfato (PBS)/tampón PBS que contenía un equivalente de 100 pg de ADNg de Vero por reacción.

[0210] qPCR en tiempo real es un método de amplificación cuantitativa sensible que puede ser utilizado para el análisis de la expresión génica, genotipado, patógeno de detección/cuantificación, la mutación de cribado y detección de ADN precisa, incluyendo la cuantificación de bajo número de copias de ADN residual o ARN en una muestra. Se utilizó un instrumento de 96 pocillos Applied Biosystems 7900HT para detectar la acumulación de producto de amplificación de PCR de forma continua durante el proceso de amplificación, lo que permite una cuantificación precisa de la diana en la fase exponencial de la PCR. El uso de un bloque de 96 pocillos permite mayores volúmenes de reacción que un bloque de 384 pocillos y, por lo tanto, aumenta la sensibilidad del ensayo para estudios de ADN residual y ADN contaminante.

[0211] La química TaqMan® qPCR utiliza una sonda TaqMan® de oligonucleótido fluorogénico doble etiquetado. La sonda TaqMan® utilizada para la detección de ADN genómico humano está compuesta por un extremo oligonucleotídico marcado con dos tintes fluorescentes con máximos de emisión distinguibles. El extremo 5' de la sonda se marca con un colorante indicador, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), y el extremo 3' de la sonda se marca con un tinte de extinción, carboxitetrametilrodamina (TAMRA). La sonda de oligonucleótidos es homóloga a una secuencia diana interna dentro del amplicón de PCR del gen de nectina-la de Cercopithecus aethiops (Vero) y es altamente específica para las células Vero y CV-1. Se logra una alta proporción de rechazo de Vero a ADNg humano mediante la utilización de un evento de duplicación de secuencia de nueve bases exclusivo de C. aethiops que no está presente en el ADNg humano, como una parte de la diana de la sonda. Mientras está intacto y en solución libre, el tinte de extinción de la sonda reduce la emisión del indicador del fluorocromo a través de la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET). Durante la fase de extensión de una reacción de PCR TaqMan®, la sonda es escindida por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq, liberando el colorante indicador de la sonda y permitiendo un aumento en la emisión del indicador.

[0212] El ABI Prism 7900HT utiliza un cabezal de escaneado de doble eje para distribuir la luz de excitación de una de iones de argón (488 nm) de láser para los 96 pocillos. Un generador de imágenes de dispositivo de carga acoplada (CCD) mide el espectro de fluorescencia y la intensidad de cada pocillo para generar datos espectrales en tiempo real durante la amplificación por PCR. El software de detección de secuencia ABI (SDS) deconvoluciona la intensidad de fluorescencia de los tintes informador, atenuador y normalizador (ROX) y calcula el aumento en la intensidad de emisión del informador normalizada durante el transcurso de la amplificación.

[0213] La cuantificación precisa de diana inicial en cada reacción de PCR se produce durante la fase exponencial (log₂) de la amplificación antes del agotamiento reactivo o inhibición subproducto de la reacción. Sin embargo, debido

a los límites de señal a ruido de la reacción y la fluorescencia de fondo general, los datos más precisos se generan típicamente al final de la fase logarítmica. La fluorescencia del indicador normalizada se representa en función del tiempo, representada por el número de ciclo de PCR. Los números de copia diana o los valores de masa se generan asignando un umbral de fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto del ciclo en donde la gráfica de amplificación de cada muestra alcanza el umbral (definido como el ciclo de umbral o Ct). Los valores del ciclo umbral para cada reacción se utilizan para cuantificar la cantidad de diana inicialmente contenida dentro de cada reacción del artículo de prueba en comparación con los estándares conocidos.

[0214] La masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 se probó para la carga de ADN genómico VERO utilizando un amplicón qPCR basado en TaqMan® dirigido a la duplicación intragenética del gen de nectina-la específico de *Cercopithecus aethiops* (VERO), un gen de copia única (GenBank® N° de acceso AF308635). Los cebadores TaqMan® y una sonda marcada con colorante fluorescente dual se diseñaron con el software ABI Primer Express (versión 2.0.0). El amplicón de 111 pb consta de un cebador directo: 5'-(CCT CTG CCC AGC GTG AAG; SEQ ID NO: 5); cebador inverso: 5'-(CAC AGA CAC GCC CAT GGA T SEQ ID NO: 6); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(CAC CCA AGC CAC CAA TGG CTC CAA)-[TAMRA] SEQ ID NO: 7. Los cebadores y la sonda se diluyeron a 10 y 5 pmol/μl respectivamente con agua libre de nucleasas (NFW). La mezcla de reacción consistió en 25 μL TaqMan® PCR 2X Master Mix con colorante UNG y ROX, 2 μL de NFW, 1 μL de cebador directo, 1 μL de cebador inverso, 1 μL de sonda TaqMan® y 20 μL de muestra (50 μL de volumen de reacción final). Las mezclas de reacción se cargaron en una placa de 96 pocillos, se cubrieron con una película óptica y se amplificaron con un sistema de detección de secuencias de 96 pocillos ABI modelo 7900HT utilizando un perfil de qPCR de 2 pasos (2:00 min, 50,0°C; 10:00 min, 95,0°C; 40 ciclos de 0:15 min, 95,0°C; 1:00 min, 60,0°C). Una curva estándar de ADN genómico VERO hecha de ADN purificado (ATCC, Parte N° 1587D) se diluyó en serie 10 veces en NFW de 100 ng a 1 pg. Rara vez se observa una respuesta positiva de los estándares de 10 y 1 pg/rxn, equivalentes a aproximadamente 2,6 y 0,26 copias de genes/rxn. El ADN total de la muestra de prueba se inactivó 1:2 con tampón AL y se extrajo usando un método de minipreparación de ADN de Qiagen antes de la reacción de qPCR. La inhibición potencial de la PCR debido a la composición de la muestra se controló añadiendo 5 ng de ADN genómico en la muestra del artículo de prueba extraído. La eficacia de la extracción se controló mediante el uso de un blanco de tampón de PBS y una muestra de tampón de PBS enriquecida con el equivalente de 100 pg de ADN de VERO por reacción de qPCR. Se realizó una muestra de control de tampón (NFW sin plantilla) para la prueba. Periódicamente se incluyen controles de contaminación (centinela). El nivel de contaminación del ADN genómico inicial en la muestra de prueba se calculó usando el software ABI 7900HT comparando el valor del ciclo del umbral de la muestra con la ecuación de la curva estándar de ADN humano. El nivel de ADN inicial se convirtió a pg de ADN/ml utilizando la fórmula: Factor de dilución de la muestra (2) * [(Masa de muestra de prueba promedio (pg)-Masa sin plantilla promedio (pg)) ÷ (Eficiencia promedio de recuperación de picos previos a la extracción (establecido en 100% si el control de extracción tiene ≥ 10% de recuperación))] ÷ [(Volumen de muestra, μL por reacción (20 μL)) * 1000 μL por mL].

[0215] La agrupación de recolección de virus PVS-RIPO fue enzima Benzonase® tratada antes de la purificación. El tratamiento con nucleasa genera típicamente fragmentos de oligonucleótidos promedio ≤ 12 nucleótidos, con la población de fragmentos posteriores a la digestión siguiendo una distribución chi. El amplicón qPCR de nectina-1 *C. aethiops* (líneas celulares Vero y CV-1) usado en este ensayo fue de 111 pb. El resultado generado a partir del ensayo representa una estimación del peor de los casos para la concentración de ADN de la célula huésped residual basada en la masa de ADN genómico de *C. aethiops* intacto haploide (~ 3,88 pg/copia haploide).

c. Enzima Benzonase® residual

[0216] Debido a que endonucleasa Benzonase® se utilizó en el proceso de purificación para producir la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009, una muestra de ensayo se examinó utilizando procedimientos aprobados para determinar el nivel residual de endonucleasa Benzonase®. La concentración de endonucleasa Benzonase® residual se determinó usando el kit ELISA de endonucleasa Benzonase® KGaA Benzonase® de Merck II. El ensayo se inició añadiendo los estándares, muestras y controles a tiras de microtitulación que se recubrieron previamente con anticuerpo de captura policlonal purificado por afinidad. Los pocillos se incubaron a temperatura ambiente durante un período de dos horas y luego se lavaron. Se añadió a cada pocillo un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) dirigido contra la endonucleasa Benzonase® y la placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Esto resultó en la formación del siguiente complejo sándwich: anticuerpo en fase sólida Benzonase®, endonucleasa-HRP, anticuerpo conjugado. Los pocillos se lavaron y aspiraron para eliminar los reactivos no unidos. Se detectó Benzonase® residual mediante la adición de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB), un sustrato de HRP, a cada pocillo. Los pocillos se desarrollaron durante un período de incubación de 15 minutos. La intensidad del color resultante, que correlacionó con la cantidad de analito, se cuantificó usando un lector de placas Spectra MAX 340 calibrado. Se logró una medición precisa comparando la señal de la muestra con los estándares de endonucleasa Benzonase® ensayados al mismo tiempo. Los controles positivos fueron los estándares de endonucleasa Benzonase® que variaban de 0,25 a 10 ng/mL. El diluyente de ensayo se utilizó como control negativo. El límite de detección del ensayo fue de 0,25 ng/mL.

d. Proteína total por BCA

[0217] La detección de proteína total en una solución que no se puede cuantificar directamente por espectrofotometría

debido a la interferencia de los ácidos nucleicos y/o bajas concentraciones de proteína se puede lograr a través del uso de una reacción de ácido biconínico (BCA) y la cuantificación colorimétrica a 562 nm. Se forma un producto de reacción de color azul-púrpura soluble en agua cuando el Cu^{+2} se reduce a Cu^{+1} por la presencia de proteína en condiciones de pH alto y dos moléculas de BCA quelatan un solo ion cuproso Cu^{+1} . El quelato BCA Cu^{+1} exhibe un λ_{max} de 562 nm con absorbancia fuertemente correlacionada con tres registros ($<0,5 \mu\text{g/mL}$ a $>500 \mu\text{g/mL}$) de concentración de proteína, aunque las condiciones de reacción específicas y la instrumentación a menudo limitan el rango lineal efectivo a solo dos tramos. Se sabe que la absorbancia de una solución de proteína que reacciona con BCA en presencia de Cu^{+2} depende de la estructura de proteína agregada de la solución, el número total de enlaces peptídicos y la proporción relativa de residuos de cisteína/cistina, triptófano y tirosina en la solución.

[0218] La muestra de ensayo, masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007, en una solución tampón de Tris 20 mM, NaCl 42 mM se analizaron para la proteína total usando el ensayo BCA. La muestra de prueba no contenía componentes tampón en concentraciones que pudieran interferir con un ensayo de BCA y se tomó antes de la adición de HSA a la masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007. Se generaron un reactivo de trabajo de BCA y una solución madre de BSA y una curva estándar a partir de un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA inmediatamente antes del ensayo. La falta de interferencia del tampón de muestra se verificó mediante la generación de una reacción de pico de muestra-BSA que se generó al agregar 100 μL de la muestra de prueba con 500 μL de BSA (50 $\mu\text{L/mL}$) y 400 μL de diluyente de tampón a 1 mL de reactivo de trabajo BCA, para una concentración pico efectiva de 25 $\mu\text{g/mL}$. Se agregaron muestras de prueba duplicadas de 100 μL a 900 μL de diluyente tampón y 1 mL de reactivo de trabajo BCA. Tras la adición del reactivo de trabajo BCA, las muestras y los controles se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 562 nm. El espectrofotómetro se ajustó a cero (blanco) usando el diluyente tampón - muestra de reactivo de trabajo BCA. Cada reacción se midió por duplicado y los estándares de BSA se promediaron antes de un análisis adicional. Se generó un ajuste de regresión lineal de la curva estándar de BSA (0 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$) con el resultado de $R^2 = 0,989$, no se encontró ningún punto en la curva estándar como un valor atípico y los resultados fueron válidos. Las réplicas de las muestras de prueba no mostraron una varianza excesiva en comparación con el valor promedio. La muestra de control de 25 $\mu\text{g/mL}$ de BSA con espigas mostró una recuperación del 114,61% (28,65 $\mu\text{g/mL}$ en total), lo que indica que la composición de la muestra no interfirió con el ensayo. El promedio general de la muestra de prueba de masa purificada de PVS-RIPO Lote L0903007 se calculó como -0,0197 AU562 que equivale a una concentración de proteína por debajo del nivel de detección ($<1 \mu\text{g/mL}$) cuando se calcula usando la ecuación de la curva estándar BSA $X = ((Y-A)/B)*10$, donde "X" es la concentración de proteína, "Y" es el valor de absorbancia, "A" y "B" son los parámetros de la curva y 10 se refiere al uso de 100 μL de muestra por reacción. El límite de cuantificación del método es 5 $\mu\text{g/mL}$, por lo tanto, el resultado de la prueba se informa como $<5 \mu\text{g/mL}$ de proteína según lo determinado por BCA.

e. Eliminación diferencial

[0219] Actividad de eliminación diferencial de masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 en glioblastoma U87-MG humano se determinó y células de riñón embrionarias humanas HEK 293. El ensayo se realizó utilizando el ensayo de proliferación celular Promega CellTiter96® Aqueous One Solution con el (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, sal interna (MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones etosulfato de fenazina (PES).

[0220] Para realizar el ensayo, las células U87-MG se cultivaron en DMEM con L-glutamina suplementado con 10% fetal de suero bovino y solución de aminoácidos no esenciales al 1%. Las células HEK 293 se cultivaron en DMEM con L-glutamina suplementada con FBS al 10%. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 4×10^4 células/pocillo (4×10^5 células/mL, 0,1 mL/pocillo). Los artículos de prueba se diluyeron hasta un título estimado inicial de 2×10^7 UFP/ml seguido de diluciones seriadas de 4 veces. Las muestras de virus diluidas (100 $\mu\text{L/pocillo}$) se transfirieron a las placas con las células. El título de virus final (MOI) de los artículos de prueba varió de aproximadamente 50 a 0,0002 UFP/célula (MOI calculado en base a TCID_{50}). Las placas se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de CO_2 y 80% de humedad durante 48 horas. Después del período de incubación de 48 horas, se añadió CellTiter96® Aqueous One Solution (20 $\mu\text{L/pocillo}$) y se incubó durante otras cuatro horas a 37°C en un entorno de 5% de CO_2 y 80% de humedad. Se añadió SDS (25 $\mu\text{L/pocillo}$ de solución al 10%) a los pocillos. Las placas se leyeron en cinco minutos a una absorbancia de 490 nm en un lector de placas (Molecular Devices). Las lecturas de fondo en los pocillos con medio de crecimiento celular solamente (sin células) se restaron de las lecturas de los pocillos de la muestra de prueba. Los datos se analizaron utilizando un ajuste de curva de 4 parámetros no lineal (SoftMax Pro de Molecular Devices). Los controles utilizados en el ensayo incluyeron Toxicología PVS-RIPO Lote L0603006 (control positivo) y medio de crecimiento celular (control negativo).

f. Esterilidad (inoculación directa)

[0221] Se llevó a cabo la prueba de esterilidad de la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 y de producto en viales final Lote L0904010 por el método de inoculación directa.

g. Bacteriostasis/Fungistasis (post-esterilidad)

[0222] La prueba de Bacteriostasis/Fungistasis (B & F) se realizó en la prueba de post-esterilidad de masa estéril

purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 utilizando el método de inmersión Farmacopea de Estados Unidos (USP) de acuerdo con 21 CFR 610.12. La prueba B & F se realizó para asegurar que cualquier actividad bacteriostática y/o fungistática inherente al artículo de prueba no afectara adversamente la confiabilidad del método de prueba de esterilidad.

Estabilidad de masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009

[0223] la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 no se colocó en almacenamiento antes de colocar un vial para producir el Producto Biológico en Viales Final de PVS-RIPO Lote L0904010. Por lo tanto, no se realizó la prueba de estabilidad para masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L0904009 ya que se viajó el mismo día que la filtración final.

Producto en viales final

[0224] la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009, formulado en 50 mM fosfato de sodio en 0,9% de cloruro de sodio, pH 7,4 + 0,2% de HSA se filtró estéril usando un filtro de membrana PVDF de 0,2 mm para producir el producto en viales final. El producto en viales final fue fabricado, probado y mantenido de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura (CGMP) actuales como se describe en el Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos, 21 CFR 210, 211 y 600, y las Directrices de la FDA/ICH en lo que se refiere a la fabricación y prueba de productos de investigación de fase I/II.

[0225] la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L0904009 se llenó para producir el producto en viales final Lote L0904010. La operación de llenado se realizó en una cabina de seguridad biológica (BSC) siguiendo los procedimientos aprobados. Se utilizaron viales de vidrio de borosilicato tipo I de dos ml - 13 mm (Cat. N° de Wheaton 223683, N° de Lote 1438174). El volumen de dispensación diana para cada vial fue de 0,57 ml (0,564 a 0,576 ml). Se realizaron controles de peso en proceso.

[0226] Después de llenar 442 viales, los topes B2 FluroTec Westar RS (West Pharma Cat. N° 1970-0002, N° de Lote se insertaron J8281), y se realizaron las operaciones de prensado. La integridad del rizado se inspeccionó visualmente durante las operaciones de rizado y no se rechazó ningún vial. Una vez completadas las operaciones de llenado, taponado y engarzado, se inspeccionaron los viales sin etiquetar (442).

[0227] Las pruebas de liberación, métodos, y las especificaciones para el producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0904010 se proporcionan en el Certificado de Análisis por debajo en la FIG. 21. A continuación se describen los métodos utilizados para analizar el producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0904010 [excepto título de virus (ensayo TCID₅₀), endotoxina por LAL y estabilidad del virus por rct40, secuencia del genoma completo y esterilidad (inoculación directa)]. Los métodos para el título de virus (ensayo TCID₅₀), endotoxina por LAL y estabilidad del virus por rct40 se describieron para la agrupación de recolección PVS-RIPO Lote L0904008, y se pueden encontrar en este documento. Se describieron métodos para la secuencia completa del genoma y la esterilidad (inoculación directa) para masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L0904009 y se pueden encontrar aquí.

a. Aspecto

[0228] Una muestra del producto en viales final PVS-RIPO Lote L0904010 se examinó visualmente. Se examinó el producto para determinar la integridad del recipiente, la claridad de la solución y la precisión de la etiqueta del recipiente. Se inspeccionó el contenedor en busca de grietas o deterioro, y para asegurarse de que la parte superior estuviera bien cerrada. La claridad de la solución se evaluó mediante inspección visual para determinar si el producto soluble en la formulación líquida estaba libre de partículas, opacidad y tinte de líquido en el recipiente, o cualquier turbidez o enturbiamiento del líquido en el recipiente. Se inspeccionó la etiqueta del recipiente para confirmar que el crivial estaba debidamente etiquetado y que la etiqueta estaba bien colocada.

b. RT-qPCR (HRV-2 IRES y poliproteína de polio)

[0229] El producto en viales final de PVS-RIPO de poliovirus recombinante Lote L0904010 se probó para PVS-RIPO HRV-2 IRES (PVS-1) y carga de ARN de poliproteína de poliomiélitis (PO1) utilizando un amplicón RT-qPCR basado en TaqMan® que se dirige a los genes HRV-2 IRES (PVS-1) y poliproteína de poliomiélitis (PO1) en PVS-RIPO. La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es un método de amplificación cuantitativa sensible que se puede utilizar para análisis de expresión génica, genotipado, detección/cuantificación de patógenos, cribado de mutaciones y detección precisa de ADN, incluida la cuantificación de ADN o ARN residual de baja copia en una muestra. El laboratorio de análisis de procesos/control de calidad biofarmacéutico utilizó un instrumento de 96 pocillos Applied Biosystems 7900HT para detectar la acumulación de producto de amplificación de PCR de forma continua durante el proceso de amplificación, lo que permite una cuantificación precisa del objetivo en la fase exponencial de la PCR. El uso de un bloque de 96 pocillos permitió mayores volúmenes de reacción que un bloque de 384 pocillos y, por lo tanto, aumentó la sensibilidad del ensayo para estudios de ADN residual y ADN contaminante.

[0230] La química TaqMan® qPCR utiliza una sonda de oligonucleótido fluorogénico de doble etiquetado TaqMan®

con cada amplicón. La sonda TaqMan® utilizada para la detección de ADN genómico humano se compone de un extremo oligonucleotídico marcado con dos tintes fluorescentes con máximos de emisión distinguibles. El extremo 5' de la sonda se marca con un colorante indicador, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), y el extremo 3' de la sonda se marca con un tinte de extinción, carboxitetrametilrodamina (TAMRA). Las sondas de oligonucleótidos son homólogas a las secuencias diana internas dentro del IRES derivado de PVS-RIPO HRV-2 y los amplicones de RT-PCR de poliproteína de polio y cuando se usan juntas son específicas para PVS-RIPO. Dado que PVS-RIPO es un virus de ARN monocatenario, las muestras se transcriben de forma inversa utilizando los cebadores de amplificación a ADNc como parte del protocolo del termociclo antes de la amplificación de qPCR. Mientras está intacto y en solución libre, el tinte de extinción de la sonda reduce la emisión del indicador de fluorocromo a través de la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET). Durante la fase de extensión de una reacción de PCR TaqMan®, la sonda se escinde por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq, liberando el colorante indicador de la sonda y permitiendo un aumento en la emisión del indicador.

[0231] El ABI Prism 7900HT utiliza un cabezal de escaneado de doble eje para distribuir la luz de excitación de una de iones de argón (488 nm) de láser para los 96 pocillos. Un generador de imágenes CCD mide el espectro de fluorescencia y la intensidad de cada pocillo para generar datos espectrales en tiempo real durante la amplificación por PCR. El software de detección de secuencia ABI (SDS) deconvoluciona la intensidad de fluorescencia de los tintes informador, extintor y normalizador (ROX) y calcula el aumento en la intensidad de emisión del informador normalizado durante el transcurso de la amplificación.

[0232] La cuantificación precisa de diana inicial en cada reacción de PCR se produce durante la fase exponencial (log2) de la amplificación antes del agotamiento reactivo o inhibición de subproducto de la reacción. Sin embargo, debido a los límites de señal a ruido de la reacción y la fluorescencia de fondo general, los datos más precisos se generan típicamente al final de la fase logarítmica. La fluorescencia del indicador normalizada se representa en función del tiempo, representada por el número de ciclo de PCR. Los números de copia diana o los valores de masa se generan asignando un umbral de fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto del ciclo en donde la gráfica de amplificación de cada muestra alcanza el umbral (definido como el ciclo de umbral o Ct). Los valores del ciclo umbral para cada reacción se utilizan para cuantificar la cantidad de diana inicialmente contenida dentro de cada reacción del artículo de prueba en comparación con los estándares conocidos.

