

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 881 050**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010 E 18184138 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021 EP 3444335**

54 Título: **Métodos mejorados para la purificación de vectores de AAV recombinantes**

30 Prioridad:

16.06.2009 US 187601 P

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

26.11.2021

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SHELDON, PAULENE MCLEAN QUIGLEY;
GAGNON, PETER S.;
NICHOLS, GINA y
THORNE, BARBARA A.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 881 050 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

Métodos mejorados para la purificación de vectores de AAV recombinantes

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere generalmente al campo de la purificación de vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) que se pueden usar para la transferencia génica y específicamente para terapia o vacunación génicas. Más específicamente, se refiere a métodos para la purificación de vectores de rAAV recombinantes que están sustancialmente libres de componentes de producción producidos durante el procedimiento tales como ácidos nucleicos celulares, proteínas celulares, virus cooperadores y componentes del medio.

Antecedentes de la invención

15 Los virus adenoasociados (AAV) tienen características únicas que los hacen atractivos como vectores para terapia génica y vacunas genéticas. La infección por AAV de células cultivadas es no citopática, y la infección natural de seres humanos y otros animales es oculta, asintomática y no está implicada en la etiología de ninguna enfermedad humana. Por otra parte, los AAV infectan a una amplia gama de tipos de células incluyendo muchas células de mamífero, permitiendo la posibilidad de orientarse a muchos tejidos diferentes in vivo. Los AAV infectan células que se dividen lentamente y que no se dividen y pueden persistir esencialmente durante la vida de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). Son muy raras las copias integradas de vector de rAAV en órganos tales como el hígado o el músculo. La transferencia génica a largo plazo eficaz se ha presentado en un número de tipos de células incluyendo el ojo, el SNC y el músculo. Véanse, p. ej., X. Xiao y cols., *J. Virol.* 70(11):8098-8108 (1996); R.R. Ali y cols., *Hum. Mol. Genet.* 5(5):591-94 (1996). Los estudios clínicos actuales se han enfocado en gran parte al uso de 2 vectores de rAAV, pero un número de trabajos ha demostrado que otros serotipos de AAV, incluyendo rAAV-1, rAAV-4, rAAV-5 y rAAV-8, tienen una biodistribución in vivo única que los hace serotipos virales atractivos para probar en estudios clínicos.

30 El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus deficiente en replicación, cuyo genoma de ADN de una sola hebra tiene aproximadamente 4,7 kb de longitud incluyendo repeticiones terminales invertidas (ITRs) de 145 nucleótidos. La secuencia nucleotídica del genoma del serotipo 2 de AAV (AAV2) se presenta en Srivastava y cols., *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983) según se corregía por Ruffing y cols., *J. Gen. Virol.*, 75: 3385-3392 (1994). Secuencias de acción cis que dirigen la replicación (rep) de ADN viral, la encapsidación/el empaquetado y la integración en el cromosoma de la célula hospedadora están contenidas dentro de las ITRs. Tres promotores de AAV, p5, p19 y p40 (nombrados por sus localizaciones cartográficas relativas), impulsan la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican genes rep y cap. Los dos promotores de rep (p5 y p19), acoplados con el empalme diferencial del único intrón de AAV en los nucleótidos 2107 y 2227, dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep78, rep68, rep52 y rep40) a partir del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que finalmente son responsables de replicar el genoma viral. El gen cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Sitios de empalme y de comienzo de la traducción no de consenso alternativos son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación de consenso está situado en la posición cartográfica 95 del genoma del AAV. El ciclo vital y la genética de AAV se revisan en Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

45 Las partículas de AAV comprenden una cápside proteínica que tiene tres proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3, que envuelven un genoma de ADN de una sola hebra lineal de ~4,6 kb. Las partículas individuales empaquetan solo una hebra de la molécula de ADN, pero está puede ser la hebra más o menos. Las partículas que contienen cualquier hebra son infecciosas, y la replicación se produce mediante la conversión de la única hebra infecciosa parental en una forma doble, y la amplificación posterior, a partir de cuya progenie las hebras individuales se desplazan y se empaquetan en cápsides. Copias de doble hebra o de una sola hebra de genomas de AAV (a veces denominadas "ADN proviral" o "provirus") pueden insertarse en plásmidos bacterianos o fagémidos, y transfectarse en células infectadas con adenovirus. Véanse Carter, *HANDBOOK OF PARVOVIRUSES*, Vol. I, pp. 169-228 (1989), y Berns, *VIROLOGY*, pp. 1743-1764, Raven Press, (1990) para una revisión general de AAV.