[0233] Para realizar el ensayo en los cebadores BDP, TaqMan® y una sonda marcada con colorante fluorescente dual fueron diseñados con el software ABI Primer Express (versión 2.0.0). El amplicón HRV-2 IRES (PVS-1) de 71 pb consiste en un cebador directo: 5'-(AAC CCA ATG TGT ATC TAG TCG TAA TGA, SEQ ID NO: 1); cebador inverso: 5'-(TGA AAC ACG GAC ACC CAA AG SEQ ID NO: 2); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(CAA TTG CGG GAT GGG ACC AAC T SEQ ID NO: 3)-[TAMRA]. El amplicón de 70 pb para PO1 consta de un cebador directo: 5'-(TTG GTG GGA ACG GTT CAC A SEQ ID NO: 8); cebador inverso: 5'-(TCA CCT TGA CTC TGA GTG AAG TAT GA SEQ ID NO: 9); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(TTG CAG CGG CCC TGA AGC G SEQ ID NO: 10)-[TAMRA]. Los cebadores y las sondas se diluyeron a 10 y 5 pmol/μl, respectivamente, con agua libre de nucleasas (NFW). La mezcla de reacción consistió en 25 μL TaqMan® 1 paso RT PCR 2X Master Mix con colorante ROX, 1 μL de inhibidor de RNasa, 1 μL de NFW, 1 μL de cebador directo, 1 μL de cebador inverso, 1 μL de sonda TaqMan® y 20 μL de muestra de prueba (50 μL de volumen de reacción final). Las mezclas de reacción se cargaron en una placa de 96 pocillos, se cubrieron con película óptica y se amplificaron con un sistema de detección de secuencia de 96 pocillos ABI modelo 7900HT utilizando un perfil de qPCR de 3 pasos (2:00 minutos, 50,0°C; 30 minutos a 48,0°C (paso de RT); 10:00 minutos, 95,0°C; 40 ciclos de 0:15 minutos, 95,0°C; 1:00 minutos, 60,0°C). Se hicieron curvas estándar de ADNc de amplicón a partir de ADN plasmídico PVS-RIPO y se diluyeron en serie 10 veces en NFW de 1 ng a 10 fg. El ARN total de la muestra de prueba se inactivó 1:4 con tampón AVL y se extrajo usando un método de minipreparación de ARN viral de Qiagen antes de la reacción RT-qPCR. La inhibición potencial de la PCR debido a la composición de la muestra se controló añadiendo 500 pg de ADN plasmídico PVS-RIPO en la muestra de prueba extraída. Se realizó una muestra de control negativo de tampón (NFW sin molde) para la prueba. Se utilizó ADN plasmídico PVS-RIPO, Lote L0305006, como control positivo. Ambos amplicones de PVS-RIPO se procesaron en la misma placa de 96 pocillos para eliminar la variación entre ensayos. La concentración inicial de ARN de PVS-RIPO en la muestra de prueba se calculó usando el software ABI 7900HT comparando el valor del ciclo umbral de la muestra con la ecuación de la curva estándar de ADN plasmídico. El nivel de ARN inicial se convirtió a pg ARN/mL usando la fórmula: Factor de dilución de la muestra (2) * [(Masa promedio de la muestra de prueba (pg) - Masa promedio sin plantilla (pg)) ÷ (Eficiencia promedio de recuperación del pico previo a la extracción (ajustado al 100%))] ÷ [(Volumen de muestra, μL por reacción (20 μL)) * 1000 μL por ml].

c. pH

[0234] Las pruebas de pH se realizaron en el producto en viales final PVS-RIPO Lote L0904010. El valor de pH se obtuvo de un instrumento potenciométrico debidamente estandarizado (medidor de pH) capaz de reproducir valores de pH a 0,02 unidades de pH utilizando un electrodo indicador sensible a la actividad de iones de hidrógeno, el electrodo de vidrio y un electrodo de referencia adecuado. El instrumento es capaz de detectar el potencial a través del par de electrodos y puede controlar el cambio en milivoltios por unidad de cambio en la lectura de pH a través de un control de temperatura y/o pendiente. Las mediciones se realizan a 25 ± 2°C. Para realizar el ensayo, el medidor de pH se estandarizó utilizando dos conjuntos de dos tampones de normalización: pH 4,0 y 7,0, y pH 7,0 y 10,0. Luego,

la sonda se enjuagó y se secó antes de determinar el pH de la muestra de prueba. El ensayo fue válido porque el valor de la pendiente de las dos estandarizaciones cayó dentro del rango de 92,0%-102,0%. Los controles positivos fueron estándar de pH 4,0, estándar de pH 7,0, estándar de pH 10,0.

5 d. Partículas de virus por microscopía electrónica (ME)

10 **[0235]** Este ensayo, diseñado para cuantificar el número de partículas virales/mL en una muestra de ensayo (producto en viales final PVS-RIPO Lote L0904010) por microscopía electrónica con tinción negativa. Se fotografiaron diez espacios de cuadrícula y se enumeró el número de partículas virales en cada sección y se utilizó para calcular las partículas virales/mL. La muestra de prueba se fijó mediante dilución con un volumen igual de fijador (formaldehído al 8% en 2X PBS). La muestra de prueba (0,5 µL) se colocó en una rejilla recubierta de carbón/tratada con Formvar y se dejó secar al aire. Luego, la muestra se lavó con 5 µL de agua bidestilada (DDH2O) para lavar el tampón de sal/fosfato de la muestra. A continuación, se añadió una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 1% (PTA, pH 7,0) (0,5 µL) a la rejilla y se dejó secar al aire. La rejilla se examinó mediante microscopía electrónica. Se fotografiaron diez espacios de cuadrícula y se determinó el número de partículas virales mediante el siguiente cálculo:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de partículas virales (pv)} = (\text{promedio N}^{\circ} \text{ pv}) \times (\text{área cuadrícula/área de foto}) \times (1 \text{ mL/la cantidad de virus añadido en } \mu\text{L})$$

20 e. Proporción de partículas de virus por unidades infecciosas

[0236] La relación de partículas de virus por unidades infecciosas (vp/IU) se calculó para el producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0904010 dividiendo la concentración de partículas de virus, $1,01 \times 10^{11}$ vp/ml (QC-042172) por el título de virus, $3,98 \times 10^9$ TCID₅₀/mL (QC-042165).

25 f. Pruebas de estabilidad

1. Producto en viales final PVS-RIPO Lote L0904010

30 **[0237]** Las pruebas de estabilidad de producto en viales final PVS-RIPO Lote L0904010 se están llevando a cabo según el Protocolo SP-137 durante un período de cuatro años. Los viales designados para pruebas de estabilidad se almacenan en almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Los atributos del producto PVS-RIPO en viales final probado para la estabilidad incluyen apariencia visual, potencia (título de virus por TCID₅₀) y seguridad (endotoxina/LAL, pH y carga biológica). La apariencia y el título de virus por TCID₅₀ se prueban en los puntos de tiempo de estabilidad de 0, 6, 12, 24, 36 y 48 meses. Las pruebas de seguridad (endotoxina/LAL, pH y carga biológica) se realizan en los puntos de tiempo de estabilidad de 0, 12, 24, 36 y 48 meses. En la Tabla 8 se incluye un resumen de los datos de estabilidad recopilados durante el período de tiempo de estabilidad de 6 meses para el Lote de producto en viales final de PVS-RIPO L0904010. Los resultados indican que el Lote de toxicología del producto en viales final de PVS-RIPO L0904010 es estable a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para 6 meses.

Tabla 8: Resultados de estabilidad del producto biológico final PVS-RIPO Lote L0904010

Prueba	Especificación	0 meses	6 meses
Apariencia	Líquido transparente a translúcido, incoloro sin evidencia de partículas	Líquido transparente e incoloro sin partículas QC-042169	Líquido transparente e incoloro sin evidencia de partículas QC-045043
Título del virus por TCID ₅₀	Informe de resultados	9,60 TCID ₅₀ /mL $\sim 3,98 \times 10^9$ UI/mL QC-042165	9,56 TCID ₅₀ /mL $\sim 3,63 \times 10^9$ UI/ml QC-045044
Endotoxina/LAL	Informe de resultados	$<0,05$ UE/ml QC-042163	No requerido
pH	Informe de resultados	7,4 QC-042171	No requerido
Biocarga	Sin crecimiento	Sin crecimiento (esterilidad) QC-042174	No requerido

2. Toxicología del producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0603006

60 **[0238]** Se fabricó un Lote piloto anterior (Toxicología PVS-RIPO Lote L0603006). Toxicología PVS-RIPO Lote L0603006 se utilizó en el estudio de determinación de rango de PVS-RIPO en monos Cynomolgus. La toxicología PVS-RIPO Lote L0603006 se fabricó utilizando un proceso equivalente al Lote clínico L0904010 que difiere solo en cuestiones relacionadas con la escala del proceso. El Certificado de Análisis para el Lote de toxicología PVS-RIPO L0603006 se incluye en la FIG. 22.

65 **[0239]** La prueba de la estabilidad del producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0603006 almacenado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ se

realizó durante 48 meses. El protocolo se revisó para eliminar la partícula de virus mediante un ensayo de microscopía electrónica (porque el método no se considera indicador de estabilidad), para eliminar la determinación de la relación de partículas de virus a unidades infecciosas (relación VP/IU) y para agregar una prueba anual de carga biológica. En la Tabla 9 se incluye un resumen de los datos de estabilidad completos recopilados durante el período de tiempo de estabilidad de 48 meses para la toxicología del producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0603006. Los resultados indican que la toxicología del producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0603006 es estable a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ durante 48 meses.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 9: Producto biológico final PVS-RIPO Lote L0603006 Resumen de resultados de estabilidad

Prueba	Especificación	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses	36 meses	42 meses	48 meses
Aspecto	Líquido claro transparente, incoloro sin evidencia de partículas	Líquido claro, incoloro sin extraña o particulada QC029922	Líquido claro, incoloro sin extraña o particulada QC030997	Líquido claro, incoloro sin extraña o particulada QC031806	Líquido claro, incoloro sin extraña o particulada QC032908	Líquido claro, incoloro sin extraña o particulada QC033759	Líquido claro, incoloro sin extraña o particulada QC035751	Líquido claro, incoloro sin extraña o particulada QC037473	Líquido claro, incoloro sin evidencia de materia particulada QC039019	Líquido claro, incoloro sin evidencia de materia particulada QC040161	Líquido claro, incoloro sin evidencia de materia particulada QC041966	Líquido claro, incoloro sin evidencia de materia particulada QC043800
Título de virus por TCID ₅₀	Informe de resultados	10,31 TCID ₅₀ /mL ~2,05 X 10 ¹⁰ UI/ml QC029921	10,09 TCID ₅₀ /mL ~1,22 X 10 ¹⁰ UI/ml QC030998	10,49 TCID ₅₀ /mL ~3,12 X 10 ¹⁰ UI/ml QC031807	10,27 TCID ₅₀ /mL ~1,88 X 10 ¹⁰ UI/ml QC032909	10,61 TCID ₅₀ /mL ~4,10 X 10 ¹⁰ UI/ml QC033760	10,27 TCID ₅₀ /mL ~1,88 X 10 ¹⁰ UI/ml QC035752	10,18 TCID ₅₀ /mL ~1,50 X 10 ¹⁰ UI/ml QC037474	10,31 TCID ₅₀ /mL ~2,04 X 10 ¹⁰ UI/ml QC039020	10,12 TCID ₅₀ /mL ~1,32 X 10 ¹⁰ UI/ml QC040162	9,82 TCID ₅₀ /mL ~6,61 X 10 ⁹ UI/ml QC041967	9,86 TCID ₅₀ /mL ~7,24 X 10 ⁹ UI/ml QC043801
Partícula de virus por EM1.2	Informe de resultados	3,98 X 10 ¹² vp/mL QC029928	5,71 X 10 ¹² vp/mL QC030999	2,2 X 10 ¹³ vp/mL QC031808	3,6 X 10 ¹¹ vp/mL QC032910	3,6 x 10 ¹² vp/mL QC033761	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido
Relación VP/IU	Informe de resultados	194	468	705	19,1	88	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido
Endotoxina/LAL	Informe de resultados	0,0859 UE/ml QC029925	No requerido	No requerido	No requerido	0,184 UE/ml QC033762	No requerido	<0,5 UE/mL QC037475	No requerido	<0,5 UE/mL QC040163	No requerido	<0,5 UE/mL QC043802
pH	Informe de resultados	7,4 QC029923	No requerido	No requerido	No requerido	7,4 QC033763	No requerido	7,5 QC037476	No requerido	7,1 QC040164	No requerido	7,7 QC043803
Biocarga ³	Sin crecimiento	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	No requerido	Sin crecimiento QC040165	No requerido	Sin crecimiento QC043804

1 Las pruebas de partículas de virus por EM y de relación VP/IU se eliminaron del protocolo de estabilidad.

2 Se observó la agregación de muestras durante la finalización de este ensayo y se está evaluando un procedimiento de preparación de muestras optimizado. Por lo tanto, la manipulación/preparación de la muestra difirió a los 0, 3 y 6 meses; hasta la fecha, los valores de los resultados de la prueba son 12,5 registros +/- 1 registros.

3 La prueba de carga biológica se agregó al protocolo de estabilidad SP-043 en la Revisión 02. El cambio al protocolo se reflejó a partir del punto de tiempo de estabilidad de 30 meses.

[0240] Las etiquetas de los viales se generaron y una etiqueta se adjuntó a cada vial. Este proceso produjo 435 viales llenos etiquetados. Los viales etiquetados se colocaron en cajas y se almacenaron a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Se designaron muestras (52 viales etiquetados) para las pruebas de liberación de BQC. Los 383 viales etiquetados restantes se designaron como producto. Los 383 viales del producto se transfirieron a almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

[0241] Se insertó una etiqueta de bolsa en cada una de las 383 bolsas Minigrip. Se colocaron treinta y seis bolsas Minigrip (cada una con la etiqueta de la bolsa insertada) en cada caja de embalaje etiquetada. Las cajas de envasado etiquetadas se colocaron en una cabina de seguridad biológica (BSC) sobre una bandeja llena de hielo seco y se dejaron enfriar y permanecer en hielo seco durante las operaciones de envasado. Un total de 383 viales etiquetados de producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0904010 se retiraron del almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ y se colocaron en el mismo BSC sobre hielo seco. Esto incluyó 349 viales de producto, 3 retenciones y 31 viales de producto designados para pruebas de estabilidad. Cada vial de producto en viales final de PVS-RIPO Lote L0904010 se colocó en una bolsa de minigrip individual (cada una con la etiqueta de la bolsa insertada).

[0242] Cada caja de viales empaquetados junto con el material absorbente se colocó en una bolsa de Biohazard y volvieron a $\leq$ almacenamiento -70°C . Se colocaron un total de 383 viales en almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

EJEMPLO 6

Enmienda química, de fabricación y de control para producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001

[0243] La FIG. 23 proporciona un historial de los lotes de producto en viales final de PVS-RIPO producidos por el Solicitante. El producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001 se fabricó utilizando los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 5, con los siguientes cambios. Se utilizó la prueba de RT-qPCR en tiempo real durante el paso de cromatografía de Sepharose 6 FF para identificar las fracciones que contenían un título alto ($\geq 1 \times 10^7$ copias/mL) de ARN viral de PVS-RIPO. Esto dio como resultado la selección de un rango de fracciones ligeramente diferente, lo que resultó en una proteína residual y ARN viral libre más altos para este lote. También permitió un aumento en el rendimiento viral infeccioso total (TCID_{50} UI) en un factor de aproximadamente 6. Se agregaron dos pruebas de micoplasma adicionales a la prueba del grupo Harvest. Uno fue una prueba para la detección de micoplasmas para productos virales utilizando células Vero y el otro la detección de micoplasmas por Touch-down (TD)-PCR. Todas las pruebas de micoplasma se realizaron para el grupo de recolección que inicialmente utilizó células Vero en lugar de células NIH/3T3. El ensayo se realizó posteriormente usando células NIH/3T3 que son refractarias a la infección por PVS-RIPO. También se realizó un ensayo de PCR de contacto para verificar la ausencia de ADN de micoplasma después del almacenamiento de la muestra congelada. Se agregó una prueba RT-qPCR adicional para el virus de la poliomielitis IRES a la prueba de liberación del producto en viales final para asegurar la ausencia de virus de tipo salvaje. El método de secuenciación genómica para las pruebas de liberación del producto de masa estéril purificada y del producto en viales final utilizó el método de secuenciación de próxima generación (NGS) de Illumina.

[0244] FIG. 24 proporciona una descripción general del proceso de fabricación. El producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001 se preparó a partir de la misma semilla de virus maestro Lote L0403006 y Banco de Células de Trabajo Vero Lote 217002-2 que se utilizó para el Lote Clínico en Viales Final de PVS-RIPO L0904010 anterior. Siguiendo los mismos procedimientos que se usaron para el Lote clínico anterior (ver Ejemplo 5), las células Vero se expandieron e infectaron con la semilla del virus maestro en fábricas de células de diez niveles. El virus se recogió por centrifugación y se combinó. El conjunto de recolección se trató con la enzima Benzonase® para reducir el nivel de ADN genómico del huésped y se purificó usando dos pasos de cromatografía en columna (cromatografía en Sepharose 6 FF y cromatografía de flujo continuo Q650M). Después, el material se concentró usando una membrana de fibra hueca de ultrafiltración y se diafiltró contra el tampón de formulación (NaPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Este material se congeló a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente tres meses. Después de descongelar, el material se combinó, se filtró en condiciones estériles de 0,2 micrómetros y se llenó en viales de vidrio de 2 ml. A continuación se describe un breve resumen del proceso de fabricación.

[0245] El producto en viales final de PVS-RIPO es un líquido incoloro formulado en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0,9%, pH 7,4 tampón que contenía 0,2% de HSA (HSA). El producto en viales final de PVS-RIPO se llena a un volumen de 0,5 ml por vial y una concentración de $4,48 \times 10^9$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ($2,2 \times 10^9$ $\text{TCID}_{50}/\text{vial}$). El producto se almacena a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Materiales de producción

[0246] Los materiales/reactivos de producción utilizados en la fabricación de producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001 fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 5. La enzima Benzonase® es de origen vegetal y producido por la fermentación. El hidrolizado de ácido de caseína se utiliza en el medio de fermentación. La leche utilizada para la producción de ácido de caseína hidrolizado proviene de animales sanos de Australia y Nueva Zelanda en las mismas condiciones que la leche recolectada para el consumo humano. El ácido de caseína hidrolizado se prepara sin otro material para rumiantes que la leche. El FBS se fabricó a partir de sangre fetal bovina recolectada en mataderos inspeccionados por el USDA ubicados en los Estados Unidos y resultó negativo para los virus bovinos analizados. La HSA se compró a Octapharma. El HSA se fabrica de acuerdo con las regulaciones GMP y cumple con

los criterios de producción y prueba del producto de acuerdo con la Farmacopea de EE. UU. y Europa. Todas las donaciones de plasma se analizaron individualmente y no reaccionaron a HBsAg, VIH-1/VIH-2 Ab y VHC Ab. Cada grupo de plasma se analizó y resultó negativo para HBsAg, VIH-1/VIH-2 Ab y VHC-ARN mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La tripsina se obtuvo de las glándulas del páncreas porcino recolectadas de animales de origen canadiense. Los animales reciben inspecciones ante mortem y post mortem bajo la supervisión de un veterinario y aparentemente están libres de enfermedades infecciosas y contagiosas. Se irradia la tripsina de la materia prima. El vendedor usó lactosa bovina como diluyente para lograr la concentración de 1:250. Esta lactosa se obtiene de la leche apta para el consumo humano de vacas sanas de origen estadounidense. La tripsina prima utilizada en esta producción se probó y se encontró negativo para el parvovirus porcino, Micoplasma, y PCV 1 y 2.

Resumen de producción

[0247] El proceso de fabricación para producir masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L1405001 (P2) se ilustra en las FIGS. 25A-25B. la masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L1311004 se fabricó en el BDP utilizando Banco de Células de Trabajo Vero (WCB) Lote 217002-2 y MVS Lote L0403006 como materiales de partida. Se expandieron dos viales del Lote 217002-2 de Vero WCB para producir el Lote de expansión celular L1310003 en diez fábricas de células de 6360 cm². El Lote de expansión celular L1310003 se infectó con el Lote L0403006 de PVS-RIPO MVS y el material recolectado (lote de reserva de recolección L1311003) se usó para la producción de la masa estéril purificada de PVS-RIPO Lote L1405001.

a. Iniciación y expansión de las células Vero

[0248] Se utilizaron células Vero de la expansión de células Lote L1310003 para la producción de la recolección de células Lote L1311003. Las actividades de expansión celular se realizaron en el BDP en el Edificio A de ATRF, Planta de Producción de Virus GMP. Durante la expansión, las células Vero se cultivaron en DMEM suplementado con L-glutamina y HEPES sin rojo fenol. Se añadió suero fetal bovino (catálogo HyClone N° SH30070.03IR) a una concentración del 10%. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante todo el proceso de expansión celular.

[0249] Se descongelaron dos viales del Banco de Células de Trabajo Vero (WCB) Lote 217002-2 en un baño de agua a 37 ± 2°C con agitación constante. Las células de cada vial se agregaron a 9 ml de medio calentado completo en un tubo de centrifuga de 15 ml. Luego de mezclar se tomó una muestra para contar y determinar la viabilidad (79% y 84%). A continuación, las células se centrifugaron a un ajuste de 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y los sedimentos celulares se resuspendieron en un volumen total combinado de 30 ml de medio DMEM (como se describió anteriormente) en un matraz de 75 cm². Las células se expandieron desde el matraz de 75 cm² hasta las fábricas de células de 6360 cm² usando el medio de crecimiento y las condiciones descritas anteriormente para un total de ocho pases desde la congelación.

[0250] Se realizó un ensayo de tumorigenicidad adicional sobre las células EOP a cabo 10 pasajes de la descongelación inicial para modelar pasajes adicionales de escala necesarios para la producción. También se agregó la prueba de circovirus porcino. Además, se agregó una prueba para el virus de la polio de tipo salvaje IRES.

b. La infección de células Vero

[0251] Se utilizó célula Vero Lote L1310003 (diez 6360 fábricas de células cm², tres fábricas de células 636 cm²) después de confirmar que cada recipiente contenía las células sanas a 95 - 100% de confluencia y no hay signos visibles de contaminación para producir el lisado celular infectado. Se extrajeron cuatro botellas de semilla de virus maestra PVSRIPO (MVS) Lote L0403006 (botellas de PETG de 125 ml con alícuotas de MVS de 80 ml) de un almacenamiento controlado a ≤ -70°C, se descongelaron en un baño de agua a 33-38°C y se utilizaron en el proceso de infección a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 ufp/célula. El medio de infección formulado se preparó añadiendo 226 ml del Lote L0403006 de MVS descongelado al medio de infección preparado (DMEM/F12 con L-glutamina sin Hepes y rojo fenol) para un volumen total de aproximadamente 8 litros.

[0252] Los diez fábricas de células de 6360 cm² se prepararon para la infección por el lavado con aproximadamente 750 ml de medio de lavado (DMEM/F12 con L-glutamina y sin Hepes y rojo de fenol) y luego llenado con aproximadamente 750 ml de medio de infección preparado formulado. También se prepararon controles positivos y negativos. Las fábricas de células infectadas y los controles se incubaron a una temperatura de 33°C, una concentración de CO₂ del 5% y una humedad del 80%. A las 70 horas después de la infección, se observaron efectos citopáticos (CPE) del 95 al 100% en las diez fábricas de células y se anotaron los resultados esperados en cada uno de los matraces de control.

c. Recolección y clarificación de lisado de células infectadas

[0253] La suspensión celular infectada por virus PVS-RIPO Lote L1311003 fue cosechada de cada fábrica de células y se agruparon juntas en una bolsa de medio estéril. Se tomaron muestras de la suspensión de células infectadas para la prueba de liberación de la agrupación de recolección de PVS-RIPO Lote L1311003. El Certificado de Análisis que

resume las pruebas, especificaciones, métodos y resultados de la prueba de liberación de agrupación de recolección de PVS-RIPO Lote L1311003 se incluye en la FIG. 26.

[0254] La suspensión de células infectadas se transfirió a 1 L de botellas de policarbonato de centrifuga en aproximadamente 750 ml de alícuotas. La suspensión de células infectadas se centrifugó a 4°C y 3800 x g durante aproximadamente 20 minutos. El sobrenadante clarificado de cada una de las botellas de centrifuga se reunió en una bolsa de 10 L y se dispuso en botellas de PETG estériles de 10 x 1 L, se congeló y se transfirió a MMIC para su almacenamiento a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

d. Tratamiento de Benzonase® de la recolección final

[0255] Para reducir el nivel de ADN genómico del huésped durante la producción de la masa purificada de PVS-RIPO Lote L1311004, la recolección clarificada de PVS-RIPO Lote L1311003 se descongeló a temperatura ambiente durante 21 horas después del almacenamiento durante aproximadamente tres meses a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. El PVS-RIPO descongelado se combinó en dos bolsas de 10 litros y se mezcló suavemente. Se combinaron muestras de tres mililitros de cada bolsa individual en un tubo cónico de 15 mL. Se tomaron muestras de cada bolsa para las siguientes pruebas: TEM, Vero gADN qPCR, ensayo de placa, PCH, SDS-PAGE y secuenciación genómica completa.

[0256] Antes de la adición de enzima Benzonase®, MgCl_2 100 mM se añadió con mezcla, a cada bolsa (dos bolsas) de la recolección PVS-RIPO Lote L1311003 clarificado hasta una concentración final de MgCl_2 1 mM. Se añadió enzima Benzonase® a cada bolsa, con mezcla, hasta una concentración final de 50 unidades/mL. Las bolsas se incubaron a 2-8°C durante 18-21 horas. El lisado tratado con Benzonase® se retiró de 2-8°C y se tomaron muestras. La muestra se analizó mediante SDS-PAGE, secuenciación genómica completa, PCH, TEM, Vero gADN qPCR, ensayo de placa y TCID_{50} .

e. La cromatografía de Sepharose 6 Fast-Flow

[0257] El paso de cromatografía de Sepharose 6 FF proporciona intercambio de tampón y la purificación parcial de la agrupación de virus de contaminantes de bajo peso molecular de la célula huésped durante la producción de la masa purificada de PVS-RIPO Lote L1311004. Se usó una columna de cromatografía empaquetada con resina Sepharose 6 Fast Flow (FF) (GE Healthcare-Biosciences, Piscataway, NJ) para tamponar el intercambio del virus en un tampón de fosfato de baja conductividad en preparación para una purificación adicional. Antes de cargar el lisado tratado con Benzonase®, la columna de Sepharose 6FF se lavó abundantemente con NaCl 5 M, se cargó con NaPO_4 4,7 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 y se equilibró con NaPO_4 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5.

[0258] El lisado tratado con Benzonase® se cargó en la columna de la Sepharose 6FF en dos inyecciones iguales. El producto se eluyó con NaPO_4 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5 y las fracciones del pico principal de PVS-RIPO de cada inyección se recogieron en varias botellas de PETG de 2 L. Las muestras de las fracciones individuales de las dos ejecuciones cromatográficas se analizaron mediante qPCR de transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR). Las fracciones del pico principal de PVS-RIPO se almacenaron a 2-8°C durante 8-17 h. Las fracciones seleccionadas basadas en los resultados de RT-qPCR en tiempo real y la absorbancia UV de ambos experimentos de Sepharose 6 FF se combinaron en una bolsa estéril de 20 L. Las muestras de los ciclos de cromatografía agrupados se analizaron para lo siguiente: ensayo de placa, RT-qPCR, SDS-PAGE, PCH, TEM y Vero gADN qPCR.

f. Cromatografía de flujo Q650M

[0259] Después del paso de Sepharose 6 FF, el eluato Lote L1311004 fue aplicado a una cromatografía de flujo de Q650M de columna para eliminar los contaminantes de proteínas de la célula huésped restantes del virus no vinculante. La columna de cromatografía se llenó con resina Super Q 650M y se preparó lavando con NaCl 5 M, seguido de carga con NaPO_4 4,7 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 y equilibrado usando NaPO_4 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5.

[0260] La columna se carga con el pico principal de PVS-RIPO Sepharose 6FF y se recogió el flujo que contenía el producto de virus. El tampón usado durante la elución fue NaPO_4 4,7 mM, NaCl 42 mM, pH 7,5. La concentración de NaCl del pico principal de Q650M recogido se ajustó a NaCl 150 mM usando NaCl 5M. Se tomaron muestras del material del pico principal de Q650M y luego se almacenó a 2-8°C durante aproximadamente 16 horas. Se analizó una muestra para lo siguiente: un ensayo de placa para determinar el título del virus, TCID_{50} , SDS-PAGE, PCH, TEM y Vero gADN qPCR.

g. Concentración y diafiltración por filtración de flujo tangencial

[0261] El material de pico principal Q650M de Lote L1311004 fue retirado de almacenamiento a 2 - 8°C y se concentraron usando una membrana de ultrafiltración de fibra hueca (GE Healthcare UFP-50-C-4MA). El material de virus concentrado se diafiltró luego contra el tampón de formulación (NaPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Las muestras de la solución PVS-RIPO diafiltrada se analizaron para: ensayo de placa para determinar el título del virus, TCID_{50} , SDS-PAGE, PCH, TEM y Vero gADN qPCR. Se añadió HSA (25%) al Lote L1311004 de PVS-RIPO diafiltrado hasta una concentración final del 0,2%. Se analizaron muestras del PVS-RIPO formulado para: biocarga extendida,

ensayo de placa, TCID₅₀, SDS-PAGE, PCH, TEM y Vero gADN qPCR.

h. Alícuota a granel, muestreo y almacenamiento de PVS-RIPO

[0262] La masa purificada de PVS-RIPO Lote L1311004 formulado fue trasladado a una clase 100 BSC y se dispensa en cuatro botellas de 500 ml de PETG en un volumen de aproximadamente 3 x 250 ml y 1 x 167 ml cada una. Las cuatro botellas de la masa purificada de PVS-RIPO Lote L1311004 se etiquetaron, se congelaron en un baño de etanol/hielo seco y se almacenaron a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior en la fabricación. La masa purificada de PVS-RIPO Lote L1311004 se transfirió a un congelador de almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

i. La masa estéril purificada Lote L1405001 (P2)

[0263] Se retiraron frascos de 3 x 250 mL y 1 x 167 mL de la masa purificada de PVS-RIPO Lote L1311004 de un almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ en MMIC y se transfirieron a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, las cuatro botellas de la masa purificada de PVS-RIPO Lote L1311004 se descongelaron en un baño de agua a 21-25°C; las temperaturas ambiente y del producto eran de 20°C. El tiempo total de descongelación fue de 195 minutos. El contenido de los cuatro contenedores se combinó en una botella de PETG de 2 L para producir un volumen total final de 934,3 mL. Se dispensó una muestra de 2,5 ml de PVS-RIPO purificado en alícuotas de 0,5 ml y se almacenó a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Se añadieron ciento veintidós mL de HSA al 0,2% recién preparada en NaPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 a la masa agrupada purificada PVS-RIPO Lote L1405001. La masa purificada de PVS-RIPO Lote L1405001 en 50 mM NaPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4 que contenía 0,2% HSA se bombeó a través de un filtro Millipak 20 (Millipore) estéril de 0,2 micrones que había pasado las pruebas de integridad previas al uso y se había humedecido previamente con diluyente (NaPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 + HSA al 0,2%). El filtro también se lavó abundantemente usando el mismo diluyente después de la filtración del producto dando una cantidad total de 1054 ml de producto filtrado final. El filtro pasó las pruebas de integridad posteriores a la filtración. Con una pipeta estéril, se retiraron 27 ml de la masa estéril purificada Lote L1405001 y se distribuyeron en recipientes de muestra estériles. Las muestras se enviaron para la prueba de liberación de la masa purificada estéril Lote L1405001, lo que dejó un volumen final total de aproximadamente 1027 ml. La masa estéril purificada Lote L1405001 luego procedió al paso de llenado.

Vialización para producir producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001

[0264] La masa estéril purificada PVS-RIPO Lote L1405001 se llenó para producir el Lote de producto en viales final L1402001. La operación de llenado manual se realizó en una cabina de seguridad biológica (BSC) siguiendo los procedimientos aprobados. Se utilizaron viales de vidrio de borosilicato de tipo I USP/EP de dos mililitros de 13 mm (West Pharmaceutical, nº de cat. 6800314, Lote 6102124826). El volumen de dispensación diana para cada vial fue de 0,55 ml (0,545 a 0,556 ml). Se realizaron controles de peso en proceso.

[0265] Después de llenar 1792 viales, se insertaron tapones B2 FluroTec Westar RS (West Pharmaceutical, Cat N° 1970-0002, Lote D3161200), y se realizaron las operaciones de prensado. La integridad del rizado se inspeccionó visualmente durante las operaciones de rizado y se rechazaron cinco viales. Una vez finalizadas las operaciones de llenado, taponado y engarzado, se inspeccionaron los viales no etiquetados. Durante la inspección se rechazaron veintiún viales sin etiquetar, dejando un total de 1766 viales.

[0266] El proceso continuó con las operaciones de etiquetado que produjeron 1712 viales llenos marcadas para su utilización después de la eliminación de 54 viales a un lado para el ensayo y retención. Todos los viales se colocaron en cajas de almacenamiento etiquetadas y se almacenaron a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se retiraron dos viales adicionales para realizar pruebas, dejando 1710 viales.

[0267] PVS-RIPO fue empaquetado. Se insertaron etiquetas adicionales con la concentración de virus en bolsas de plástico Minigrip. Se colocaron treinta y seis bolsas Minigrip (cada una con la etiqueta de la bolsa insertada) en cada caja de embalaje etiquetada. Las cajas de envasado etiquetadas se colocaron en un BSC sobre una bandeja llena de hielo seco y se dejaron enfriar y permanecer en el hielo seco durante las operaciones de envasado. Un total de 1710 viales etiquetados con producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001 se retiraron del almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ y se empaquetaron en bolsas Minigrip (un vial por bolsa) en el mismo BSC en hielo seco. Durante el envasado en bolsas Minigrip, todos los viales y cajas se mantuvieron en hielo seco. Cada uno de los treinta y seis viales empaquetados se colocó en cajas etiquetadas. Las cajas se colocaron en almacenamiento controlado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Límites aceptables y métodos analíticos

[0268] Pruebas y especificaciones para la agrupación de recolección de PVS-RIPO, masa estéril purificada, y producto en viales final eran las mismas que las descritas en el Ejemplo 5, con la excepción de los siguientes cambios. Se agregaron dos pruebas adicionales de micoplasma a la prueba del grupo de recolección. Una fue una prueba para la detección de micoplasmas para productos virales utilizando células Vero y la otra la detección de micoplasmas por Touch-down (TD)-PCR. La detección de micoplasmas para el grupo de recolección utilizó inicialmente células Vero en lugar de células NIH/3T3. El ensayo se realizó posteriormente usando

células NIH/3T3 que son refractarias a la infección por PVS-RIPO. También se realizó un ensayo de PCR de contacto para verificar la ausencia de ADN de micoplasma después del almacenamiento de la muestra congelada. Se agregó una prueba RT-qPCR para el virus de la poliomielitis IRES a la prueba de liberación del producto en viales final para garantizar la ausencia del virus de la poliomielitis de tipo salvaje o de la cepa vacunal. El método de secuenciación genómica para las pruebas de liberación de la masa estéril purificada y del producto en viales final cambiadas al método más avanzado de secuenciación de próxima generación (NGS) de Illumina.

[0269] Las pruebas de liberación, los métodos, las especificaciones y los resultados de la agrupación de recolección PVS-RIPO Lote L1311003, masa estéril purificada Lote L1405001, y producto en viales final Lote L1402001 se pueden encontrar en los Certificados de Análisis en las FIGS. 27-28.

Cambios de método analítico y descripciones de ensayo

[0270] El ensayo de la agrupación de recolección de PVS-RIPO, masa estéril purificada, y el producto en viales final se realizó como se describe en el Ejemplo 5, con la excepción de que algunas pruebas de micoplasma adicionales se realizaron sobre la muestra de la agrupación de la recolección. Estos métodos junto con las pruebas adicionales de micoplasma y el nuevo método de secuenciación de próxima generación se describen a continuación.

a. Micoplasma para los productos virales usando células Vero

[0271] La detección de micoplasma se realizó en agrupación de recolección Lote L1311003 utilizando un procedimiento tanto indirecto como directo. Esta prueba con las células Vero se realizó accidentalmente en este Lote de agrupación de recolección solamente; las pruebas anteriores habían utilizado las células NIH/3T3 que son refractarias a la infección por Polio (también se realizó la prueba en las células NIH/3T3). Dado que las muestras del conjunto de recolección utilizadas con las células NIH/3T3 se almacenaron congeladas durante un período de tiempo adicional en relación con el ensayo de células Vero, también se realizó un ensayo de PCR de contacto (TD-PCR) para verificar la ausencia de ADN de micoplasma en la agrupación de la recolección.

[0272] El método indirecto de detección permite la visualización de micoplasma, particularmente micoplasma no cultivable, por inoculación en células Vero y luego tinción utilizando una mancha de fluorocromo de unión a ADN. En el ensayo se utilizaron controles tanto negativos como positivos. Los controles positivos incluyeron una especie de micoplasma de citoadsorción fuerte (*M. hyorhinis*) y una deficiente (*M. orale*). La tinción de los cultivos con fluorocromo de unión al ADN permite la detección de micoplasmas según el patrón de tinción observado. En los cultivos negativos solo se observa la fluorescencia del núcleo celular, mientras que en los cultivos positivos se observa fluorescencia nuclear y extranuclear.

[0273] El cultivo directo es un método sensible y específico para la detección de micoplasma. Los medios de agar y caldo utilizados suministran los nutrientes junto con el carbono y la energía necesarios para el crecimiento de micoplasmas cultivables. En el ensayo directo se utilizaron controles tanto positivos como negativos. Los controles positivos incluyeron un micoplasma fermentativo (*M. pneumoniae*) y un micoplasma no fermentativo (*M. orale*).

[0274] Para el método indirecto de detección, la muestra de agrupación de recolección se descongeló a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y 1:5 y 1:10 diluciones se prepararon utilizando salina tamponada de fosfato estéril. La muestra de prueba sin diluir y cada dilución se inocularon en cada uno de dos cubreobjetos (por muestra/dilución) que contenían células Vero. Los cubreobjetos se incubaron durante 1-2 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ y 5-10% de CO_2 . A continuación, se añadieron a cada cubreobjetos 2 ml de EMEM que contenía suero bovino fetal al 8%. Los cubreobjetos se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ y 5-10% de CO_2 . Después de 3 días de incubación, los cubreobjetos se fijaron, se tiñeron (tinción de Hoechst) y luego se leyeron usando un microscopio epifluorescente.

[0275] Se inocularon dos mililitros del artículo de prueba sin diluir en cada una de las dos placas de agar SP-4 y se inocularon 10 ml en un matraz de 75 cm² que contenía 50 ml de caldo SP-4. Las placas se incubaron anaeróticamente a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 14 días. El matraz se incubó anaeróticamente a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ y se subcultivó los días 3, 7 y 14 en cada una de las dos placas de agar SP-4 (0,2 ml/placa). Estas placas se incubaron anaeróticamente a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 14 días. El matraz de caldo se observó cada día de trabajo durante 14 días para detectar cambios de color o turbidez. En general, el crecimiento de micoplasma hace que el caldo se vuelva turbio. Las placas de agar se observaron después de 14 días de incubación (día 0). Las placas subcultivadas con caldo SP-4 (Días 3, 7 y 14) se observaron después de 14 días de incubación. Las colonias de micoplasmas crecen en el agar haciendo que el centro de la colonia parezca opaco y el crecimiento de la superficie periférica parezca translúcido. Estas colonias se pueden observar fácilmente con un microscopio óptico.

b. Micoplasma por TD-PCR

[0276] La detección de micoplasma se realizó en agrupación de recolección Lote L1311003 usando prueba de reacción de cadena de la polimerasa Touchdown (TD-PCR). Esta prueba se realizó en caso de que el tiempo de retención de la muestra a $\leq -70^\circ\text{C}$ entre el desempeño de las pruebas de células PTC micoplasma Vero y NIH-3T3 pudiera haber resultado en una pérdida de cualquier micoplasma vivo potencial en las muestras del conjunto de

recolección retenidas. El ensayo de micoplasma basado en PCR no se vería afectado por la congelación-descongelación y el almacenamiento ultrafrío de la agrupación de recolección.

[0277] La PCR es una herramienta muy sensible para la detección de ADN de micoplasma en las muestras de células, suero, o de tejidos. La PCR amplifica el ADN de micoplasma independientemente de su infectividad. Al definir los bordes de la región conservada seleccionada de la secuencia de micoplasma con un conjunto de cebadores, es posible amplificar la secuencia diana en un factor de más de 10 millones en unas pocas horas. La presencia del ADN diana amplificado se confirma mediante electroforesis en gel teñido con etidio. El ensayo se puede utilizar para detectar tan solo 1 ufc de ADN de micoplasma. Touchdown PCR es un método de ciclo modificado que utiliza un gradiente de hibridación para aumentar en gran medida la especificidad y la sensibilidad.

[0278] ADN de la muestra de ensayo se obtiene por lisis de las células o del sobrenadante y la purificación. El ADN resultante se resuspende en un volumen de agua libre de nucleasas para generar 0,1 µg/mL de ADN. Para la amplificación por PCR, se preparó una mezcla maestra de reactivos que contenía los cebadores apropiados, dNTP, tampón, agua, MgCl₂ y la polimerasa de ADN *Taq* y se agregó a cada reacción en el ensayo. Las reacciones se trataron con 8-metoxipsoraleno y se expusieron a luz U/V para reducir la aparición de eventos de cebado falso. Se dispensaron seis alícuotas del artículo de prueba en tubos de reacción de PCR. Se procesaron tres alícuotas sin adición adicional de ADN de control. Las otras tres alícuotas se enriquecieron con 1, 10 y 100 ufc de ADN de micoplasma. Se procesaron cuatro alícuotas de control de reactivo; una reacción contenía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto la muestra. Los otros tubos de reacción se enriquecieron con 1, 10 y 100 ufc de ADN de micoplasma. Se utilizó una alícuota de ADN celular humano H9 purificado como control negativo. Se enriquecieron tres alícuotas de ADN de H9 con 1, 10 y 100 ufc de ADN de micoplasma. Después de la amplificación por TD-PCR, los amplicones se separaron mediante electroforesis en gel y se examinaron con luz ultravioleta.

c. El título del virus (TCID₅₀)

[0279] El virus de título por TCID₅₀ se realizó para determinar el título de virus PVS-RIPO en la agrupación de recolección PVS-RIPO, masa estéril purificada, y producto en viales final utilizando células indicadoras Hep-2C. Se agregaron cien microlitros (100 µL) de medio de dilución (RPMI1640 con L-glutamina 4 mM y FBS al 1%) a cada pocillo de placas de 96 pocillos separados (proporcionando placas separadas para cada estándar de referencia, control positivo y muestras de prueba). Las diluciones iniciales del estándar de referencia de poliovirus tipo 1 de la FDA, el Lote TA4 de la FDA (1:10.000), el poliovirus de control positivo tipo 1 de Sabin Original (1:1.000.000) y las muestras de prueba (1:1.000.000) se prepararon con el medio de dilución (RPMI1640 con 4 mM). L-Glutamina y FBS al 1%). Se añadió una alícuota de 100 µL de cada dilución final a cada uno de los ocho pocillos de la primera columna de la placa de 96 pocillos respectiva. Con una pipeta multicanal calibrada, se hicieron diluciones en serie 1:2 en cada placa de 96 pocillos extrayendo 100 µL de cada pocillo en la columna 1, transfiriéndolos a los pocillos adyacentes en la columna 2, mezclando bien y repitiendo el proceso para la siguiente columna en las series. Para el estándar de referencia de la FDA, la dilución se terminó en la columna 11, y la columna 12 se usó como pocillos de control negativo (que solo contienen medio de dilución). Se descartó el exceso de 100 µL de la columna 11. Para el control positivo y los artículos de prueba, el esquema de dilución continuó en una segunda placa de 96 pocillos, terminando en la columna 23, con la columna 24 utilizada como pocillos de control negativo. Se agregaron diez mil células Hep-2C en medio de crecimiento (RPMI1640 con L-glutamina 4 mM y FBS al 10%) (0,1 mL a 1x10⁵ células/mL) a cada pocillo de cada placa de 96 pocillos y se incubaron a 36 ± 1°C en una incubadora humidificada de CO₂ al 5% durante 10 días. Las placas se examinaron en busca de efectos citopáticos (CPE) los días 1, 3, 7 y 10. Una vez finalizado el ensayo, se ingresó el número de pocillos que exhibían CPE para cada muestra en los campos correspondientes de la plantilla del programa de cálculo proporcionada por la FDA. El programa calcula el TCID₅₀/mL para cada muestra, según la respuesta del estándar de referencia de poliovirus tipo 1 de la FDA. Se pueden usar otros estándares de cepas PVS-RIPO y Sabin bien caracterizados como virus de control positivo dependiendo de la disponibilidad del estándar de referencia de la FDA.

d. Estabilidad de virus por rct40

[0280] El ensayo determina el título viral de la agrupación de recolección de PVS-RIPO y producto en viales final, y los controles a 33°C, 36°C y 40°C por la formación de placas en células indicadoras Vero. El ensayo es una medida indirecta de la estabilidad del virus utilizando cambios relacionados con la temperatura en las propiedades de crecimiento como una indicación de posibles cambios genéticos. El ensayo se basa en la Serie de Informes Técnicos de la OMS N° 904, 2002. Establece que la suspensión de virus a granel filtrada debe probarse para determinar la propiedad de reproducirse a temperaturas de 36°C y 40°C en comparación con las cepas apropiadas rct/40- y rct/40+ de poliovirus del mismo tipo viral. Las temperaturas de incubación deben controlarse dentro de + 0,1°C. La masa filtrada pasaría la prueba si el título de la suspensión general y un patrón de referencia apropiado a 36°C fuera al menos 5,0 logaritmos mayor que el determinado a 40°C. Todos los títulos de los materiales de referencia deben estar dentro de los valores esperados.

[0281] Los títulos log₁₀ del virus a 36°C y 40°C se comparan y si la reducción logarítmica entre 36°C y 40°C es de al menos cinco, la muestra se determina que es sensible al crecimiento a 40°C y se considera que ha superado la prueba. El título de la muestra a 33°C también se determina para poder compararlo con el título de

la muestra previamente determinado a 33°C. Los controles positivos incluyen el control RCT 40+: Poliovirus 1 clon de Sabin S33 Lote L0406008 y Control RCT 40-: Poliovirus 1 Clon Sabin S71 Lote L0406004. El control negativo es DMEM que contiene FBS al 10%.

[0282] Las células Vero se sembraron y se dejaron crecer hasta alcanzarse 80 a 100 por ciento de confluencia. Se retiró el medio de crecimiento y se dosificó a las células Vero con 0,2 ml de muestra de prueba o de control. Después, las placas replicadas se incubaron a 33°C, 36°C y 40°C durante aproximadamente una hora. Se eliminó el inóculo y la hoja de células se cubrió con agarosa al 1,5%/2 X EMEM/FBS al 20%. Se dejó solidificar la agarosa y se incubaron placas replicadas a 33°C, 36°C y 40°C hasta que las placas se formaron completamente en los controles positivos (dos días). A continuación, las placas se cubrieron con agarosa/2 X EMEM que contenía rojo neutro en la oscuridad y se contaron las placas cuando el rojo neutro había teñido la hoja celular. Se determinó el valor medio de placa. El título (ufp/mL) se calculó usando la fórmula: Valor medio de placa x factor de dilución/volumen inoculado.

e. Secuencia de genoma completo

[0283] Análisis de la secuencia profunda integral dla masa purificada estéril de PVS-RIPO y se llevó a cabo lotes de producto en viales final.

1. Extracción de ARN y la transcripción inversa

[0284] Se aisló ARN genómico de las muestras de ensayo utilizando el QIAamp Viral RNA Mini Kit de Qiagen (Germantown, MD) de acuerdo con una versión modificada del protocolo estándar de Qiagen. Brevemente, se añadieron 560 µl de tampón AVL sin ARN portador a 140 µl de la muestra. La muestra se agitó con vórtex y se incubó a temperatura ambiente (23°C ± 2°C) durante 10 minutos. Se añadieron quinientos sesenta microlitros de etanol al 100% a la muestra, se agitó en vórtex y luego se añadió la mitad de la muestra (-630 µl) a la columna QIAamp Mini y se centrifugó durante un minuto a 6000 x g. El resto de la muestra se añadió a la columna y se repitió la centrifugación. Luego, la columna se lavó con dos tampones. Se realizó una elución doble de 40 µl de tampón de elución cada uno para un volumen final total de aproximadamente 80 µl. El ARN total se cuantificó fotoespectrométricamente usando un espectrofotómetro NanoDrop 8000. A continuación, el ARN se usó para preparar ADNc usando el sistema ThermoScript™ RT-PCR de Life Technologies (Carlsbad, CA). Brevemente, se incubaron 9 µl de ARN, 1 µl de cebador oligo (dT) 20 y dNTP a 65°C durante cinco minutos. Después de la incubación, se añadieron a la muestra tampón de síntesis de ADNc, DTT, RNase Out y ThermoScript RT y la muestra se incubó a 50°C durante 45 minutos y luego a 85°C durante cinco minutos para terminar la reacción. Se añadió ARNasa H a la muestra y se incubó a 37°C durante 20 minutos. El ADNc se cuantificó fotoespectrométricamente usando un espectrofotómetro NanoDrop 8000. A continuación, se realizó una reacción de la segunda cadena usando el kit de síntesis de segunda cadena NEBNext de New England BioLabs usando 5 µl del producto de ADNc. El ADNc se combinó con el tampón de síntesis de la segunda cadena y la mezcla de enzimas de síntesis de la segunda cadena y se incubó a 16°C durante 2,5 horas. El producto se purificó usando el kit de purificación QIAquick PCR de Qiagen y se eluyó en 30 µl de agua libre de nucleasas (NFW). El ds-cADN se cuantificó fotospectrométricamente usando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 y se almacenó a -20 ± 4°C para almacenamiento a corto plazo.

2. Preparación de la biblioteca

[0285] El dscADN preparado se usó para preparar bibliotecas para secuenciar en el Illumina HiSeq 2500. Se preparó una biblioteca a partir de cada muestra original. Las bibliotecas se prepararon utilizando el kit de preparación de bibliotecas Nextera XT de Illumina (San Diego, CA). La entrada total inicial de dscADN fue de 1 ng para cada biblioteca en base a los esfuerzos de búsqueda de rango de desarrollo anteriores utilizando entre 1 pg y 1ng de entrada ds-cADN. Las bibliotecas se prepararon siguiendo el protocolo de preparación de bibliotecas Illumina Nextera XT. En resumen, cada muestra se fragmentó enzimáticamente y se etiquetó (ligó) con secuencias adaptadoras simultáneamente utilizando la química de etiquetado de Nextera. El proceso fragmenta el ADN de entrada y agrega secuencias adaptadoras a los extremos de los fragmentos para su uso en el procesamiento posterior. A continuación, se neutralizó la enzima de ligación y se realizó una breve amplificación de 12 ciclos para añadir códigos de barras a cada muestra en los extremos 5' y 3'. A cada biblioteca se le asignó un código de barras diferente para identificar y delinear diferentes muestras durante el análisis. Las reacciones de PCR se limpiaron usando una doble ronda de lavados de perlas de AMPure XP y luego se eluyeron en tampón TE. Luego, cada una de las bibliotecas se analizó en el bioanalizador Agilent utilizando chips de ADN de alta sensibilidad para evaluar la calidad y cantidad de las bibliotecas. Las bibliotecas de muestras se almacenaron a -20 ± 4°C para almacenamiento a corto plazo.