55 La producción de vectores de rAAV requiere generalmente cuatro elementos comunes: 1) una células hospedadora permisiva para la replicación; 2) una función de virus cooperador que puede ser suministrada por virus cooperadores adecuados tales como adenovirus o herpesvirus, o alternativamente por construcciones plasmídicas que contienen las funciones cooperadoras adenovirales mínimas; 3) una construcción rep-cap de transempaquetado; y 4) un medio de producción adecuado.

60 Se pueden producir partículas de AAV recombinante a partir del empaquetado de lisados celulares. Véase, p. ej., Chirico y Trempe (1998) *J. Virol. Methods* 76:31-41. Sin embargo, el lisado celular contiene diversos componentes celulares tales como ADN de la célula hospedadora, proteínas de la célula hospedadora, componentes del medio y cualquier virus cooperador o ADN plasmídico de virus cooperador que se puedan separar del vector de rAAV antes de que sea adecuado para el uso in vivo. Avances recientes en la producción de rAAV incluyen el uso de procedimientos de suspensión de células no adherentes en biorreactores de tanque agitado y condiciones de

producción por las que los vectores de rAAV se liberan en el medio o el sobrenadante reduciendo la concentración de componentes celulares del hospedador presentes en el material de producción pero conteniendo todavía cantidades apreciables de impurezas producidas durante el procedimiento. Véanse la Patente de EE. UU. 6.566.118 y el documento PCT WO 99/11764. Por lo tanto, las partículas de rAAV pueden recogerse del medio y/o el lisado celular y purificarse adicionalmente.

Los métodos que incluyen centrifugación con gradiente de densidad empleados para la purificación de vectores de rAAV y en particular rAAV-2 no se pueden someter a una ampliación a escala. Trabajos recientes para vectores de rAAV-2 han descrito métodos de purificación que emplean cromatografía de intercambio iónico incluyendo cromatografía de intercambio iónico inversa (incluyendo cromatografía catiónica y aniónica). Véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 6.566.118 y el documento PCT WO 99/11764 que divulgan métodos para usar una combinación de cromatografía de intercambio iónico inversa para purificar vectores de virus adenoasociados recombinantes a partir de un sobrenadante de cultivo y/o un lisado celular. Mejoras adicionales en preparaciones de estirpes de rAAV incluyen el uso de tratamiento del lisado celular con desoxicolato, la separación con gradiente de iodoxanol antes de la cromatografía de afinidad, que han dado como resultado rAAV2 de título alto (Clark y cols., *Hum. Mol. Genet.* 10(6):1031-39 (1999); Zolotukhin y cols., *Gene Therapy* 6(6):973-985 (1999)). O'Riordan y cols. (O'Riordan y cols., *J. Gene Med.* 2:444-454 (2000); Patente de EE. UU. N° 7.015.026) también presentaron un procedimiento de preparación cromatográfica ampliable a escala para vectores de virus adenoasociados recombinantes y, según se ejemplifica particularmente, vectores de rAAV-2, usando cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en hidroxipatito, cromatografía de afinidad en sulfato de celulosa y cromatografía en quelato de cinc.

Datos recientes indican que serotipos de la cápside de rAAV tales como rAAV-1, 4, 5 y 8 se unen débilmente a resinas aniónicas bien como una estirpe de virus purificada o bien en presencia de impurezas de producción producidas durante el procedimiento tales como ADN de la célula hospedadora, proteínas de la célula hospedadora, albúmina sérica, componentes del medio y componentes del virus cooperador. Por consiguiente, la purificación de esos serotipos de cápside implica típicamente la cromatografía de intercambio aniónico en combinación con otros métodos de purificación, tales como centrifugación en gradiente de densidad de iodoxinol. Véanse, p. ej., Zolotukhin y cols., *Methods* 28(2):158-167 (2002) y Kaludov y cols., *Hum. Gene Therapy* 13:1235-1243 (2002); y la Publicación de Patente de EE. UU. N° 2004/0110266 A1. Sin embargo, esos métodos no son fácilmente ampliables a escala hasta procedimientos a escala comercial.