3. Secuenciación y análisis de Illumina cADN

[0286] Para cada muestra, una célula de flujo rápido se ejecuta en el Illumina HiSeq 2500. Para cada célula de flujo, la biblioteca se desnaturalizó y se diluyó para el agrupamiento en instrumento. A continuación, se realizó una secuenciación de extremos emparejados de 2x150 pb en cada una de las bibliotecas utilizando la tecnología de secuenciación Illumina SBS y los reactivos. Los datos resultantes se demultiplexaron utilizando el software Illumina

HiSeq y luego se analizaron. Cada célula de flujo se ejecutó utilizando una sola muestra. Se generaron archivos FastQ para todas las fracciones secuenciadas. Samtools y el software mpileup se utilizan para convertir los archivos de salida de un formato SAM a BAM y los archivos de salida de índice para verlos en el Visor de genoma integrado. Se utilizó Mpileup con una bandera para aumentar la profundidad de cada posición con el fin de examinar las coberturas del virus y buscar posibles variaciones. Dado que se requirieron 12 ciclos de preamplificación por PCR para la preparación de la biblioteca Nextera XT, el umbral para llamar a una variante de secuencia viral en una posición determinada se estableció en $212 = 4096$ o el 0,1% de las lecturas, lo que sea mayor. Las variantes se definen de acuerdo con los siguientes criterios: si la profundidad de secuenciación en una posición base dada era igual o superior a 4.096.000, se llamaban variaciones potenciales superiores al 0,1%; si la profundidad era menor de 4.096.000 pero mayor de 4096, se llamaban variantes que superaban una frecuencia de 4096 o mayor; si la profundidad de la cobertura en una posición base determinada era inferior a 4096 lecturas, se llamaban variantes potenciales si consistían en más del 1,0%. La cobertura de lectura mínima por posición base se estableció en 4X (mínimo reglamentario), antes de que se requieran esfuerzos de secuenciación adicionales (Illumina, Sanger u otros métodos NGS).

[0287] Las lecturas fueron alineadas para cada muestra a la secuencia de referencia PVS-RIPO usando Bowtie (alineador de referencia de lectura corta). Los valores para el número total de bases, la cobertura y la longitud media de lectura y el porcentaje de lecturas alineadas con la referencia para cada muestra se calcularon y se compararon con especificaciones preestablecidas para la validez del ensayo. La cobertura del genoma estimada se encontró tomando el total de bases secuenciadas y dividiendo por el tamaño de la secuencia de referencia PVS-RIPO (7303 pares de bases). Se prepararon gráficos de cobertura en comparación con la ubicación en la referencia para cada muestra, así como gráficos de la longitud de lectura de la muestra para cada muestra. Se realizó un análisis para examinar las variantes en cada muestra en comparación con la secuencia de referencia. Se esperaban (y observaron) niveles elevados de polimorfismo en el extremo 5' (posiciones de base 1-34) de cada Lote viral, ya que se sabe que esta región del genoma de la poliomielitis (unión a VPg y tallo a/b) exhibe una alta variabilidad de secuencia en vivo. Las secuencias de lectura no alineadas fueron analizadas por NCBI BLASTn para determinar su identidad; se espera que las lecturas no alineadas, especialmente las de muestras virales no purificadas, sean de secuencias de ADN genómico o mitocondrial de células huésped Vero, aunque también se pueden observar secuencias raras de ADN humano u otras secuencias de ADN contaminantes de laboratorio.

f. Células huésped de ADN

[0288] La masa purificada estéril de PVS-RIPO Lote fue probado para carga de ADN genómico Vero utilizando un amplicón de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa basada en TaqMan® (qPCR) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) de orientación a la duplicación intragenética del gen de nectina-la específico *Cercopithecus aethiops* (Vero), un gen de copia única (GenBank® N° de acceso AF308635). El límite de detección para el ensayo fue <5 ng de ADN genómico de Vero por ml. Se usó ADN genómico de células Vero (ADNg) como control positivo (100 ng - 10 pg) y se usó una punta del artículo de prueba con -2250 copias del control positivo interno (IPC) como control de inhibición de la PCR. Se realizaron controles negativos sin control de prueba (NTC) usando agua libre de nucleasas (NFW) y los controles de extracción de ácido nucleico para cada muestra contenían un equivalente de ~10.000 copias del IPC por reacción. El IPC utiliza una sonda marcada con VIC, lo que permite cuantificar tanto la prueba como los amplicones del IPC en la misma reacción de PCR. Los resultados de IPC del método de ADN de la célula huésped Vero también sirven como controles de extracción e inhibición para los métodos RT-qPCR de cuantificación viral realizados concomitantemente.

[0289] qPCR en tiempo real es un método de amplificación cuantitativa sensible que puede ser utilizado para el análisis de la expresión génica, genotipado, patógeno de detección/cuantificación, la mutación de cribado y detección de ADN precisa, incluyendo la cuantificación de bajo número de copias de ADN residual o ARN en una muestra. Se utilizó un instrumento de 96 pocillos Applied Biosystems 7900HT para detectar la acumulación de producto de amplificación de PCR de forma continua durante el proceso de amplificación, lo que permite una cuantificación precisa de la diana en la fase exponencial de la PCR. El uso de un bloque de 96 pocillos permite mayores volúmenes de reacción que un bloque de 384 pocillos y, por lo tanto, aumenta la sensibilidad del ensayo para estudios de ADN residual y ADN contaminante.

[0290] La química TaqMan® qPCR utiliza una sonda de doble etiquetado oligonucleótido fluorogénico TaqMan®. La sonda TaqMan® utilizada para la detección de ADN genómico humano está compuesta por un extremo oligonucleotídico marcado con un tinte fluorescente con un máximo de emisión distinguible. El terminal 5' de la sonda se marcó con un colorante indicador, 6-FAM, y el terminal 3' de la sonda se marcó con un colorante de extinción. El amplicón de control positivo interno (IPC) utilizó una sonda marcada con VIC con un atenuador no fluorescente para evitar la interferencia de emisión del amplicón diana. La sonda de oligonucleótidos era homóloga a una secuencia diana dentro del amplicón de PCR del gen de nectina-la de *Cercopithecus aethiops* (Vero) y es altamente específica para las células Vero. Una alta relación de rechazo de Vero a gADN humano se logró mediante la utilización de un evento de secuencia de nueve bases de duplicación único para *C. aethiops* que no está presente en el ADNg humano, como parte de la diana de la sonda. Mientras está intacto y en solución libre, el tinte de extinción de la sonda reduce la emisión del indicador de fluorocromo a través de FRET. Durante la fase de extensión de una reacción de PCR TaqMan®, la sonda se escindió por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq, liberando el colorante indicador

de la sonda y permitiendo un aumento en la emisión del indicador.

[0291] La cuantificación precisa de diana inicial en cada reacción de PCR se produce durante la fase exponencial (log2) de la amplificación antes del agotamiento reactivo o inhibición de subproducto de la reacción. Sin embargo, debido a los límites de señal a ruido de la reacción y la fluorescencia de fondo general, los datos más precisos se generan típicamente al final de la fase logarítmica. La fluorescencia del indicador normalizada se representa en función del tiempo, representada por el número de ciclo de PCR. Los números de copia diana o los valores de masa se generan asignando un umbral de fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto del ciclo en donde la gráfica de amplificación de cada muestra alcanza el umbral (definido como el ciclo de umbral o Ct). Los valores del ciclo umbral para cada reacción se utilizan para cuantificar la cantidad de diana inicialmente contenida dentro de cada reacción del artículo de prueba en comparación con los estándares conocidos.

[0292] La masa purificada estéril PVS-RIPO fue probado para carga de ADN genómico VERO utilizando un amplicón qPCR basado en TaqMan® (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) dirigido a la duplicación intragénica de gen nectin-la específico *Cercopithecus aethiops* (VERO), un gen de copia única (GenBank AF308635). Los cebadores TaqMan® y una sonda marcada con colorante fluorescente dual están diseñados con el software ABI Primer Express (versión 2.0.0). El amplicón de 111 pb consta de un cebador directo: 5'-(CCT CTG CCC AGC GTG AAG, SEQ ID NO: 5); cebador inverso: 5'-(CAC AGA CAC GCC CAT GGA T, SEQ ID NO: 6); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(CAC CCA AGC CAC CAA TGG CTC CAA)-[Quencher], SEQ ID NO: 7. Los cebadores y la sonda se diluyeron a 10 y 5 pmol/μl respectivamente con agua libre de nucleasas (NFW). La mezcla de reacción consistió en 25 μL TaqMan® PCR 2X Master Mix con colorante UNG y ROX, 1,5 μL de cebadores/sonda de amplicón IPC (o NFW), 0,5 μL de ADN de IPC (o NFW), 1 μL de cebador directo, 1 μL de cebador inverso, 1 μL de sonda TaqMan® y 20 μL de muestra (50 μL de volumen de reacción final). Las mezclas de reacción se cargaron en una placa de 96 pocillos, se cubrieron con una película óptica y se amplificaron con un sistema de detección de secuencia de 96 pocillos ABI modelo 7900HT usando un perfil de qPCR de 2 pasos (2:00 min, 50,0°C; 10:00 min, 95,0°C; 40 ciclos de 0:15 min, 95,0°C; 1:00 min, 60,0°C). Una curva estándar de ADN genómico Vero preparada a partir de un extracto de ADN purificado y cuantificado ópticamente se diluyó en serie 10 veces en NFW de 100 ng a 10 pg. Rara vez se observa una respuesta positiva del estándar de 10 pg/rxn, equivalente a aproximadamente 2,6 copias de genes/rxn. El ADN total de la muestra de prueba se extrajo utilizando un método de minipreparación de columna giratoria de detergente Qiagen aprobado antes de la reacción de qPCR. La inhibición potencial de la PCR debido a la composición de la muestra se controló añadiendo -2250 copias equivalentes del ADN diana de IPC en las muestras de artículos de prueba extraídas apropiadas (es decir, no en muestras previamente enriquecidas con IPC para controlar la eficiencia de extracción). La eficacia de la extracción se controló mediante el uso de muestras de prueba enriquecidas con el equivalente a 10.000 copias de ADN de IPC. Se realizaron muestras de control negativo (NTC) para la prueba utilizando NFW. Todos los estándares, muestras de prueba, picos de IPC y reacciones de PCR de control se realizaron por duplicado. Se deben cumplir los controles del método y los criterios de idoneidad del sistema para informar los resultados de la muestra, que incluyen: puntajes NTC Ct, puntajes Ct de la curva estándar y ajuste (R2), extracción de IPC y recuperación de picos de interferencia. El nivel de contaminación del ADN genómico inicial en la muestra de prueba se calculó usando el software ABI comparando el valor del ciclo del umbral de la muestra con la ecuación de la curva estándar de ADN Vero.

[0293] La agrupación de recolección de virus de PVS-RIPO fue enzima Benzonase® tratada antes de la purificación. El tratamiento con nucleasa genera típicamente fragmentos de oligonucleótidos promedio ≤ 12 nucleótidos, con la población de fragmentos posteriores a la digestión siguiendo una distribución chi. El amplicón qPCR de nectina-1 de *C. aethiops* (línea celular Vero) usado en este ensayo tiene una longitud de 111 pb. Por lo tanto, el resultado generado a partir del ensayo representa una estimación del peor de los casos para la concentración de ADN de la célula huésped residual basada en la masa de ADN genómico haploide intacto de *C. aethiops* (~ 3,88 pg/copia haploide).

RT-qPCR para el virus de la poliomielitis IRES

[0294] El Lote del producto en viales final PVS-RIPO se analizó para detectar la presencia de secuencias de IRES de tipo 1 y tipo 2 del virus de la poliomielitis de tipo salvaje utilizando un amplicón de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa basada en TaqMan® (RT-qPCR) "POSA" dirigido a la secuencia IRES nativa de Polio. La región IRES en PVS-RIPO se derivó de HRV-2 y es heteróloga a las secuencias de sonda y cebador de amplicón POSA. El límite de detección para el ensayo fue <100 copias de Polio IRES de tipo salvaje por 2,6x10⁷ copias de PVS-RIPO en cada reacción de PCR. El número de copia del artículo de prueba PVS-RIPO se determinó antes de la prueba mediante el uso de amplicones TaqMan "PVS1" y "PO1" dirigidos a las regiones HRV-2 IRES y poliproteína CDS en PVS-RIPO que se describen en otra parte. El LOD del método se verificó en el momento del ensayo mediante la adición de muestras con el virus de la poliomielitis tipo 1 de Sabin. Se usó ARN viral de Polio Sabin tipo 1 extraído para generar la curva estándar (100 pg a 1 fg por reacción) y se usó un pico de 100 copias (~ 0,41 fg) con ARN de Polio Sabin tipo 1 del artículo de prueba como amplicón control de la inhibición y como medio para establecer el límite de detección para el ensayo. La muestra de prueba de ARN viral se extrajo utilizando un método mini-prep aprobado de Qiagen antes de la reacción de qPCR. Todos los estándares y las reacciones de las muestras de prueba se realizaron por duplicado. El control negativo fue una reacción sin control de prueba (NTC) con agua libre de nucleasas. Los controles generales de inhibición y extracción de PCR consistieron en ADN de control positivo interno (IPC) heterólogo y cebadores específicos de IPC asociados y sonda analizados con los extractos de

muestra durante el análisis de qPCR TaqMan realizado concomitantemente para el ADN de la célula huésped Vero residual.

[0295] Un instrumento de 96 pocillos de Applied Biosystems 7900HT se utiliza para detectar la acumulación de PCR de amplificación de producto de forma continua durante el proceso de amplificación, lo que permite la cuantificación precisa de destino en la fase exponencial de la PCR. El uso de un bloque de 96 pocillos permite mayores volúmenes de reacción que un bloque de 384 pocillos y, por lo tanto, aumenta la sensibilidad del ensayo para estudios de ADN residual y ARN contaminante. La química qPCR de TaqMan® utiliza una sonda de oligonucleótido fluorogénico TaqMan® de doble marcaje. La sonda TaqMan® utilizada para la detección de ADN genómico humano está compuesta por un extremo oligonucleotídico marcado con dos tintes fluorescentes con máximos de emisión distinguibles. El extremo 5' de la sonda se marca con un tinte indicador, 6-FAM, y el extremo 3' de la sonda se marca con un tinte de extinción no fluorescente. La sonda de oligonucleótidos es homóloga a una secuencia diana interna dentro de la región IRES de tipo 1 y tipo 2 de Polio y no tiene reactividad cruzada con el IRES derivado de HRV-2 en PVS-RIPO. Se logra una alta proporción de rechazo de las secuencias HRV-2 IRES a Polio IRES utilizando una región altamente heteróloga de Polio IRES que no está presente en HRV-2. Mientras está intacto y en solución libre, el tinte de extinción de la sonda reduce la emisión del indicador de fluorocromo a través de FRET. Durante la fase de extensión de una reacción de PCR TaqMan®, la sonda es escindida por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq, liberando el colorante indicador de la sonda y permitiendo un aumento en la emisión del indicador. La cuantificación precisa de la diana inicial en cada reacción de PCR se produce durante la fase exponencial (log2) de la amplificación antes del agotamiento del reactivo o la inhibición del subproducto de la reacción. Sin embargo, debido a los límites de señal a ruido de la reacción y la fluorescencia de fondo general, los datos más precisos se generan típicamente al final de la fase logarítmica. La fluorescencia del indicador normalizada se representa en función del tiempo, representada por el número de ciclo de PCR. Los números de copia diana o los valores de masa se generan asignando un umbral de fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto del ciclo en donde la gráfica de amplificación de cada muestra alcanza el umbral (definido como el ciclo de umbral o Ct). Los valores del ciclo umbral para cada reacción se utilizan para cuantificar la cantidad de diana inicialmente contenida dentro de cada reacción del artículo de prueba en comparación con los estándares conocidos. Se deben cumplir los controles del método y los criterios de idoneidad del sistema para informar los resultados de la muestra, que incluyen: puntajes de Ct de NTC, puntajes de Ct de curva estándar y ajuste (R2) y recuperaciones de ARN de poliomielitis de tipo salvaje.

[0296] El producto en viales final de PVS-RIPO fue probado para secuencias de ADNc IRES de tipo 1 y de tipo 2 de polio de tipo salvaje (o cepa de la vacuna) utilizando un amplicón basado en TaqMan® RT-qPCR (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) dirigido al IRES de polio. Los cebadores TaqMan® y una sonda marcada con colorante fluorescente se diseñaron con el software ABI Primer Express (Versión 2.0.0). El amplicón de 109 pb consta de un cebador directo: 5'-(TTG GCG GCC TAC CTA TGG, SEQ ID NO: 11); cebador inverso: 5'-(TGG GAT TAG CCG CAT TCA, SEQ ID NO: 12); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(AGC CTA TTG AGC TAC ATA AGA ATC CTC CGG C)-[Quencher], SEQ ID NO: 13. Los cebadores y la sonda se diluyeron a 10 y 5 pmol/μL respectivamente con agua libre de nucleasas (NFW). La mezcla de reacción consistió en 25 μL de TaqMan® RT-PCR Universal Master Mix sin UNG, 1,5 ml de NFW, 1 μL de cebador directo, 1 μL de cebador inverso, 0,5 μL de sonda TaqMan® y 20 μL de muestra (que contiene ~2,6 x 10⁷ copias de PVS-RIPO), para un volumen de reacción final de 50 μL. Las mezclas de reacción se cargaron en una placa de 96 pocillos, se cubrieron con película óptica y se amplificaron con un sistema de detección de secuencia de 96 pocillos ABI modelo 7900HT utilizando un perfil de qPCR de 4 pasos (2:00 min, 50,0°C; 45:00 min, 60,0°C; 5:00 min, 95,0°C; 45 ciclos de 0:20 min, 94,0°C; 1:00 min, 62,0°C). Una curva estándar de la cepa de Polio Sabin tipo 1 hecha de ARN viral purificado (OMS estándar, BDP Parte N° 30374) se diluyó en serie 10 veces en NFW de 100 pg a 1 fg (~ 2,43 x 10⁷ a ~243 copias/rxn).

RT-qPCR para HRV-2 IRES y poliproteína de polio

[0297] El Lote de producto en viales final de PVS-RIPO fue probado para determinar la carga de ARN PVS-RIPO HRV-2 IRES (PVS-1) y poliproteína de polio (PO1) usando un TaqMan® RT-qPCR (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) basado en amplicón dirigido a los genes HRV-2 IRES (PVS-1) y poliproteína de poliomielitis (PO1) en PVS-RIPO.

[0298] Las sondas de oligonucleótidos de TaqMan® son homólogas a secuencias diana internas dentro de los amplicones IRES derivados por PVSRIPO HRV-2 y RT-PCR de poliproteína de polio y cuando se usan juntos son específicos para PVS-RIPO. Dado que PVS-RIPO es un virus de ARN monocatenario, los extractos de muestra se transcriben de forma inversa a ADNc utilizando los cebadores de amplificación como parte del protocolo del termociclo antes de la amplificación de qPCR. Mientras está intacto y en solución libre, el tinte de extinción de la sonda reduce la emisión del indicador de fluorocromo a través de FRET. Durante la fase de extensión de una reacción de PCR TaqMan®, la sonda es escindida por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq, liberando el colorante indicador de la sonda y permitiendo un aumento en la emisión del indicador.

[0299] El ABI Prism 7900HT utiliza un cabezal de escaneado de doble eje para distribuir la luz de excitación de una de iones de argón (488 nm) de láser para los 96 pocillos. Un generador de imágenes CCD mide el espectro de fluorescencia y la intensidad de cada pocillo para generar datos espectrales en tiempo real durante la amplificación

por PCR. El software de detección de secuencia ABI (SDS) deconvoluciona la intensidad de fluorescencia de los tintes informador, extintor y normalizador (ROX) y calcula el aumento en la intensidad de emisión del informador normalizado durante el transcurso de la amplificación. El control negativo fue una reacción sin control de prueba (NTC) con agua libre de nucleasas, mientras que los controles generales de inhibición y extracción de la PCR consisten en un control positivo interno heterólogo (IPC) y un amplicón IPC asociado utilizado con los extractos de muestra y realizado de forma concomitante durante la amplificación del ADN de la célula huésped Vero.

[0300] La cuantificación precisa de diana inicial en cada reacción de PCR se produce durante la fase exponencial (log2) de la amplificación antes de agotamiento reactivo o inhibición de subproducto de la reacción. Sin embargo, debido a los límites de señal a ruido de la reacción y la fluorescencia de fondo general, los datos más precisos se generan típicamente al final de la fase logarítmica. La fluorescencia del indicador normalizada se representa en función del tiempo, representada por el número de ciclo de PCR. Los números de copia diana o los valores de masa se generan asignando un umbral de fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto del ciclo en donde la gráfica de amplificación de cada muestra alcanza el umbral (definido como el ciclo de umbral o Ct). Los valores del ciclo umbral para cada reacción se utilizan para cuantificar la cantidad de diana inicialmente contenida dentro de cada reacción del artículo de prueba en comparación con los estándares conocidos.

[0301] Para realizar el ensayo en los cebadores BDP, TaqMan® y una sonda marcada con colorante fluorescente se diseñaron con el software ABI Primer Express (versión 2.0.0). El amplicón HRV-2 IRES (PVS-1) de 71 pb consta de un cebador directo: 5'-(AAC CCA ATG TGT ATC TAG TCG TAA TGA, SEQ ID NO: 1); cebador inverso: 5'-(TGA AAC ACG GAC ACC CAA AG, SEQ ID NO: 2); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(CAA TTG CGG GAT GGG ACC AAC T)-[BHQ], SEQ ID NO: 3. El amplicón de 70 pb para PO1 consta de un cebador directo: 5'-(TTG GTG GGA ACG GTT CAC A, SEQ ID NO: 8); cebador inverso: 5'-(TCA CCT TGA CTC TGA GTG AAG TAT GA, SEQ ID NO: 9); y sonda TaqMan®: 5'-[6FAM]-(TTG CAG CGG CCC TGA AGC G)-[BHQ], SEQ ID NO: 10. Los cebadores y las sondas se diluyeron a 10 y 5 pmol/μl respectivamente con agua libre de nucleasas (NFW). La mezcla de reacción consistió en 25 μl TaqMan® 1 paso RT PCR 2X Master Mix con colorante ROX, 1 μl de inhibidor de RNasa, 1 μl de NFW, 1 μl de cebador directo, 1 μl de cebador inverso, 1 μl de sonda TaqMan® y 20 μl de muestra de prueba (50 μl de volumen de reacción final). Las mezclas de reacción se cargaron en una placa de 96 pocillos, se cubrieron con película óptica y se amplificaron con un sistema de detección de secuencia de 96 pocillos ABI modelo 7900HT utilizando un perfil de qPCR de 3 pasos (2:00 minutos, 50,0°C; 30 minutos a 48,0°C (paso de RT); 10:00 minutos, 95,0°C; 40 ciclos de 0:15 minutos, 95,0°C; 1:00 minutos, 60,0°C). Se hicieron curvas estándar de ADNc de amplicón a partir de ADN plasmídico PVS-RIPO y se diluyeron en serie 10 veces en NFW de 100 pg a 1 fg. Las muestras de control estándar se procesaron por duplicado, mientras que se utilizaron tres diluciones en serie log10 (diluciones de 10 a 1000 veces) de los diversos extractos de muestras de prueba PVS-RIPO para verificar el rendimiento del paso de RT y cuantificar los números de copias diana virales en la dilución de la muestra en 1000 veces. El control y la muestra de ARN viral se extrajeron utilizando un método de mini-preparación de Qiagen siguiendo un procedimiento aprobado antes de la reacción RT-qPCR. Los controles generales de inhibición y extracción de la PCR consistieron en ADN de control positivo interno (IPC) heterólogo y cebadores específicos de IPC asociados y sondas analizadas con los extractos de muestra durante el análisis TaqMan qPCR realizado concomitantemente para el ADN de la célula huésped Vero residual. Se realizaron muestras de control negativo con tampón (NFW, sin plantilla) para la prueba. Ambos amplicones PVS-RIPO se procesaron en la misma placa de 96 pocillos para eliminar la variación entre ensayos. La concentración de ARN de PVS-RIPO en las muestras de prueba se calculó usando el software ABI 7900HT comparando el valor del ciclo umbral de la muestra con la ecuación de la curva estándar de ADN plasmídico. La conversión de masa a número de copias virales se basa en la masa del plásmido PVS-RIPO (estándar de PCR) de ~10,8 ag/copia y la masa del genoma viral PVS-RIPO de ~4,1 ag/copia.

Virus de partículas por ME

[0302] Microscopía electrónica de transmisión de mancha negativa (TEM) se utiliza para cuantificar el número de partículas virales/ml en una muestra de ensayo (Producto en viales final PVS-RIPO). Se fotografiaron diez espacios de cuadrícula y se enumeró el número de partículas virales en cada sección y se utilizó para calcular las partículas virales/mL.

[0303] La muestra de ensayo se fijó por dilución con un volumen igual de fijador (8% de formaldehído en 2X PBS). La muestra de prueba (0,5 μl) se colocó en una cuadrícula revestida EMS CF200-Cu preparada y se dejó secar al aire. A continuación, la muestra se lavó tres veces con 5 μl de agua bidestilada (DDH2O) para lavar el tampón de sal/fosfato de la muestra. A continuación, se añadió una solución acuosa de acetato de uranilo al 0,5% (5 μl) a la cuadrícula y se dejó secar al aire. La cuadrícula se examinó mediante microscopía electrónica. Se fotografiaron diez espacios de cuadrícula y el número de partículas virales se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$N^{\circ} \text{ de partículas de virus (pv)} = (\text{promedio } N^{\circ} \text{ pv}) \times (\text{área de cuadrícula/área de foto}) \times (1 \text{ mL/la cantidad de virus añadido en } \mu\text{L})$$

Prueba de estabilidad para el producto en viales final Lote L1402001

[0304] Prueba de estabilidad del producto en viales final de PVSRIPO Lote L1402001 (almacenado a ≤ -70°C) incluye

apariciencia, título de virus por TCID₅₀, endotoxina, pH y carga biológica. Todas las pruebas se realizan a los 12, 24, 36, 48, 60 y 72 meses. La titulación del virus se realiza a los 6 meses. La carga biológica no se realizará en el punto de tiempo cero porque la esterilidad ya se realiza como parte de la liberación del producto.

- 5 **[0305]** Los resultados de estabilidad disponibles se incluyen en la Tabla 10. Basándose en los resultados de estabilidad TCID₅₀, el producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001 es estable durante al menos 6 meses a ≤ -70°C.

Tabla 10: Resultados de estabilidad para producto en viales final de PVS-RIPO Lote L1402001, almacenado a ≤ -70°C

Prueba	Especificación	Punto de tiempo	
		0 meses	6 meses
Apariencia	Líquido transparente a translúcido, incoloro sin evidencia de partículas	Líquido incoloro transparente a translúcido sin partículas QC-053194	No requerido
Título de virus por TCID ₅₀	Informe de resultados	4,48 X 10 ⁹ TCID ₅₀ /mL QC-053192	3,98 X 10 ⁹ TCID ₅₀ /mL QC-053848
Endotoxina/LAL	≤ 10 UE/mL	<0,5 UE/ml QC-053191	No requerido
pH	7,4 ± 0,5	7,2 QC-053196	No requerido
Biocarga	Sin crecimiento	Sin crecimiento (esterilidad) QC-053197	No requerido

LISTA DE SECUENCIAS

[0306]

<110> Estados Unidos de América, representado por el
 Secretario, Departamento de Salud y Servicios Humanos
 Broadt, Trevor Lane
 Shaban, Samir Hussein
 Xie, Yueqing
 Zhu, Jianwei Sean
 Mitra, George

<120> PROCESOS PARA LA PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPOSICIONES QUE CONTIENEN
 ÁCIDO NUCLEICO

<130> 4239-96897-02

<150> US 62/173.777

<151> 2015-06-10

<160> 13

<170> Patente en versión 3,5

<210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos

<400> 1

aacccaatgt gtatctagtc gtaatga 27

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 2
 tgaaacacgg acacccaaag 20
 5
 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 3
 caattgcggg atgggaccaa ct 22
 15
 <210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos
 25
 <400> 4
 gtaaaacgac ggccagt 17
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleotídicos sintéticos
 35
 <400> 5
 cctctgcca gcgtgaag 18
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos
 45
 <400> 6
 cacagacag cccatggat 19
 50
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 7
 cacccaagcc accaatggct ccaa 24
 60
 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

5 <223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 8
 ttggtgggaa cggttcaca 19
 10 <210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 9
 tcaccttgac tctgagtga gatatga 26
 20 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 10
 ttgcagcggc cctgaagcg 19
 30 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 11
 ttggcggcct acctatgg 18
 40 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 12
 tgggattagc cgcattca 18
 50 <210> 13
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótidos sintéticos
 <400> 13
 60 agcctattga gctacataag aatcctcc gg c 31

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de purificación para obtener una composición que comprende un virus vivo, que comprende:

- 5 separar un fluido acuoso que comprende el virus vivo en una columna de cromatografía de separación por tamaños,
 detectar por reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR) una o más secuencias de ácido nucleico encontrado en el virus vivo en al menos una fracción del eluato de dicha columna de separación por tamaños;
 recoger al menos una fracción positiva del eluato de dicha columna de separación por tamaños que contiene una o más secuencias de ácido nucleico encontradas en el virus vivo;
 10 agrupar la al menos una fracción positiva;
 separar la al menos una fracción positiva combinada en una columna de cromatografía de intercambio aniónico que no se une significativamente al virus, y recolectar en al menos una fracción positiva del eluido de flujo continuo de dicha columna de cromatografía de intercambio aniónico que contiene el virus vivo en
 15 donde el virus es PVS-RIPO, y
 en donde el proceso de purificación no incluye un paso que utilice como resina CDM de unión a virus.

2. Un proceso de purificación según la reivindicación 1, en donde:

- 20 la columna de cromatografía es una columna de cromatografía de separación de flujo rápido (FF) Sepharose 6, y
 la columna de cromatografía de intercambio aniónico es una columna de cromatografía de intercambio aniónico de resina Super Q 650M.

25 3. Un proceso de purificación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además los pasos preliminares de:

- introducir ADN plasmídico que comprende una secuencia de plantilla del virus vivo en una o más células bacterianas, generando así una o más células bacterianas transformadas con el ADN plasmídico;
 30 hacer crecer un cultivo en fase sólida de una o más células bacterianas transformadas, generando así una o más colonias bacterianas;
 detectar la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico de la secuencia de plantilla del virus en al menos una de las una o más colonias bacterianas;
 propagar un cultivo de células bacterianas de la al menos una colonia bacteriana en donde se detectó la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico; y
 35 extraer el ADN plasmídico que comprende la secuencia de plantilla del virus de las células bacterianas propagadas, en donde las células bacterianas no se congelan entre las etapas de propagación y extracción;
 infectar células huésped de mamíferos con el ADN plasmídico;
 cultivar las células huésped de mamíferos con el ADN plasmídico;
 40 obtener medio de cultivo celular líquido a partir de células huésped de mamífero, restos de células huésped de mamífero, o ambos, que comprenden un virus vivo; e
 incubar el medio de cultivo celular líquido de las células huésped de mamíferos, restos de las células huésped de mamíferos o ambos, con una enzima nucleasa capaz de digerir ácidos nucleicos libres en solución pero no ácidos nucleicos virales encapsulados, generando así un líquido acuoso que comprende el virus vivo.

45 4. El proceso de purificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el proceso no contiene ninguna etapa de separación por cromatografía adicional después de la etapa de separación por cromatografía de intercambio aniónico, y/o en donde el proceso contiene dos etapas de separación por cromatografía.

50 5. El proceso de purificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además concentrar por diafiltración el virus vivo eluido en el eluato de flujo continuo.

 6. El proceso de purificación de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el rendimiento de purificación del proceso de purificación es al menos 50%, donde el rendimiento de virus vivo del proceso es al menos 5×10^{11} ufp, donde la infectividad del virus vivo eluido en el eluido de flujo continuo es al menos 1×10^{12} dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID)₅₀, o combinaciones de las mismas.

 7. El proceso de purificación de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-6, en donde el fluido acuoso que comprende el virus vivo es un medio de cultivo celular líquido obtenido por un proceso que comprende cultivar, en una o más rondas de cultivo celular, hospedante células infectadas con el virus y, opcionalmente,
 60 en donde el medio de cultivo celular líquido se obtiene mediante el proceso que comprende además, después del cultivo, separar el medio de cultivo celular líquido de las células huésped, los restos de las células huésped o ambos, y/o
 en donde el medio de cultivo celular se obtiene mediante el proceso que comprende además incubar el medio de cultivo celular líquido con una enzima nucleasa capaz de digerir ácidos nucleicos libres en solución pero
 65 no ácidos nucleicos virales encapsulados.

8. El proceso de purificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4-7, en donde las células huésped infectadas con el virus se obtienen mediante un proceso que comprende:

- 5 introducir ADN plasmídico que comprende una secuencia de plantilla del virus en una o más células bacterianas, generando así una o más células bacterianas transformadas con el ADN plasmídico;
hacer crecer un cultivo en fase sólida de una o más células bacterianas transformadas, generando así una o más colonias bacterianas;
10 detectar la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico de la secuencia de plantilla del virus en al menos una de las una o más colonias bacterianas;
propagar un cultivo de células bacterianas de la al menos una colonia bacteriana en donde se detectó la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico;
15 extraer el ADN plasmídico que comprende la secuencia de plantilla del virus de las células bacterianas propagadas, en donde las células bacterianas no se congelan entre las etapas de propagación y extracción;
generar ARN desnudo del virus mediante traducción in vitro de la secuencia de plantilla; e
introducir el ARN desnudo del virus en las células huésped, generando así células huésped infectadas con el virus.

9. El proceso de purificación de la reivindicación 3 u 8, en donde el plásmido es un plásmido bacteriano que comprende un origen de replicación de E. coli, y en donde una o más células bacterianas son células de E. coli, y/o en donde las células huésped son células huésped de mamíferos, y/o en donde las células huésped de mamífero son células Vero.

10. Un método para generar un plásmido estable que comprende una molécula de ácido nucleico de plantilla viral, que comprende:

- introducir ADN plasmídico que comprende la molécula de ácido nucleico de plantilla viral en una o más células huésped, generando así una o más células huésped transformadas con el ADN plasmídico;
hacer crecer un cultivo en fase sólida de una o más células transformadas, generando así una o más colonias;
30 detectar la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico de plantilla viral en al menos una de las una o más colonias;
propagar un cultivo de células de al menos una colonia en donde se detectó la presencia de una o más secuencias de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico de plantilla viral; y
extraer el ADN plasmídico que comprende la molécula de ácido nucleico de plantilla viral de las células propagadas, en donde las células transformadas no se congelan entre las etapas de propagación y extracción;
35 en donde la célula huésped es la cepa E. coli K12; y
en donde la molécula de ácido nucleico de plantilla viral codifica PVS-RIPO.

11. Una composición que comprende un plásmido de plantilla viral, en donde la composición comprende menos del 25% de plásmidos con eventos de inserción de transposones, menos del 25% de plásmidos dimerizados, menos del 25% de plásmidos vacíos sin una secuencia de plantilla viral, o combinaciones de los mismos; en donde el plásmido de plantilla viral es PVS-RIPS.

45

FIG. 1A

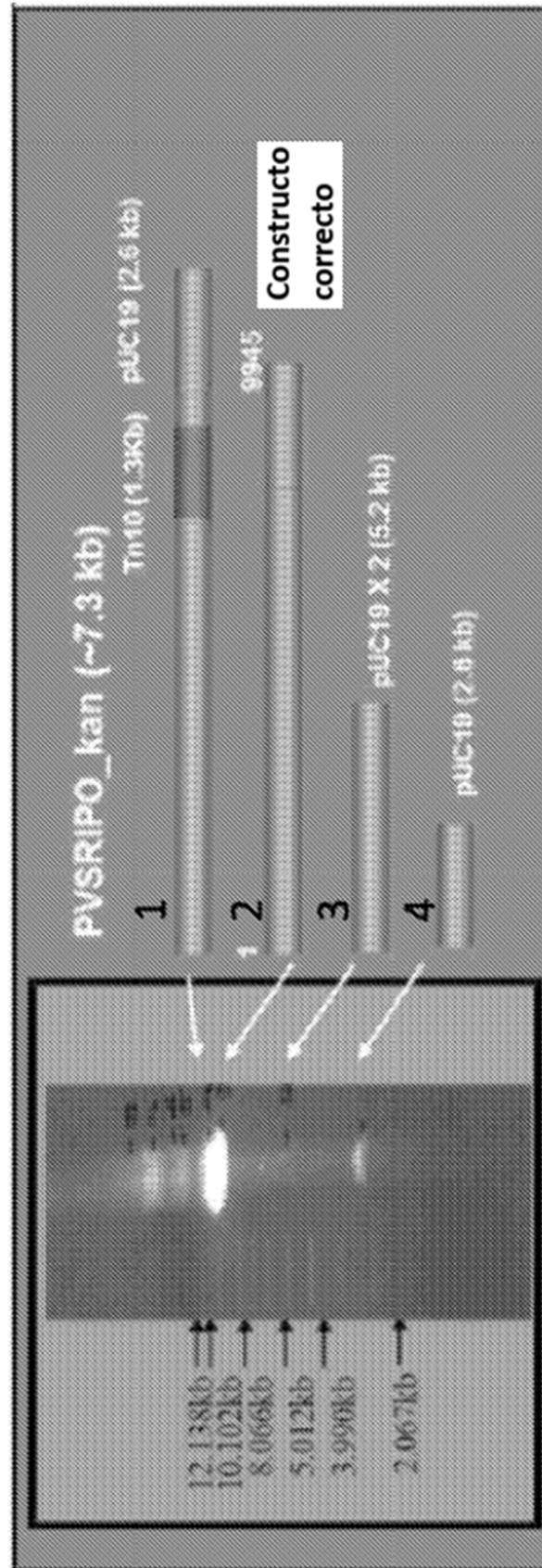


FIG. 1B

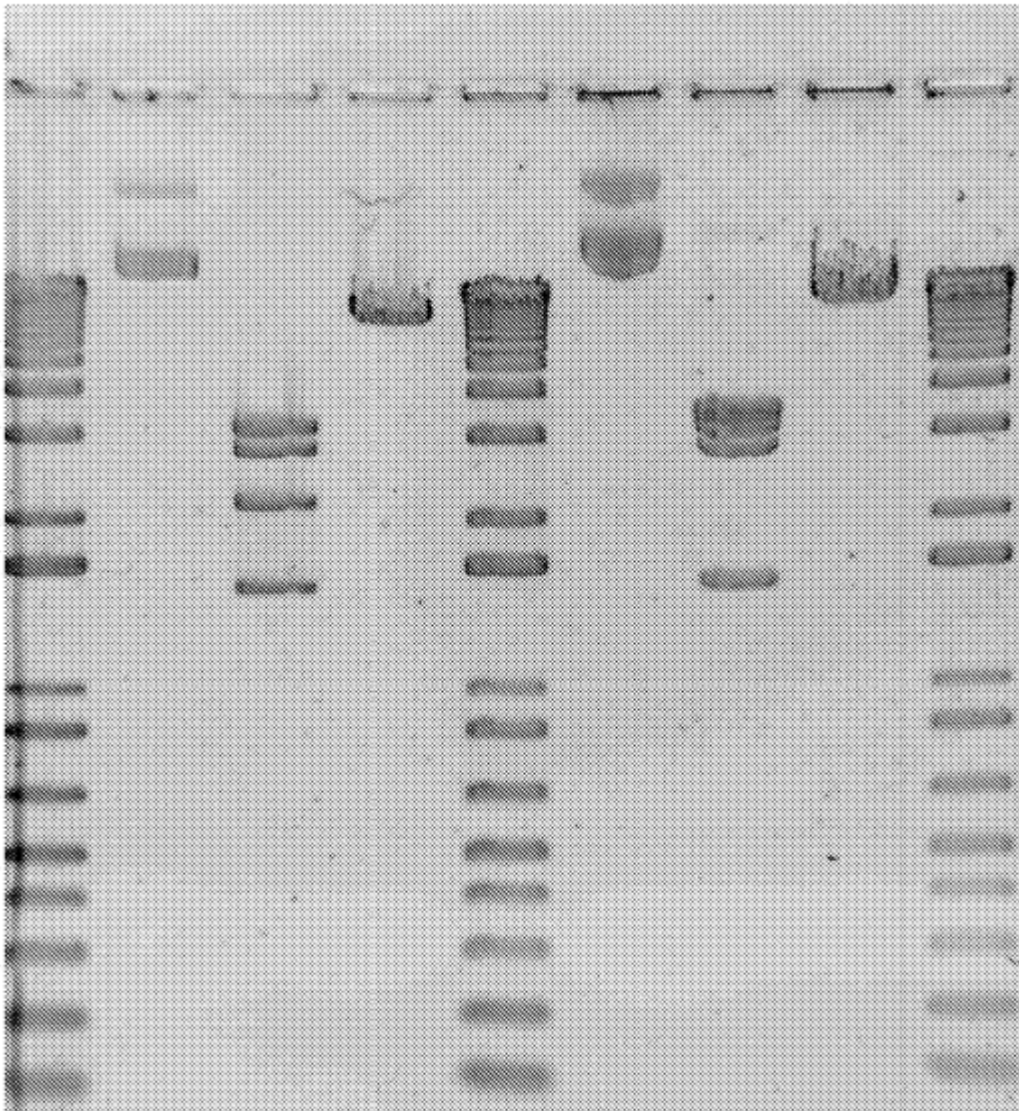


FIG. 2



FIG. 3

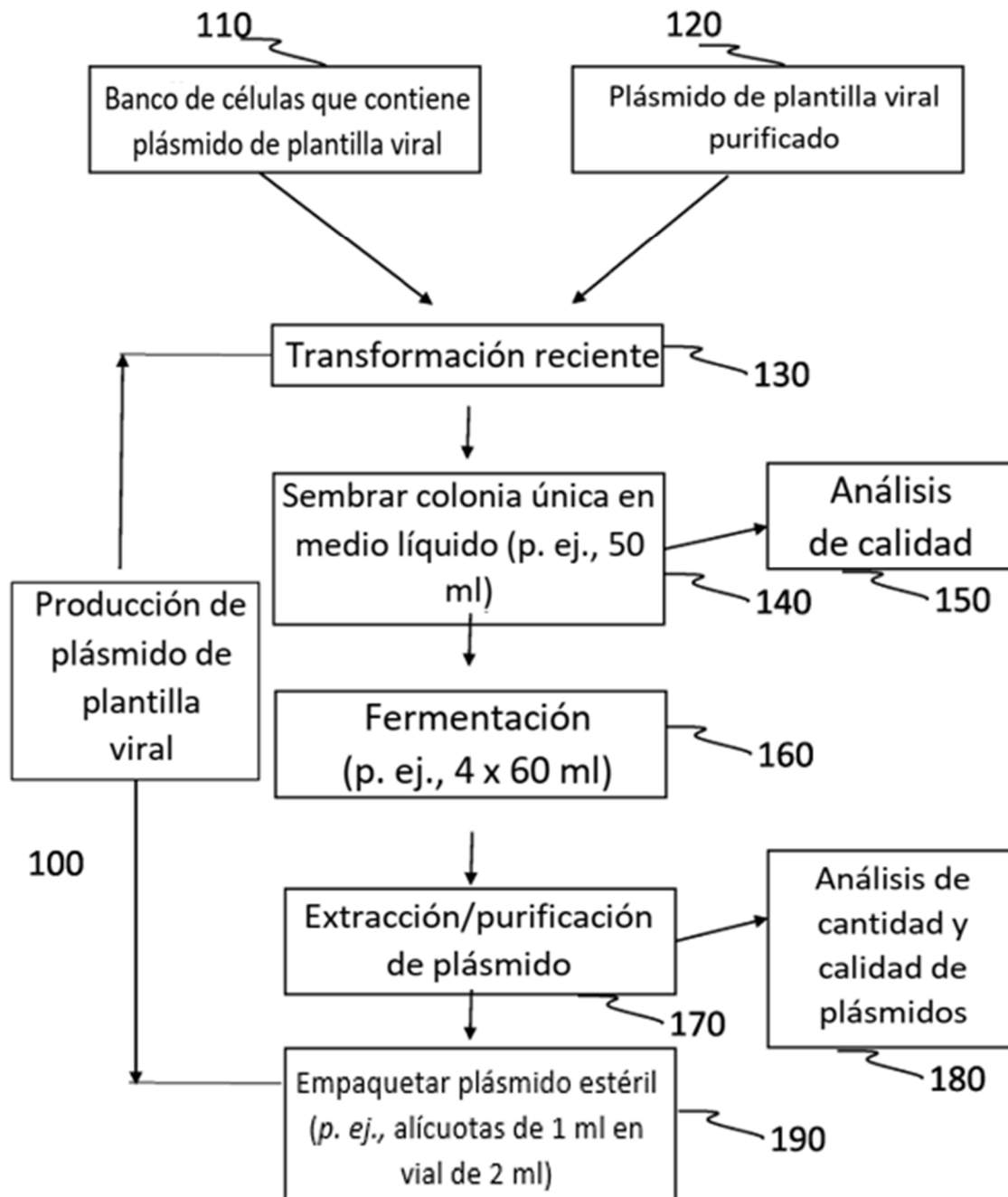
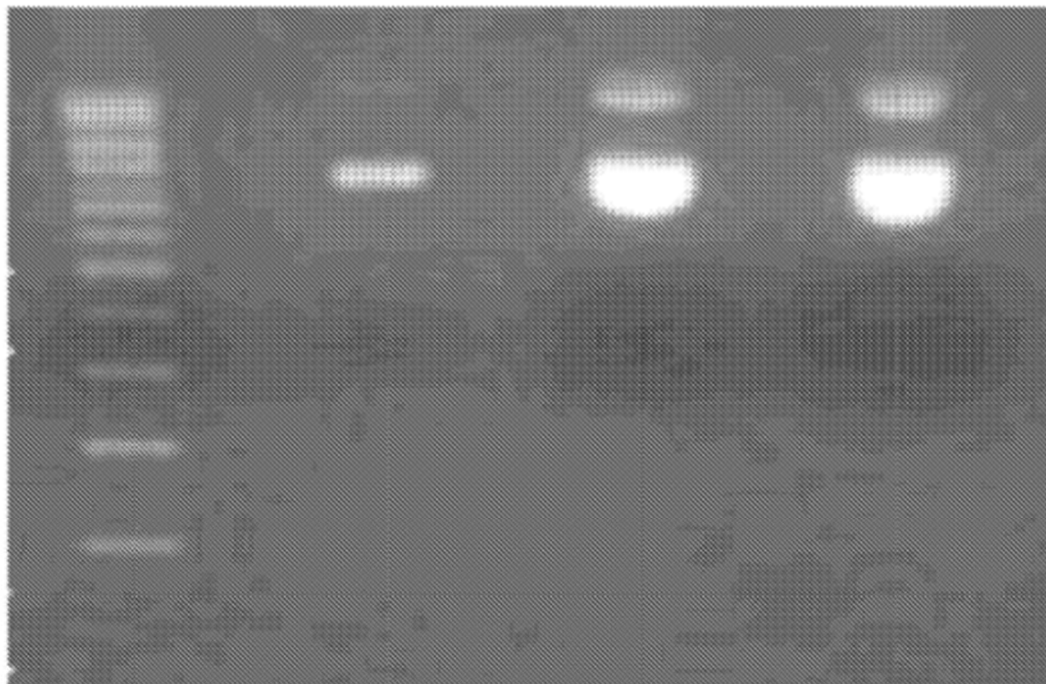