Según esto, en el desarrollo de vectores de AAV recombinantes tales como los usados en terapia génica y vacunas génicas, existe una necesidad de métodos para purificar vectores de rAAV a partir de componentes de producción producidos durante el procedimiento incluyendo un virus cooperador, así como proteínas de virus cooperador, proteínas celulares, ADN de células hospedadoras y componentes del medio presentes en la estirpe de producción de rAAV. Tales métodos se deben emplear eficazmente a una escala que sea adecuada para la aplicación práctica de técnicas de terapia génica. Por otra parte, existe una necesidad de desarrollar procedimientos de purificación para vectores de rAAV que sean ampliables a escala para dar un título alto, estirpes comerciales muy purificadas útiles para la terapia génica y vacunas génicas de rAAV. Más particularmente, existe una necesidad de desarrollar procedimientos de purificación para vectores de rAAV que se unan débilmente a resinas cromatográficas y en particular resinas aniónicas.

Aunque la divulgación proporcionada en la presente se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para los expertos normales en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta divulgación que se pueden hacer en la misma ciertos cambios y modificaciones.

Sumario de la invención

La divulgación proporciona métodos para aislar una población de partículas de virus adenoasociado recombinante (rAAV) de cualquier serotipo de cápside de impurezas producidas durante el procedimiento al capturar las partículas de rAAV sobre un medio cromatográfico de apatito en presencia de polietilenglicol (PEG). Los métodos de la divulgación, incluyendo la presente invención, implican un procesamiento aguas arriba (tal como, por ejemplo, centrifugación, tratamiento con Benzonase®, filtración con intercambio aniónico y/o filtración con flujo tangencial) así como un procesamiento aguas abajo (tal como, por ejemplo, inactivación térmica, filtración, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía de intercambio aniónico). Los métodos aguas arriba y aguas abajo se pueden usar solos o en diversas combinaciones.

La divulgación proporciona métodos para aislar una población de partículas de virus adenoasociado recombinante (rAAV) a partir de impurezas producidas durante el procedimiento en una corriente de alimentación, que comprenden las etapas de: (a) poner en contacto una corriente de alimentación que contiene partículas de rAAV con un medio cromatográfico de apatito en presencia de polietilenglicol (PEG), en donde las partículas de rAAV se unen al medio cromatográfico de apatito; y (b) eluir las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito con un tampón de elución que contiene menos de 3% (p/v) de PEG. Sobre la base de la divulgación contenida en la presente, la invención proporciona métodos para aislar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) de impurezas durante el procedimiento en una corriente de alimentación, que comprende las etapas de: (a) (i) poner en contacto una corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV con un medio cromatográfico de apatito

en presencia de polietilenglicol (PEG), en donde las partículas de rAAV se unen al medio cromatográfico de apatito; y (ii) eluir las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito con un tampón de elución que contiene menos de 3% (p/v) de PEG; y (b) unir las partículas de rAAV en la corriente de alimentación eluida del medio cromatográfico de apatito con cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Aspectos adicionales y realizaciones de la invención se recogen en las reivindicaciones adjuntas. En ciertas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito es hidroxiapatito cerámico (CHT) o fluoroapatito cerámico (CFT). En ciertas realizaciones, las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito se eluyen con un tampón de elución que contiene menos de 3% (p/v) de PEG. En ciertas realizaciones, las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito se eluyen con un tampón de elución en ausencia de PEG.

En algunas realizaciones, la unión específica del medio cromatográfico de apatito está entre 10^6 y 10^{16} partículas resistentes a desoxirribonucleasa (DRPs) por mililitro. En algunas realizaciones, la unión específica del medio cromatográfico de apatito está entre 10^8 y 10^{16} partículas resistentes a desoxirribonucleasa (DRPs) por mililitro. En algunas realizaciones, la unión específica del medio cromatográfico de apatito está entre 10^{10} y 10^{16} partículas resistentes a desoxirribonucleasa (DRPs) por mililitro. En algunas realizaciones, la unión específica del medio cromatográfico de apatito está entre 10^{12} y 10^{16} partículas resistentes a desoxirribonucleasa (DRPs) por mililitro. En algunas realizaciones, la unión específica del medio cromatográfico de apatito está entre 10^{14} y 10^{16} partículas resistentes a desoxirribonucleasa (DRPs) por mililitro.