FIG. 4



Marcador

Referencia

Lote 1

Lote 2

FIG. 5

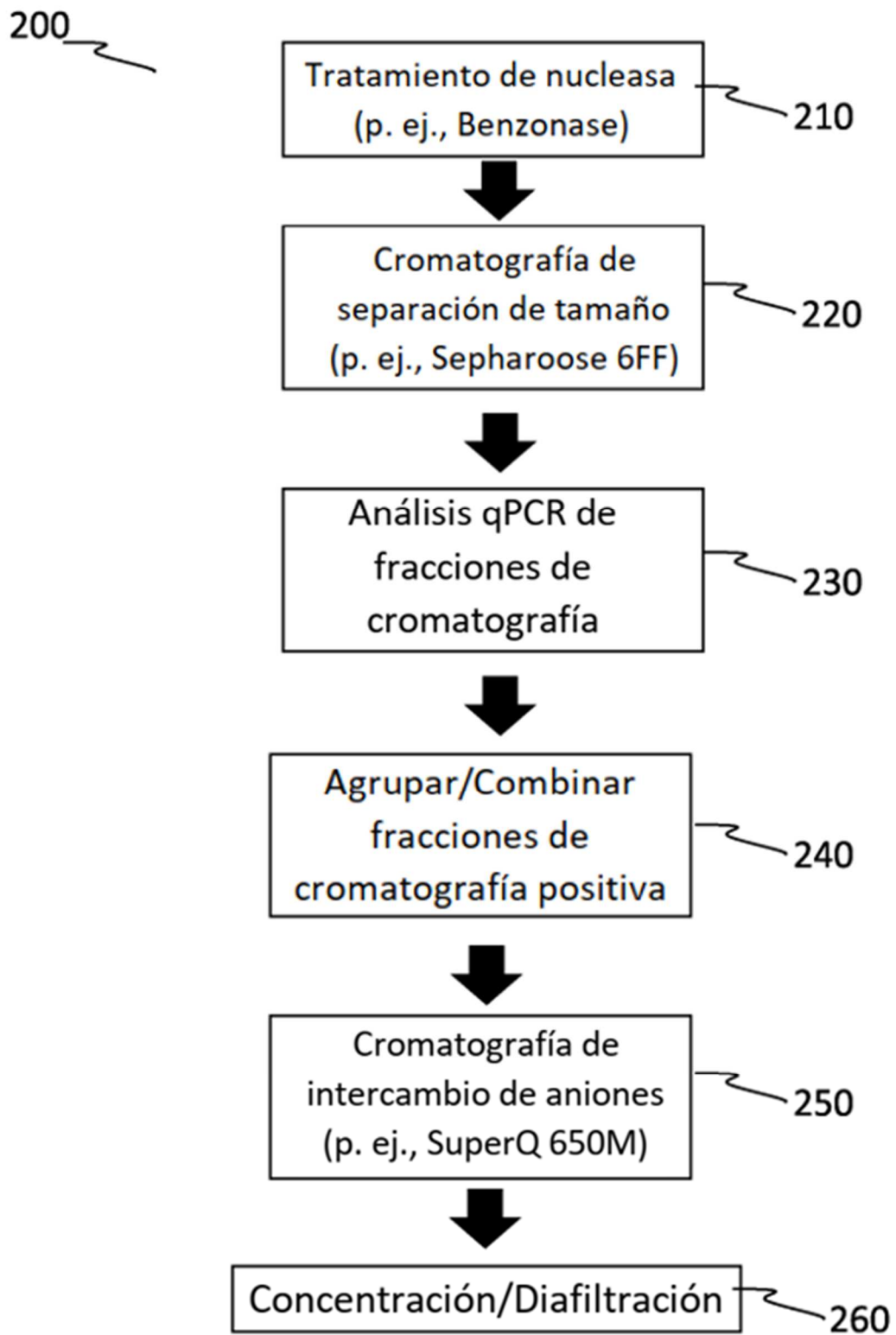
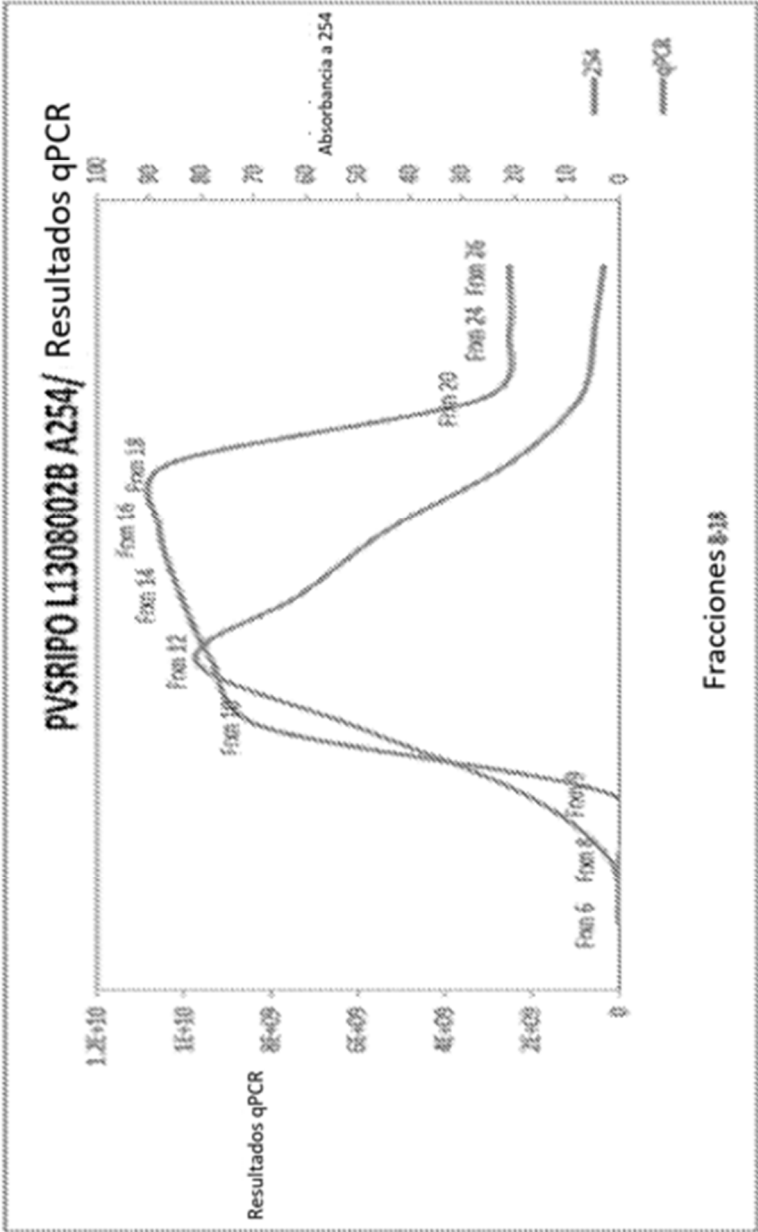


FIG. 6



Fracción Nº	PVSRIPO (copias/mL)
FR. 6	0
FR. 8	2.1E+08
FR. 9	2.21E+09
FR. 10	6.01E+09
FR. 12	9.72E+09
FR. 14	7.34E+09
FR. 16	5.28E+09
FR. 18	2.53E+09
FR. 20	9.02E+08
FR. 24	5.73E+08
FR. 26	3.62E+08

FIG. 7

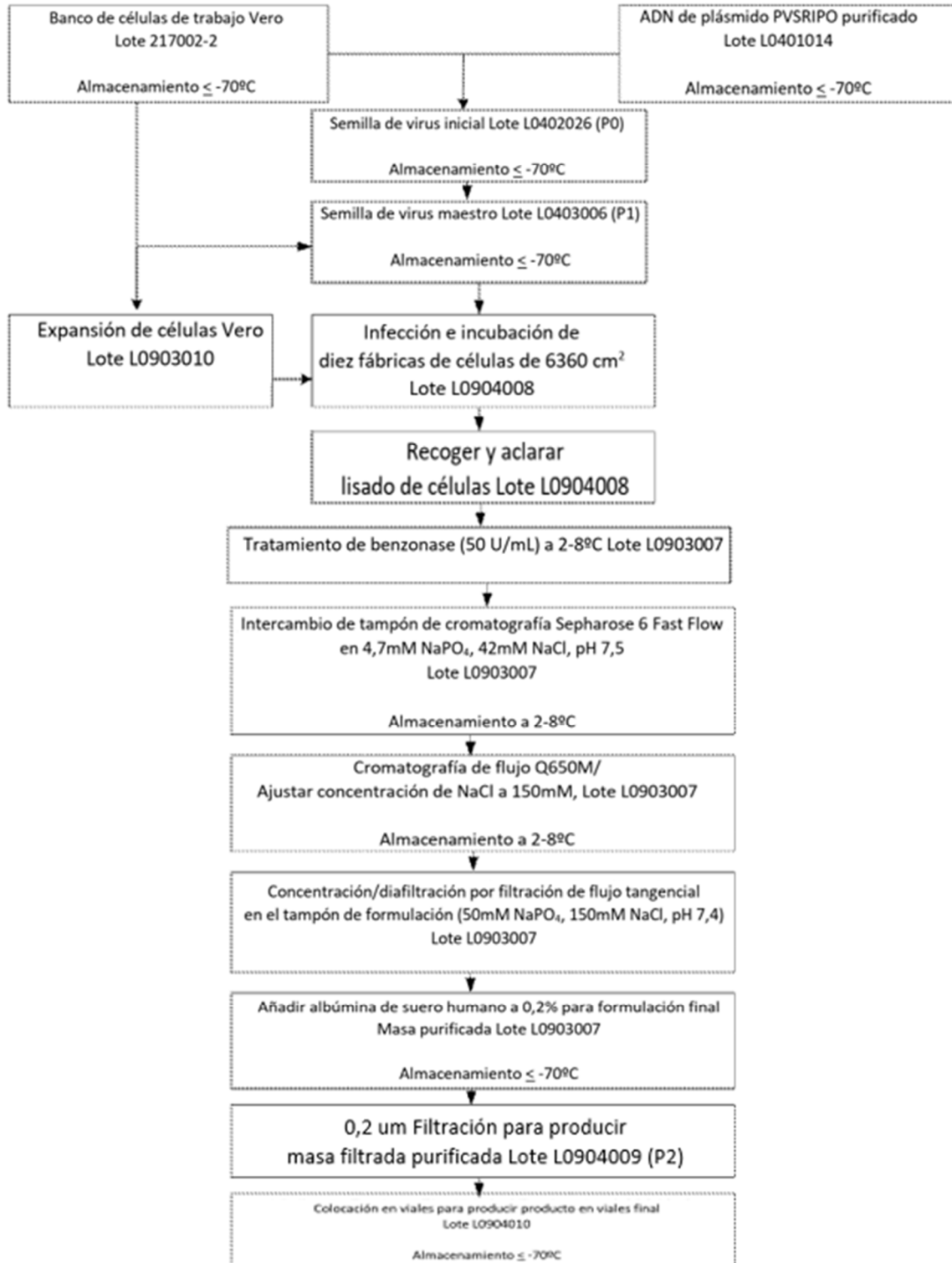


FIG. 8

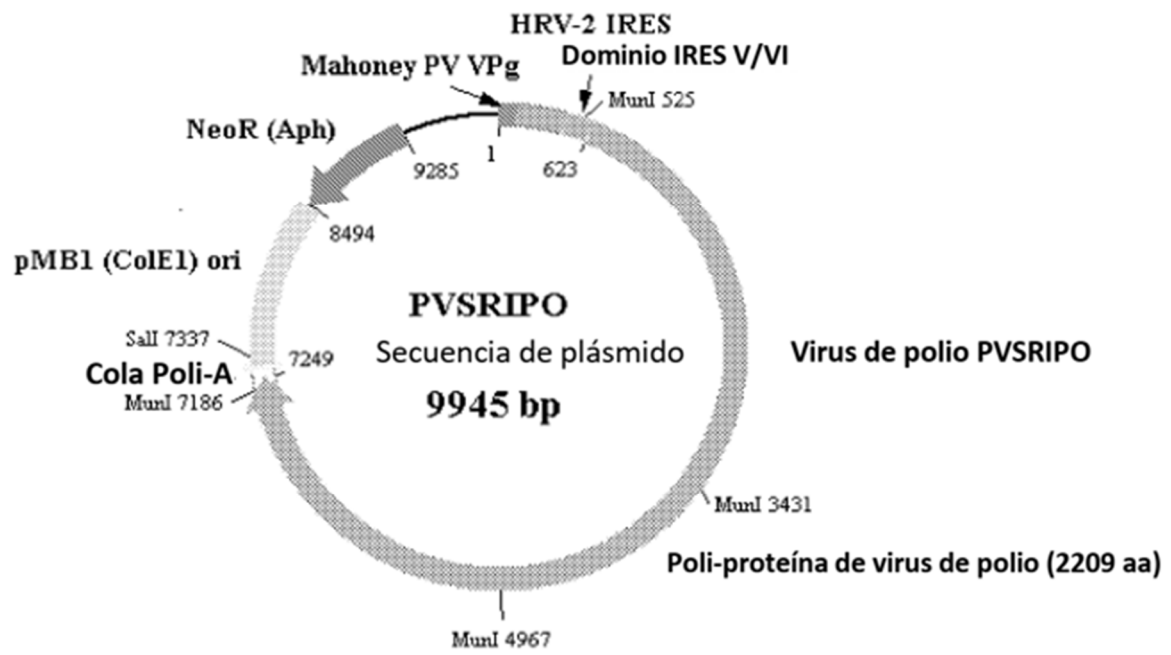
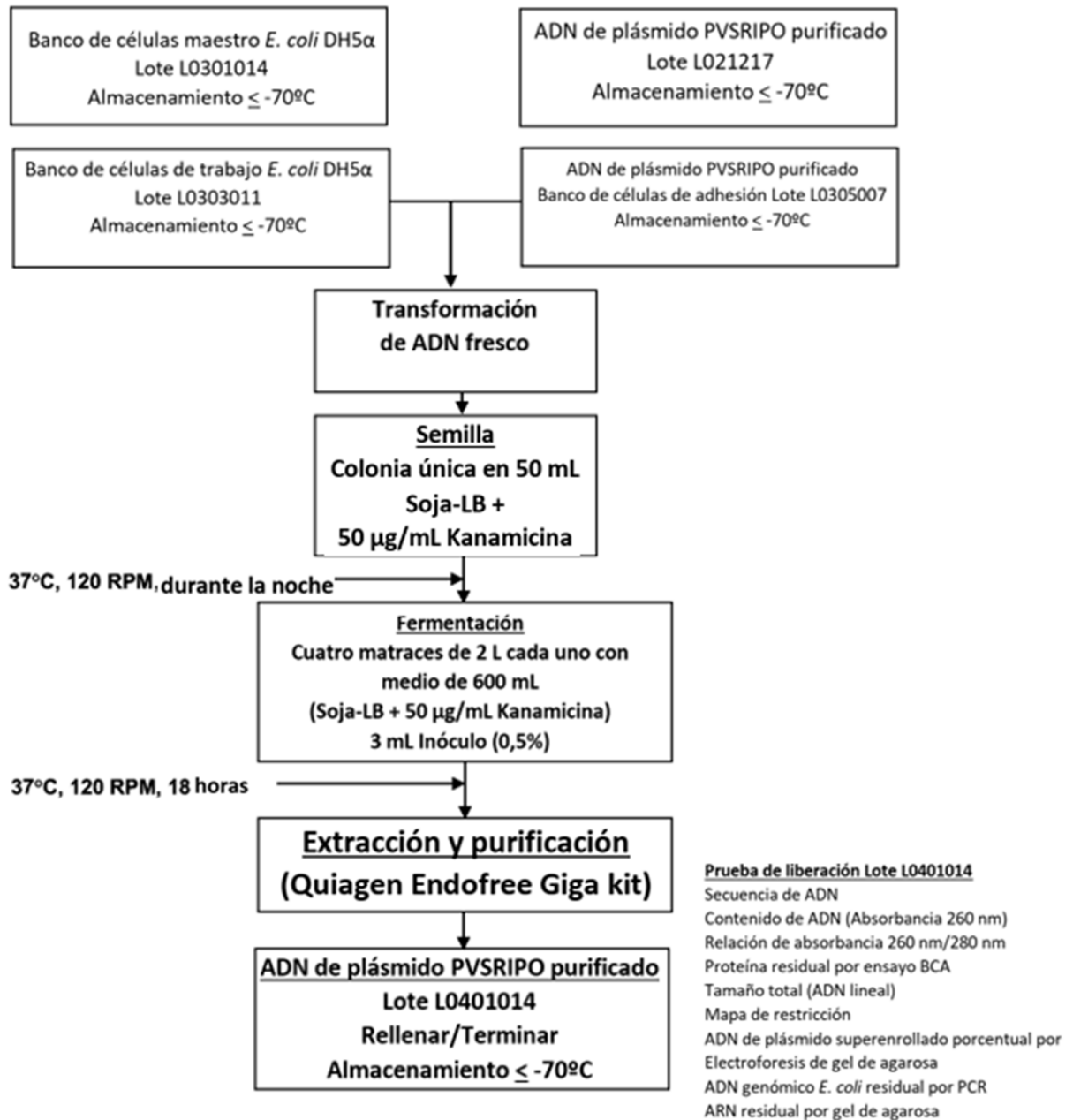


FIG. 9



I

FIG. 10

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Nombre de producto: Banco de células maestro <i>E. coli</i> DH5 Alfa Nº de proyecto: 044 Nº de seguimiento BQAD: 10902 Número NSC: N/A Nº de parte: 10291 Nº de lote: L0301014 Fecha de producción: Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C Tamaño de lote: 144 crío viales Llenar volumen / Recipiente: 1,0 ml rellenar / 2,0 ml crío vial				
Descripción: Banco de células maestro de <i>E. coli</i> DH5 Alfa producido de Invitrogen <i>E. coli</i> DH5 Alfa Lote 1159251. Cepa huésped para producción futura.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad Tinción de Gram Identidad de Bacteria	Gram negativo <i>E. coli</i>	00638 Identificación bacteriana Accugenix 500bp Microseq Lancaster Laboratories 2815	017281 017290	Varillas gram negativas <i>E. coli</i> / <i>Shigella</i> * <i>Shigella</i> excluido por ausencia de gen de toxina
Identificación de organismo por RiboPrinting	Homólogo a referencia <i>E. coli</i>		017292	Homólogo a cepa de referencia <i>E. coli</i> no tóxica (Dupont) Nº 101
Resistencia a antibióticos	Sin resistencia a kanamicina y cloramphenicol	CBI SAIC# 6613-017	017293	Sin colonias resistentes a kanamicina o cloramfenicol
Pureza Pureza de cultivos y morfología de colonia	Sin organismos no conformes, morfología de colonia uniforme	00603	017289	Morfología de colonia uniforme (sin organismos no conformes)
Viabilidad celular	≥ 1 X 10 ⁵ ufc/ml	CBI SAIC# 6613-017	017288	5,7 X 10 ⁶ ufc/ml
Seguridad Detección de toxina Shiga / gen de toxina	Negativo para genes de toxina	Penn State G.D.C.	017287	Negativo para genes de toxina
Bacteriofago lítico o lisogénico	Negativo para bacteriofago	Lark 13.09.03	017285	Negativo para bacteriofago

FIG. 11

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Nombre de producto: Banco de células de trabajo <i>E. coli</i> DH5 Alfa (Competente)		Nº de proyecto: 904	Nº de parte: 10306	
Número NSC: N/A	Nº de lote: L0303011	Tamaño de lote: 95 crio viales	Fecha de producción:	
Llenar volumen / Recipiente: 0,15 ml llenar / 2,0 ml crio vial			Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C	
Descripción: Banco de células de trabajo de <i>E. coli</i> DH5 Alfa producido de BDP <i>E. coli</i> DH5 Alfa MCB L0301014. Cepa huésped para producción futura.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad Tinción de Gram Identidad de Bacteria	Gram negativo <i>E. coli</i>	00636 Accugenix SOP 6,23	017560 017559	Varillas gram negativas <i>E. coli</i>
Pureza Pureza de cultivo y morfología de colonia	Sin organismos no conformes, morfología de colonia uniforme	09683	017561	Morfología de colonia uniforme (sin organismos no conformes)
Viabilidad celular	≥ 1 X 10 ⁶ ufc/ml	CBI SAIC 00679	017662	2,4 X 10 ⁶ ufc/ml
Para información únicamente				
Competencia de transformación Eficiencia de transformación	Resultados de informe. Esperar al menos 1 X 10 ⁶ ufc/ug ADN plásmido pUC 19	BOP Bioanalytical Development Laboratory	017688	1 X 10 ⁷ ufc/ml ADN plásmido

FIG. 12

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Nombre de producto: ADN de plásmido PVS-RIPO Número NSC: 719227 Fecha de producción: Descripción: ADN plásmido PVS-RIPO a una concentración de 0,5mg/mL en una solución de 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8			Nº de proyecto: 417 Tamaño de lote: 19 viales Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C	Nº de parte: 50113
Nº de lote: L0401014 Llenar volumen / Recipiente: 2 mL/1mL				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad Secuencia de ADN	100% homólogo a secuencia de referencia PVS-RIPO	Commonwealth Biotechnologies Inc.	QC-020658	100% Homólogo a PVS-RIPO Lote de referencia de plásmido L0305007
Contenido Contenido de ADN por absorbancia a 260nm	≤ 0,25 mg/mL E _{mg/mL} = 20	01114	QC-020654	0,304 mg/mL
Pureza Relación A260nm / A250nm Proteína residual por Ensayo BCA	1,75 a 2,00 ≤ 50 µg/mL	01114 00679	QC-020654 QC-020657	1,670 < 5 µg/mL (debajo del límite de cuantificación de ensayo)
PARA INFORMACIÓN ÚNICAMENTE				
Tamaño total (ADN lineal)	Resultados de informe. Se espera que conforme con el tamaño aproximado predicho de mapa plásmido tras digest. restricción de sitio único con Sal I, Lineal, 1 fragmento. 9945bp	00678, 00689, 22120	QC-020659	Tamaño de banda de Sal I calculado (lineal)
Mapa de restricción	Resultados de informe. Esperado a conformar con patrón de restricción Mun I predicho por la secuencia de nucleótido (4 bandas, 1537, 2220, 2907 y 3281 bp)	00676, 00689, 22120	QC-020655	Mun I y 9 otros patrones de banda de enzimas de restricción concordantes con patrones de banda esperados
ADN plásmido superenrollado porcentual por electroforesis de gel de agarosa	Resultados de informe	00689, 22120	QC-020660	90,5% scADN
ADN genómico <i>E. coli</i> residual por PCR	Resultados de informe	22901	QC-020661	7,25µg/mL <i>E. coli</i> gADN (2,42% gADN)
ARN residual por gel de agarosa	Resultados de informe	00689, 22120	QC-020662	Sin ARN observado a carga de gel 5µg/carril

FIG. 13

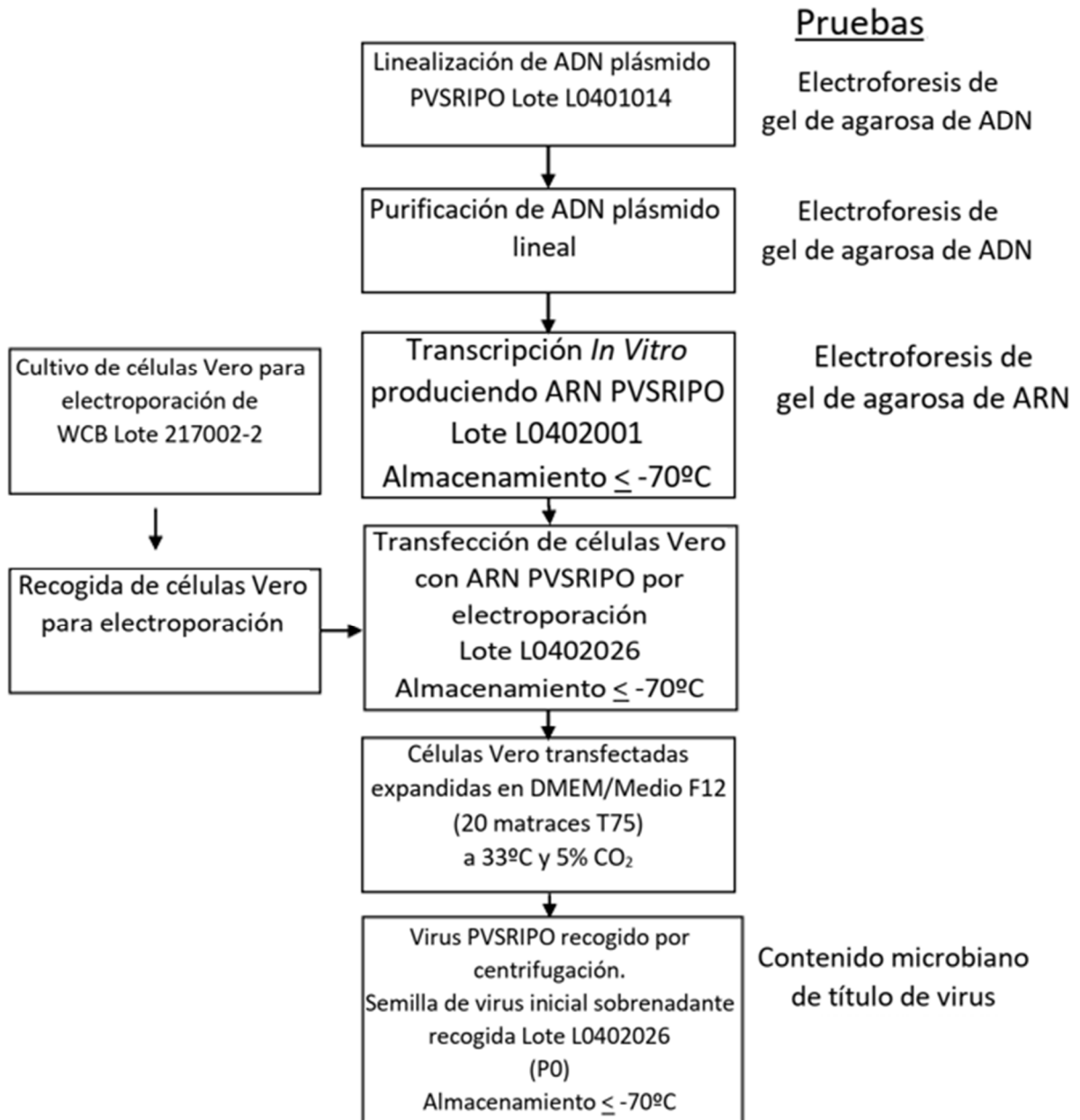


FIG. 14**CERTIFICADO MODIFICADO DE ANÁLISIS**
Banco de células de número WHO VERO

Página 1 de 2

Línea celular: WHC VERO MCE

Número de parte: 5.40113

Número de lote: 2003.0049

Fecha de banco de células

Volúmen (mL/célula): 1 mL

Concentración de producto: Aproximadamente $8,3 \times 10^6$ células viables/vial (post congelación)

Almacenamiento en nitrógeno líquido

Prueba para presencia de micoplasma cultivable y no cultivable por agar	5.40113.002003	Aprobado	Aprobado
Prueba para la presencia de concentración bacteriana y fúngica: Prueba de esterilidad usando un método de inoculación directa	5.40113.010	Aprobado	Aprobado
Identificación y caracterización de cultivo de células	5.40113.300	Mono verde africano	Mono verde africano
Crecimiento de células mamíferas de agarosa blanda	5.40113.002	Resultado de informe	No detectado
Un ensayo para la presencia de contaminantes virales	5.40113.003	No detectado	No detectado
Prueba para la presencia de virus no aparentes = <i>in vivo</i>	5.40113.005003	No detectado	No detectado
Transformación microscopía electrónica Evolución de células cultivadas	5.40113.013	Resultado de informe	Sin partículas adventicias de tipo vírico
Prueba para la presencia de co-cultivo de retrovirus	5.40113.013003	No detectado	No detectado
Ensayo RT-PERT (mg-GLP) *	5.40113.002003	Negativo	Negativo
Detección <i>in vitro</i> de retrovirus por ensayo para actividad de transcriptasa inversa	5.40127.002	Negativo	Negativo
Ensayo de PCR para detección de virus de simios 40 (SV40) por muestras biológicas	5.40127.002003	Negativo	Negativo

* Producción de ensayo de transcriptasa inversa mejorada

* Certificado de Análisis modificado para incluir detección *in vitro* de recombinante por ensayo para actividad de transcriptasa inversa y ensayo PCR para detección de virus de simios 40 (SV40) por muestras biológicas

FIG. 15

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Nombre de producto: Banco de Células de Trabajo Vero		Nº de proyecto: 217	Nº de parte: 10206	
Número NSC: N/A	Nº de lote: 217002-2	Tamaño de lote: 440 viales	Fecha de producción:	
Volumen recipiente/lleñar: 2 mL/1mL Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C Condiciones de almacenamiento: Nitrógeno líquido de fase de vapor				
Descripción: Banco de células de trabajo de células mamíferas de células de riñón de mono (Vero) derivadas de WHO VERO MCB P139 PIN 6.40115, L/N 2003-0049 hecho en MAGENTA Corporation (BioReference). Células WCB son a pasaje 142.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad				
Isoenzima	Conforma a origen de monos	380001 BioReliance	QC-00944	Conforma a origen de mono
Seguridad				
Esterilidad	Sin crecimiento	USP 23, S10006 BioReliance	QC-00942	Sin crecimiento
Micoplasma	Libre de micoplasma	102003 BioReliance	QC-00943	Libre de micoplasma
Agentes adventicios <i>in vitro</i>	Sin contaminantes virales desinfectados	003000 BioReliance	QC-00945	Sin contaminantes virales detectados
Agentes adventicios <i>in vivo</i>	Sin contaminantes virales desinfectados	005002 BioReliance	QC-00946	Sin contaminantes virales detectados
Agentes adventicios bovinos y porcinos	Sin contaminantes virales desinfectados	30640 AgoTec	QC-018196	Sin contaminantes virales detectados
STLV	Sin STLV detectado	37119 Q-One	QC-018199	Sin STLV detectado
S/V	Sin S/V detectado	37110 Q-One	QC-018198	Sin S/V detectado
Virus espumoso de simios	Sin virus espumoso de simios detectado	37153 Q-One	QC-018197	Sin virus espumoso de simios detectado
Tumorigenicidad <i>in vivo</i>	No tumorigénico	401 Anmed	QC-019640	No tumorigénico

FIG. 16

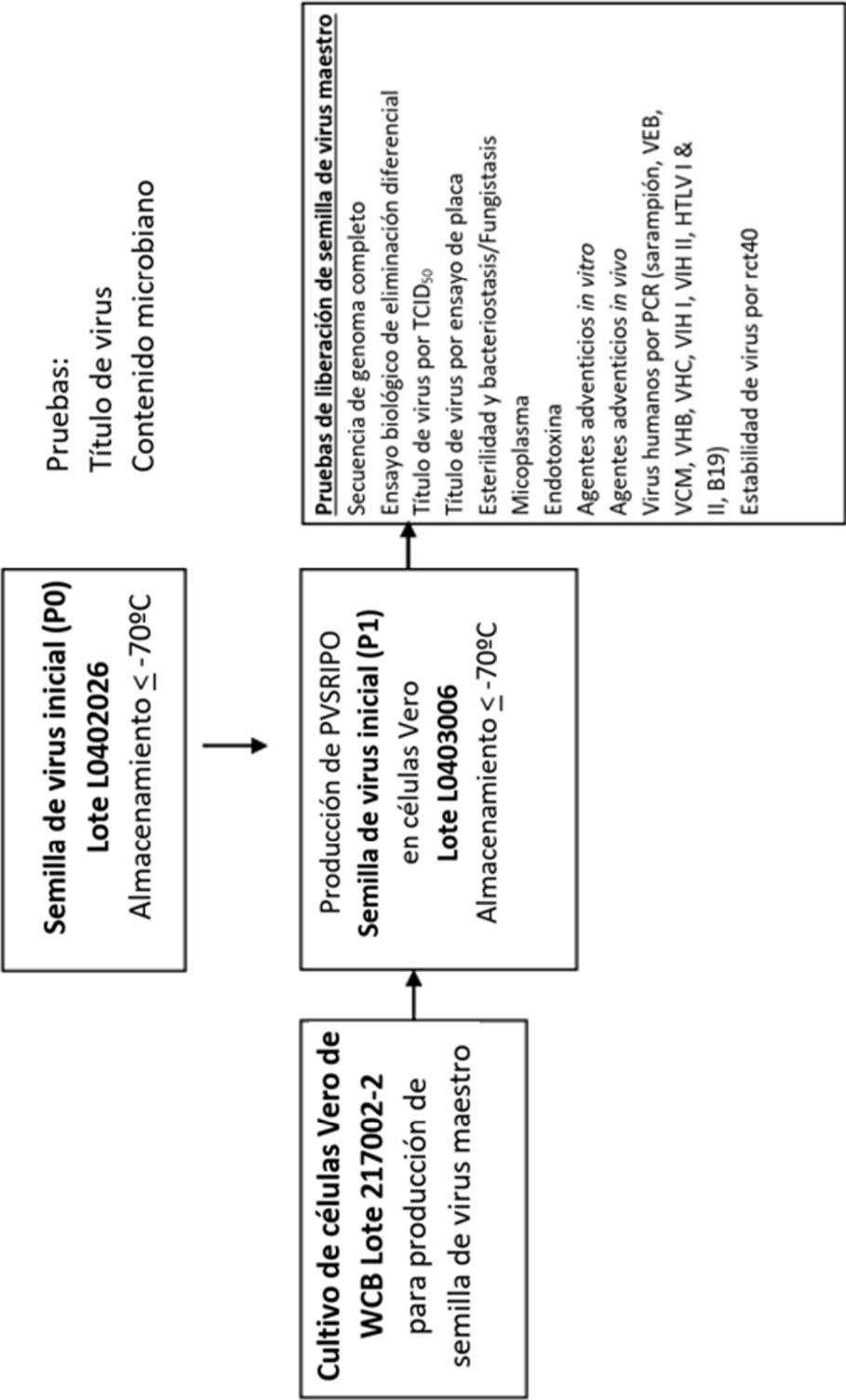
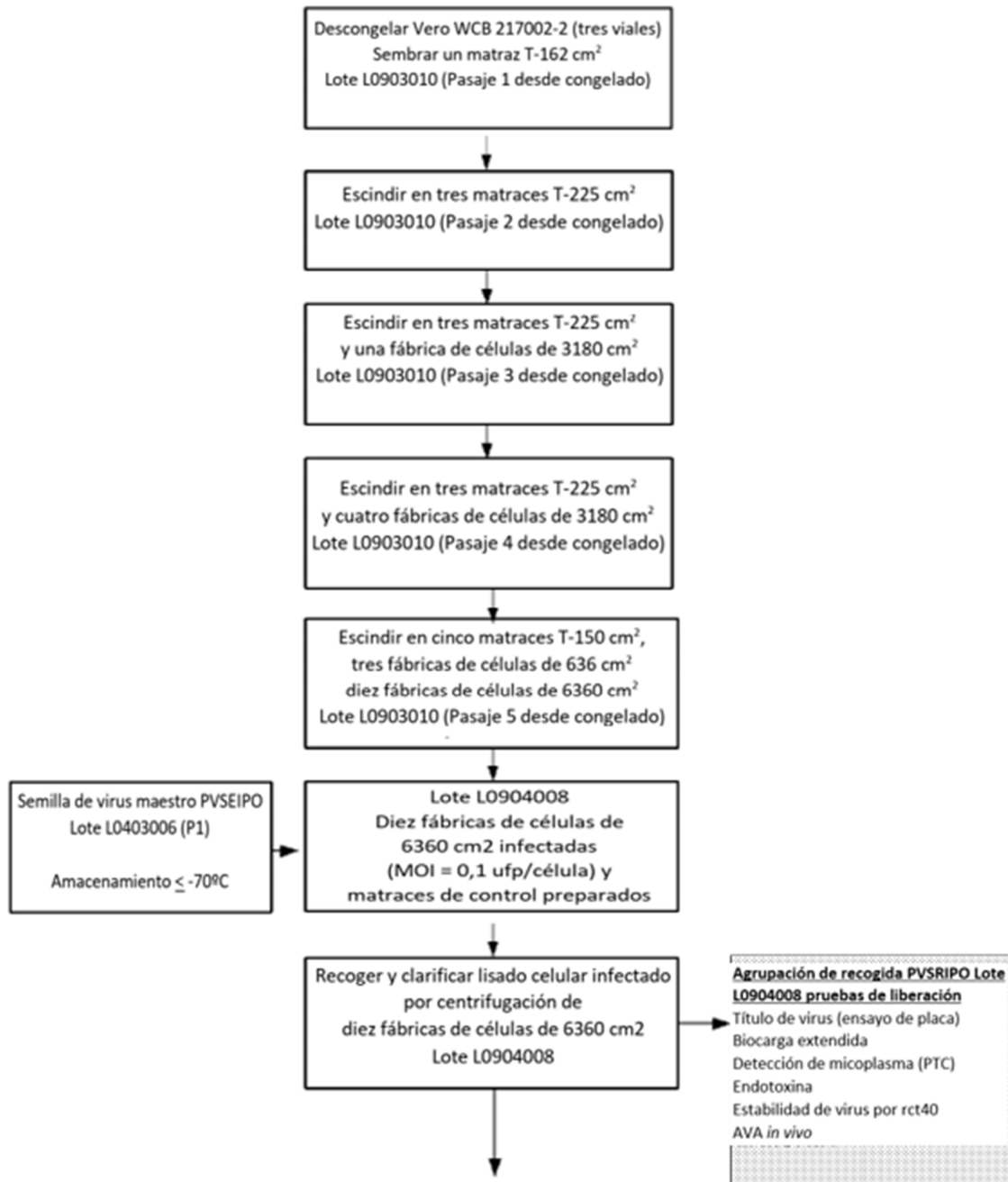


FIG. 17**CERTIFICADO DE ANÁLISIS**

Página 1 de 2

Nombre de producto: Semilla de virus maestro PVS-RIPO		Nº de proyecto: 417	Nº de parte: 50139	
Número NSC: 719277		Nº de lote: L0403006	Tamaño de lote: 24 botellas	
Fecha de producción:		Volumen recipiente/llevar: 125 mL/80 mL	Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C	
Descripción: Banco de semillas de virus maestro de PVS-RIPO (poliovirus quimérico). Pasaje P1 en células VERO Lote N9217002-2.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad				
Secuencia de genoma completo	Homólogo a secuencia de referencia PVS-RIPO	Commonwealth Biotechnologies, Inc. 8613.055	QC-022271	100% homólogo a secuencia viral PVS-RIPO en plásmido de referencia de Lote L0401014
Ensayo biológico – eliminación diferencial	Resultados de informe	Bioanalytical Development Lab	QC-027227	No se detectó eliminación celular en HEK 293 células con MOIs hasta 1,0 inhibieron proliferación U87-MG
Potencia				
Título de virus por ensayo TCID ₅₀	Resultados de informe	BQC 22165	QC-022273	8,50 log10 TCID ₅₀ /mL
Contenido				
Título por ensayo de placa a 33°C	Resultados de informe	BQC22163	QC-021501	1,02 x 10 ⁷ ufp/mL
Seguridad				
Esterilidad	Sin crecimiento	AppTec 30744 (21 CFR 610.12). Inoculación directa	QC-027229	Negativo para crecimiento
B&F	No bacteriostático / No fungistático	AppTec 30736 (USP). Inoculación directa	QC-027229	No bacteriostático / No fungistático
Micoplasma	Libre de micoplasma	AgoTec 30200	QC-027228	Negativo para micoplasma
Endotoxina	< 10 UE/mL	BQC 22135	QC-027226	< 0,05 UE/mL
Agentes adventicios <i>in vitro</i>	Sin contaminantes virales adventicios desinfectados	BQC 22143	QC-027794	No se detectaron agentes virales adventicios
Agentes adventicios <i>in vivo</i>	Sin contaminantes virales adventicios desinfectados	AppTec 300271, 30193F	QC-027795	No se detectaron agentes virales adventicios
Virus humano por PCR				
Sarampión	No detectado	BQC- Molecular Biology Lab 22901	QC-029242	No detectados
Virus Epstein-Barr (VEB)	No detectado	AppTec 30713	QC-027803	No detectados
Citomegalovirus (CMV)	No detectado	AppTec 30705	QC-027797	No detectados
Virus hepatitis B (VHB)	No detectado	AppTec 30703	QC-027801	No detectados
Virus hepatitis C (VHC)	No detectado	AppTec 30730	QC-027799	No detectados
Virus inmunodeficiencia humana (VIH I)	No detectado	AppTec 30635	QC-027800	No detectados
Virus inmunodeficiencia humana (VIH II)	No detectado	AppTec 30770	QC-027798	No detectados
HTLV I & II	No detectado	AppTec 30985	QC-027796	No detectados
B19	No detectado	AppTec 30761	QC-027802	No detectados
Estabilidad viral por rot40	Reducción > 5-log a 40°C a 36°C	BQC 22173	QC-027225	Reducción de 5,74-log a 40°C a 36°C

FIG. 18A



Continuado en la próxima página

FIG. 18B

PRUEBAS

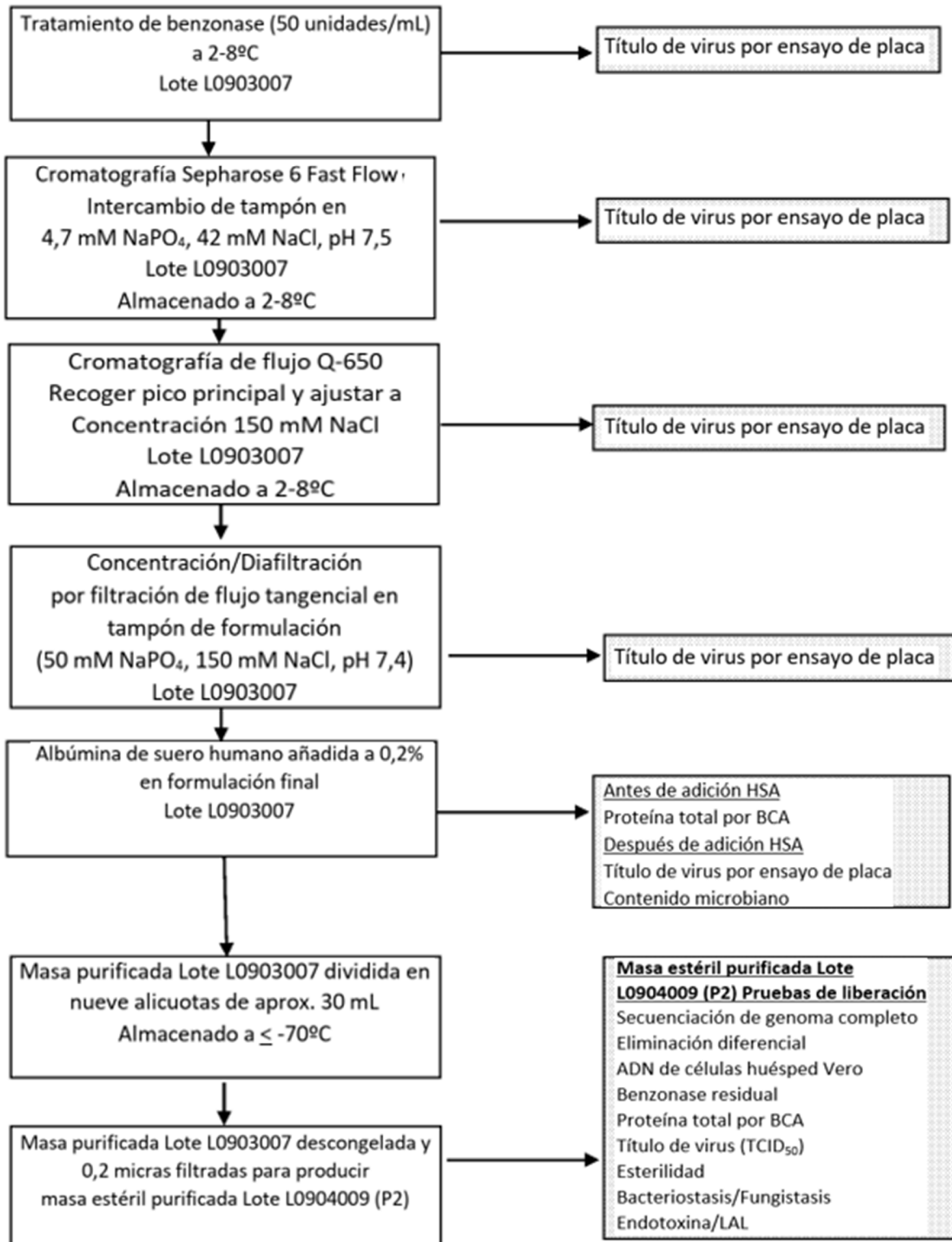


FIG. 19

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Página 1 de 1

Nombre de producto: Agrupación de recogida PVSRIPO		Nº de proyecto: 417	Nº de parte: 50206	
Número NSC: 719277 Fecha de producción:		Nº de lote: L0904006	Tamaño de lote: 10 fábricas de células de 10 niveles	
Volumen recipiente/lleñar: 10 mL, bolsa medio/ 7,4L 18		Temperatura de almacenamiento: ≤ -70ºC		
Descripción: Células Vero infectadas PVSRIPO, Lote Nº217002-2, pasaje P2.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Potencia Título de virus (Ensayo TCID ₅₀)	Resultados de informe	BQC 22165	<u>QC-041377</u>	0,33 (log10 TCID ₅₀ /mL Equivalente a 2,14 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL
Seguridad Biocarga extendida	< 20 UFC/mL; sin organismos patógenos	BQC 22133	<u>QC-041102</u>	Sin crecimiento (0 UFC/mL)
Detección de micoplasma (PTC) usando células NIHQT3	No detectado	AppTec 30200	<u>QC-041378</u>	No detectados
Endotoxina por LAL	Resultados de informe	BQC 22264	<u>QC-041376</u>	< 0,5 UE/mL
Estabilidad de virus por rct40	Reducción ≤ 5 log en título a 40ºX de 36ºC	BQC 22173	<u>QC-041375</u>	Reducción ≥ 7,21 log en título
Agentes adventicios <i>in vivo</i>	No se detectaron contaminantes virales	AppTec 30027	<u>QC-041379</u>	No se detectaron contaminantes virales

FIG. 20

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Página 1 de 1

Nombre de producto: Masa estéril purificada PVS-RIPO		Nº de proyecto: 417	Nº de parte: 50211	
Número NSC: 719277 Fecha de producción:		Nº de lote: L0904009		Tamaño de lote: 1 PETG botella
Volumen recipiente/llevar: 1L/ 283 mL		Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C		
Descripción: Masa estéril purificada PVSRIPO a 60 mM fosfato de sodio, 0,3% NaCl, pH 7,4, 0,2% HSA. Pasaje P2 en células Vero Lote N°217002-2.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad Secuencia de genoma completo	Homólogo a secuencia de referencia PVSRIPO	American International Biotechnology, Inc. Estudio #SAIC-120609-LD	<u>QC-042102</u>	100% homólogo a la secuencia de referencia PVSRIPO
Pureza ADN de célula huésped (Vero)	Resultados de informe	BQC 22165	<u>QC-042166</u>	No detectado. < 0,5 ng/mL
Benzonase residual	Resultados de informe	AppTec 08367	<u>QC-042167</u>	1,6 ng/mL
Proteína total por BCA ²	Resultados de informe	BQC 22107	<u>QC-041178</u>	< 5 ng/mL, proteína
Potencia Eliminación diferencial	Resultados de informe	BQC 16130	<u>QC-042106</u>	No se detectó eliminación celular en HEK 293 con MOIs hasta 10 TCID ₅₀ /mL; Citotóxico a U87-MG (DE ₅₀ a 0,045 MOq 0,079ng/ml) TCID ₅₀ /mL; Equivalente a 4,80 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL
Título de virus (Ensayo TCID ₅₀)	Resultados de informe	BQC 22165	<u>QC-042165</u>	
Seguridad Esterilidad (inoculación directa)	Sin crecimiento	AppTec 30744, 21 CFR 610.12).	<u>QC-042166</u>	Sin crecimiento
Bacteriostasis/Fungistasis (post-esterilidad)	No bacteriostático / No fungistático	AppTec 30736, 21 CFR 610.12	<u>QC-042168</u>	No bacteriostático / No fungistático
Endotoxina por LAL	< 10 UE/mL	BQC 22204	QC-042170	< 0.05 UE/mL

FIG. 21

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Página 1 de 1

Nombre de producto: Producto en viales final PVS-RIPO		Nº de proyecto: 417	Nº de parte: 50217	
Número NSC: 719277 Fecha de producción:		Nº de lote: L0904010		Tamaño de lote: 425 viales
Volumen recipiente/llevar: 2mL vidrio/ 0,8 mL		Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C		
Descripción: Virus en viales PVSRIPO a 50 mM fosfato de sodio, 0,3% NaCl, pH 7,4, 0,2% HSA. Pasaje P2 en células Vero Lote N°217002-2.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad Claridad, color y apariencia	Claro a transluciente, líquido incoloro sin evidencia de partículas	BQC 22925	QC-042169	Líquido claro, incoloro, sin partículas
Identidad Secuencia de genoma completo	Homólogo a secuencia de referencia PVSRIPO	American International Biotechnology, Inc. Estudio #SAIC-120609-LD	QC-042162	100% homólogo a la secuencia de referencia PVSRIPO
RT-qPCR (HRV-2 IRES y poliproteína polio)	Positivo para HRV-2 IRES y secuencia de poliproteína polio; Informar número de copia viral	BQC 22165	QC-042170	Positivo para HRV-2 IRES y secuencias de poliproteína polio; 5,01 x 10 ¹⁰ copias virales/mL
Contenido Título de virus (Ensayo de TCID ₅₀)	Resultados de informe	BQC 22165	QC-042165	0,065log ₁₀) TCID ₅₀ /mL; Equivalente a 4 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL
Seguridad pH	7,4 a 0,5	BQC 22124	QC-042171	7,4
Esterilidad (inoculación directa)	Sin crecimiento	AppTec 30744, 21 CFR 610.12.	QC-042174	Sin crecimiento
Estabilidad de virus por rct40	Reducción ≤ 5 log en título a 40°C de 38°C	BQC 22173	QC-042173	Reducción 7,35 log en título a 40°C desde 30°C
Endotoxina por LAL	< 10 UE/mL	BQC 22204	QC-042163	< 0,05 UE/mL
Solo para información				
Partícula viral por ME	Resultados de informe	BQC 22964	QC-042172	1 x 10 ¹⁰ ufp/mL
Relación VP/TCID ₅₀	Resultados de informe	Cálculo	N/A	25
Referencia Estandar PVSRIPO MVB Lote L0403008 (QC-022271).				

FIG. 22**CERTIFICADO DE ANÁLISIS**

Página 1 de 2

Nombre de producto: Material de toxicología PVSRIPO		Nº de proyecto: 417	Nº de parte: 50217	
Número NSC: 719277	Nº de lote: L0603006	Tamaño de lote: 281 viales	Temperatura de almacenamiento: ≤ -70ºC	
Fecha de producción:		Volumen recipiente/llevar: 3 mL vial de vidrio/ 0,5 mL		
Descripción: PVSRIPO recombinante purificado a 50 mM fosfato de sodio, 0,3% NaCl, pH 7,4, 0,2% HSA. Pasaje P2 en células Vero.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Apariencia Claridad, color y apariencia	Claro a opalescente, a TA, líquido incoloro sin evidencia de partículas	BQC 22925	<u>QC-029922</u>	Líquido claro, incoloro, sin evidencia de partículas
Identidad Secuencia de genoma completo	Conforma a banco de virus maestro, Lote L0403006	Commonwealth Biotechnologies, Inc. Estudio 8613.066	<u>QC-029927</u>	Secuencia conforma a banco de virus maestro PVSRIPO, Lote L0403006
Pureza Benzonase residual Proteína total por BCA	Resultados de informe Resultados de informe	AppTec 36067 BQC 22107	<u>QC-029933</u> <u>QC-029924</u>	< 0,25 ng/mL < 5 µg/mL, proteína
Contenido Título infeccioso por TCID ₅₀ Partícula viral por ME Relación PV/UI	Resultados de informe Resultados de informe Resultados de informe	BQC 22165 BQC 22904 Cálculo	<u>QC-029923</u> <u>QC-629928</u> N/A	10,31 log ₁₀ TCID ₅₀ /mL 3,95 x 10 ¹⁰ ng/mL 195
Potencia Eliminación diferencial	Resultados de informe	Bioanalytical Development, 16115	<u>QC-029926</u>	No se detectó eliminación celular en HEK 293 células con MOIs hasta 10 TCID ₅₀ /célula, citotóxico a células U87-MG
Seguridad Esterilidad (inoculación directa)	Sin crecimiento a 14 días	AppTec 30744, 30744, 21 CFR 610,12	<u>QC-029935</u>	Sin crecimiento a 14 días
Bacteriostasis/Fungistasis (post-esterilidad)	No bacteriostático / No fungistático < 10 UE/mL	AppTec 30736, cUSP <71> BQC 22135	<u>QC-029934</u> <u>QC-029925</u>	No bacteriostático / No fungistático 0,09 UE/mL
Endotoxina Estabilidad viral por rct40	Reducción ≥ log a 40ºC a 36ºC	BQC 22173	<u>QC-029929</u>	Reducción 7,40 log en título a 40ºC en comparación a título a 36ºC
pH	7,4 ± 0,9 a TA	BQC 22124	<u>QC-029923</u>	7,4
Muestras tomadas antes de la formulación final con HSA				

FIG. 23

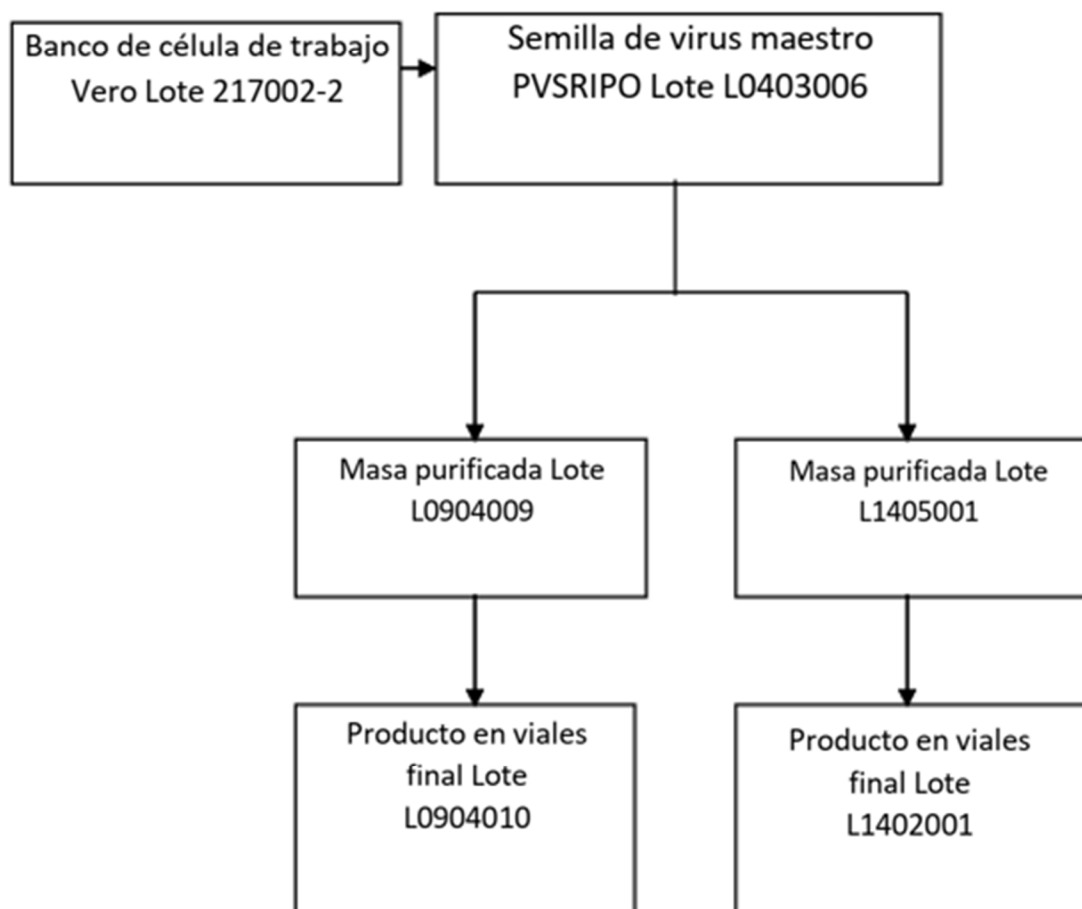


FIG. 24

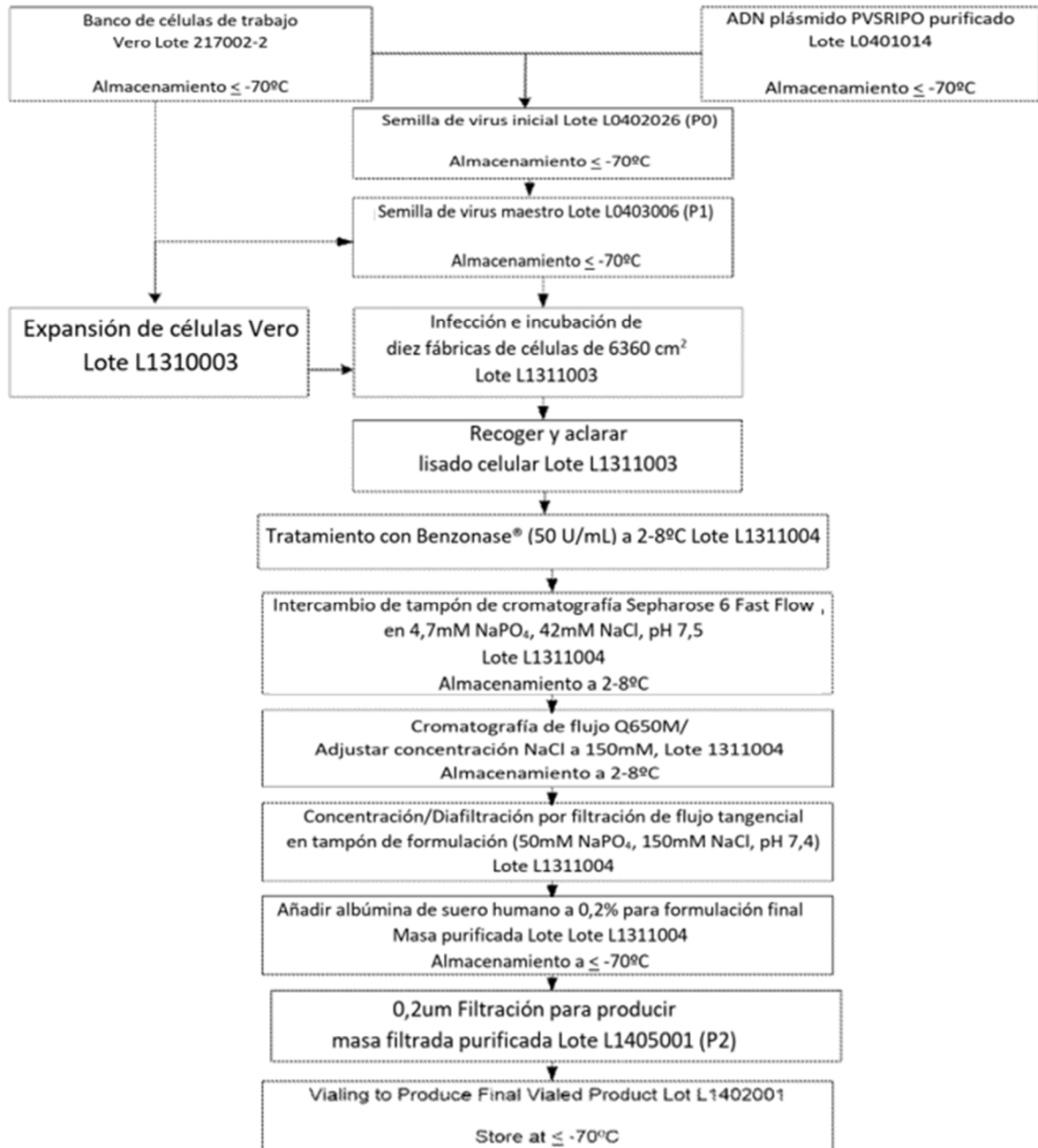


FIG. 25A

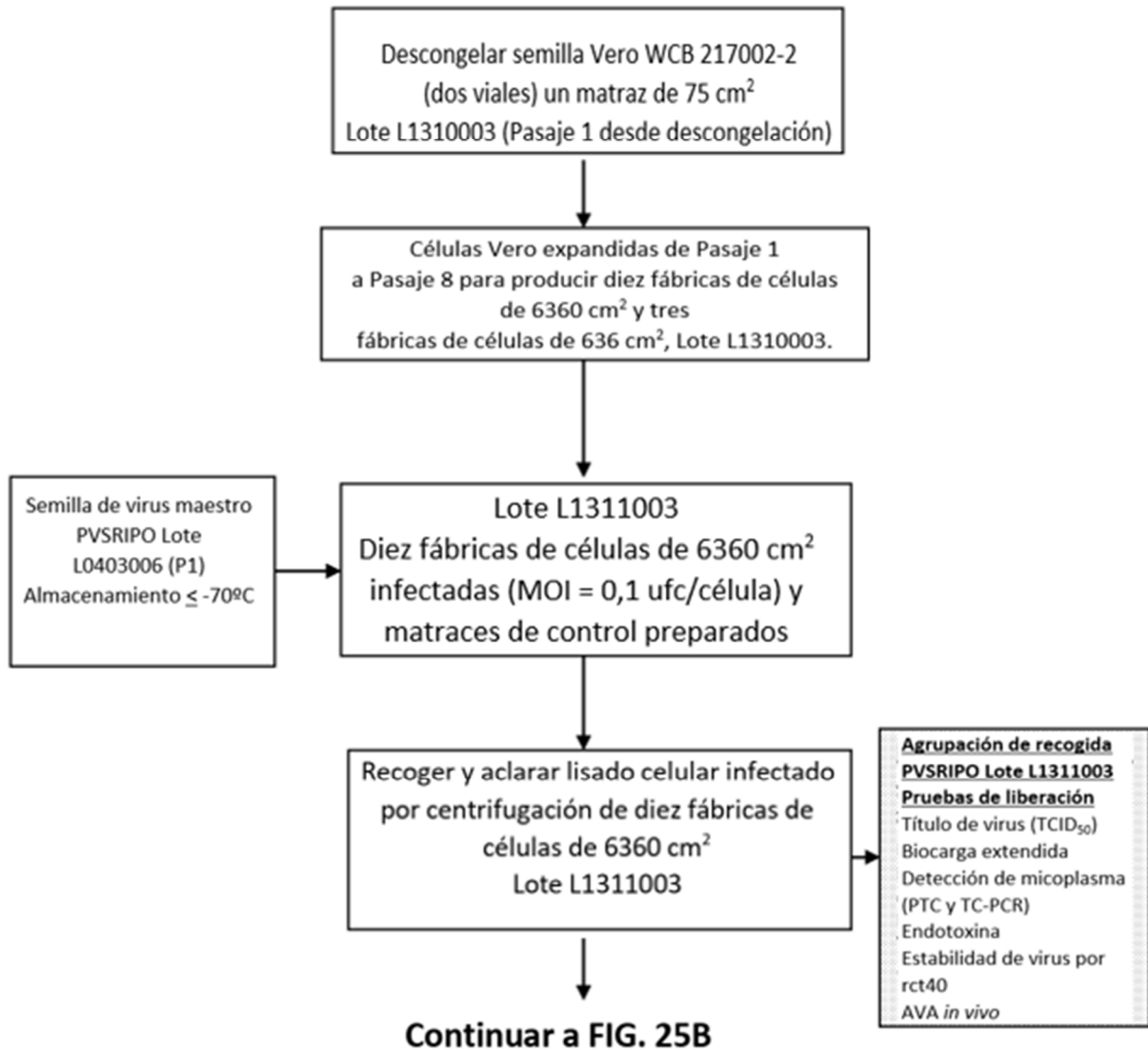


FIG. 25B

Continuado desde la página anterior

Pruebas

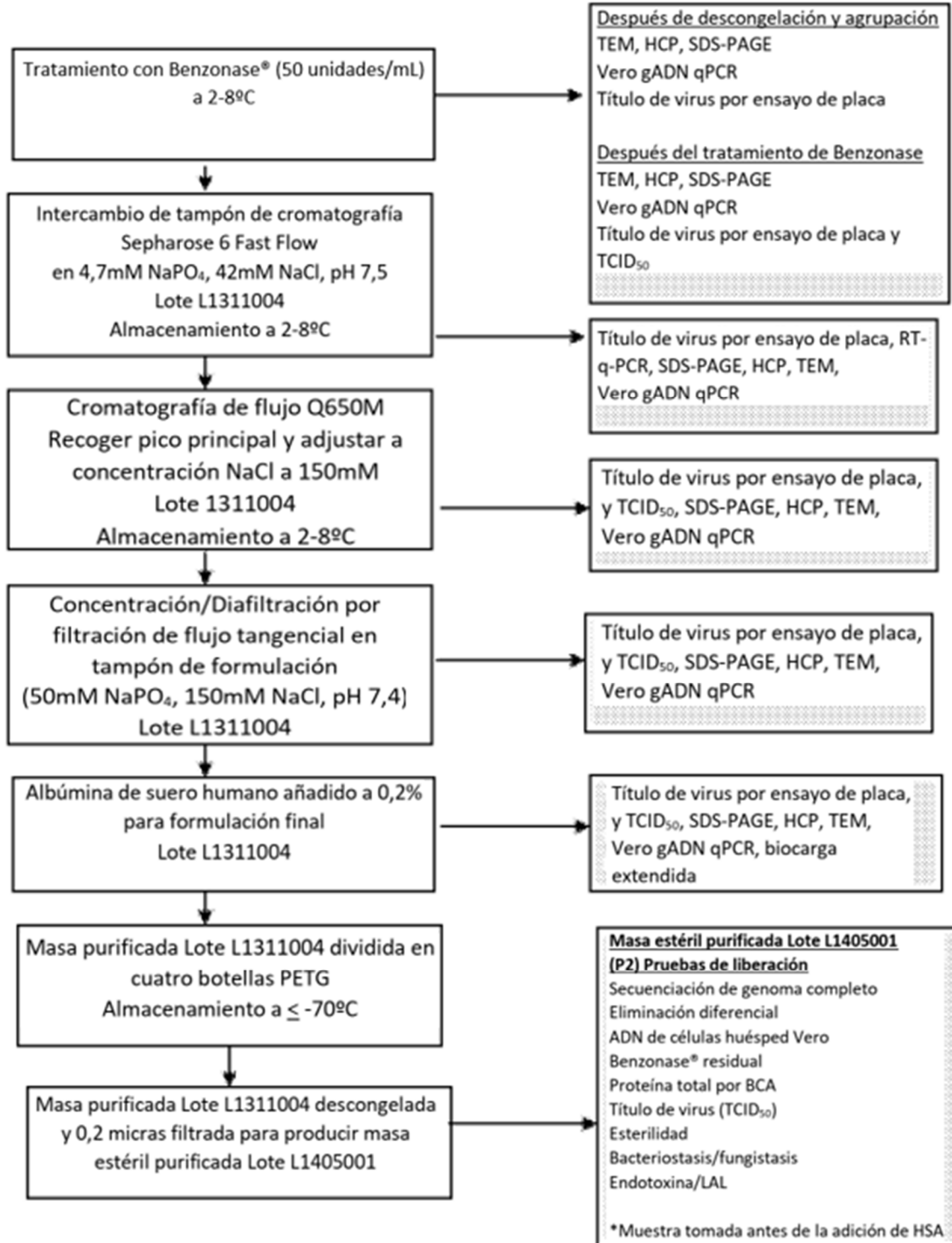


FIG. 26

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Página 1 de 1

Nombre de producto: Agrupación de recogida PVSRIPO		Nº de proyecto: 0576	Nº de parte: 50206	
Número NSC: 719277	Fecha de producción:	Nº de lote: L1311003	Tamaño de lote: 10 botellas	
Volumen recipiente/llevar: 1L PTEG botella/ ~700 mL		Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C		
Descripción: Agrupación de recogida de masa de virus PVSRIPO de células Vero infectadas. Lote Nº217002-2.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Potencia Título de virus (Ensayo TCID ₅₀)	Resultados de informe	Texcell North America, Estudio Nº14-42-550-2	QC-052605	9,33 (log ₁₀) TCID ₅₀ /mL Equivalente a 2,14 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL
Seguridad Biocarga extendida	< 20 UFC/mL; sin organismos patógenicos	BQC 22133	QC-052553	Sin crecimiento (0 UFC/mL)
Detección de micoplasma (PTC) para productos virales usando células Vero	No detectados	WuXi AppTec 30200	QC-052604	No detectados
Detección de micoplasma (PTC) para productos virales usando células NIH/3T3	No detectados	WuXi AppTec 30200	QC-054615	No detectados
Detección de micoplasma por TD-PCR	No detectados	WuXi AppTec 30448	QC-054616	No detectados LoD ≤ 1 UFC
Endotoxina por LAL	Resultados de informe	BQC 22204	QC-052594	< 0,5 UE/mL
Estabilidad viral por rct40	Reducción ≥ 5 log en título a 40°C de 36°C	Texcell North America, Estudio Nº14-42-562-2	QC-052606	Reducción > 7,93 log en título
Agentes adventicios <i>in vivo</i>	Sin contaminantes virales detectados	WuXi AppTec 30027	QC-052603	Sin contaminantes virales detectados

FIG. 27

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Página 1 de 2

Nombre de producto: Masa estéril purificada PVSRIPO		Nº de proyecto: 576	Nº de parte: 50211	
Número NSC: 719277	Fecha de producción:	Nº de lote: L1405001	Tamaño de lote: 1 PETG Botella	
Volumen recipiente/llevar: 2L / 1054 mL		Temperatura de almacenamiento: ≤ -70ºC		
Descripción: Masa estéril purificada PVSRIPO en 50 mM fosfato de sodio, 0,9% NaCl, pH 7,4, 0,2% HSA, Pasaje P2 en célula Vero. Lote Nº217002-2.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Identidad Secuencia de genoma completo	Homólogo a secuencia de referencia PVSRIPO	American International Biotechnology, Inc. Estudio NºLEIODS-092314TB	<u>QC-052605</u>	9,33 (log ₁₀) TCID ₅₀ /mL Equivalente a 2,14 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL
Potencia Título de virus (Ensayo TCID ₅₀)	< 20 UFC/mL; sin organismos patógenos	BQC 22133	<u>QC-052553</u>	Sin crecimiento (0 UFC/mL)
Seguridad Biocarga extendida	No detectados	WuXi AppTec 30200	<u>QC-052604</u>	No detectados
Detección de micoplasma (PTC) para productos virales usando células Vero	No detectados	WuXi AppTec 30200	<u>QC-054615</u>	No detectados
Detección de micoplasma (PTC) para productos virales usando células NIH/3T3	No detectados	WuXi AppTec 30448	<u>QC-054616</u>	No detectados LoD ≤ 1 UFC
Detección de micoplasma por TD-PCR	Resultados de informe Reducción ≥ 5 log en título a 40ºC de 36ºC	BQC 22204 Texcell North America, Estudio Nº14-42-562-2	<u>QC-052594</u> <u>QC-052606</u>	< 0,5 UE/mL Reducción > 7,93 log en título
Endotoxina por LAL Estabilidad viral por rct40	Sin contaminantes virales detectados	WuXi AppTec 30027	<u>QC-052603</u>	Sin contaminantes virales detectados
Agentes adventicios <i>in vivo</i>				

FIG. 28

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Página 1 de 2

Nombre de producto: Producto en viales final PVSRIPO Nº de proyecto: 0576 Nº de parte: 50217 Número NSC: 719277 Fecha de producción: Nº de lote: L1405001 Tamaño de lote: 1766 viales Volumen recipiente/llevar: 2mL vidrio / 0,5 mL Temperatura de almacenamiento: ≤ -70°C Descripción: Virus PVSRIPO en viales en 50 mM fosfato de sodio, 0,9% NaCl, pH 7,4, 0,2% HSA, Pasaje P2 en células Vero. Lote N°217002-2.				
Descripción de prueba	Especificación de ensayo	Prueba SOP Nº o Estudio Nº	Prueba QC Nº de solicitud	Resultado
Apariencia Claridad, Color y Apariencia	Líquido claro a translucido, incoloro sin evidencia de partículas	BQC 22925	<u>QC-053194</u>	Líquido claro a transparente, incoloro, sin evidencia de partículas
Identidad Secuencia de genoma completo	Homólogo a secuencia de referencia PVSRIPO ¹	American International Biotechnology, Inc. Estudio N°LEIODS-092314TB	<u>QC-053193</u>	Homólogo a secuencia de referencia PVSRIPO
RT-qPCR (HRV-2 IRES y poliproteína polio)	Positivo para secuencias de HRV-2 IRES y poliproteína polio, Informar número de copia viral	American International Biotechnology, Inc. Estudio N°LEIODS-080114TB	<u>QC-053195</u>	Positivo para secuencias de HRV-2 IRES y poliproteína polio; 1,58 x 10 ¹² copias virales/mL
Contenido Título de virus (Ensayo TCID ₅₀)	Resultados de informe	Texcell North America, Estudio N°14-81-550-2	<u>QC-053192</u>	4,48 x 10 ⁹ TCID ₅₀ /mL
Seguridad pH	7,4 ± 0,5	BQC 22124	<u>QC-053196</u>	7,2
Esterilidad (inoculación directa)	Sin crecimiento	WuXi AppTec 30744. (21 CFR 610.12)	<u>QC-053197</u>	Sin crecimiento
Poliovirus IRES (RT-qPCR)	No detectados	American International Biotechnology, Inc. Estudio N°LEIODS-080114TB	<u>QC-053198</u>	No detectados. < 100 copias genómicas polio de tipo silvestre por 2,6 x 10 ⁷ copias de PVSRIPO
Estabilidad de virus por rct40	Reducción ≥ 5 log en título a 40°C de 36°C	Texcell North America, Estudio N°14-55-562-2	<u>QC-053199</u>	Reducción > 7,09 log en título a 40°C de 36°C
Endotoxina por LAL	≤ 10 UE/mL	BQC 22204	<u>QC-053191</u>	< 0,5 UE/mL
Solo para información				
Partícula de virus por ME	Resultados de informe	Texcell North America, Estudio N°14-80-521.5-2, Laboratorio de microscopía electrónica FNLCR	<u>QC-053200</u>	7,8 x 10 ¹⁰ vp/mL
Relación VP/TCID ₅₀	Resultados de informe	Cálculo	N/A	15,6