En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de filtración con intercambio aniónico antes de la etapa cromatográfica en apatito, en la que las partículas de rAAV están en el flujo pasante de la filtración con intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el método comprende además concentrar las partículas de rAAV desde el flujo pasante de la filtración con intercambio aniónico mediante filtración con flujo tangencial antes de la etapa cromatográfica en apatito. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de unir las partículas de rAAV de la corriente de alimentación eluida del medio cromatográfico de apatito a un medio cromatográfico aniónico. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de inactivación térmica para inactivar el virus cooperador. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de unir las partículas de rAAV de la corriente de alimentación a una cromatografía de interacción hidrófoba después de la cromatografía en apatito.

En algunas realizaciones, la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en presencia de polietilenglicol (PEG) y un tampón básico. En algunas realizaciones, el tampón básico está entre pH 7,2 y 10, entre pH 7,4 y 10, entre pH 7,6 y 10, entre pH 7,8 y 10, entre pH 8,0 y 10,0, entre pH 8,2 y 10,0, entre pH 8,4 y 10,0, entre pH 8,6 y 10,0, entre pH 8,8 y 10, entre pH 9,0 y 10,0, entre pH 9,2 y 10, entre pH 9,4 y 10,0, entre pH 9,6 y 10,0, o entre pH 9,8 y 10,0. En algunas realizaciones, el tampón básico tiene un pH de aproximadamente cualquiera de 7,2, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2, 8,4, 8,6, 8,8, 9,0, 9,2, 9,4, 9,6, 9,8 y 10,0. Se puede usar cualquier tampón básico conocido en la especialidad. En algunas realizaciones, el tampón básico comprende borato. En algunas realizaciones, el tampón básico es borato.

En algunos casos de la presente divulgación, incluyendo en la presente invención, la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en presencia de polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, se puede usar entre aproximadamente 3% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v) de PEG. En algunas realizaciones, la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en presencia de aproximadamente 3% (p/v), aproximadamente 3,5% (p/v), aproximadamente 4% (p/v), aproximadamente 4,5% (p/v), aproximadamente 5% (p/v), aproximadamente 5,5% (p/v), aproximadamente 6% (p/v), aproximadamente 6,5% (p/v), aproximadamente 7% (p/v), aproximadamente 7,5% (p/v), aproximadamente 8% (p/v), aproximadamente 8,5% (p/v), aproximadamente 9% (p/v), aproximadamente 9,5% (p/v) o aproximadamente 10% (p/v) de PEG.

En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular medio entre aproximadamente 5.000 (PEG5000) gramos por mol y aproximadamente 15.000 (PEG15000) gramos por mol, tal como, aproximadamente 5.000 gramos por mol (PEG5000), aproximadamente 6.000 (PEG6000) gramos por mol, aproximadamente 7.000 (PEG7000) gramos por mol, aproximadamente 8.000 (PEG8000) gramos por mol, aproximadamente 9.000 (PEG9000) gramos por mol, aproximadamente 10.000 (PEG10000) gramos por mol, aproximadamente 11.000 (PEG11000) gramos por mol, aproximadamente 12.000 (PEG12000) gramos por mol, aproximadamente 13.000 (PEG13000) gramos por mol, aproximadamente 14.000 (PEG14000) gramos por mol, y aproximadamente 15.000 (PEG15000) gramos por mol. En ciertas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5.000 (PEG5000) gramos por mol. En ciertas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 6.000 (PEG6000) gramos por mol. En ciertas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 8.000 (PEG8000) gramos por mol. En ciertas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 10.000 (PEG10000) gramos por mol. En ciertas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 15.000 (PEG15000) gramos por mol.

En algunas realizaciones, la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en presencia de entre aproximadamente 3% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v) de PEG6000. En algunas realizaciones, la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en presencia de aproximadamente 3% (p/v) de PEG6000. En algunas

15000. En algunas realizaciones, la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en presencia de aproximadamente 10% (p/v) de PEG 15000.

5 En algunas realizaciones, la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en un tampón que comprende aproximadamente 20 mM de borato pH 9,0, y aproximadamente 5% de PEG (tal como PEG6000). En algunas realizaciones, la corriente de alimentación se mezcla en línea con un volumen igual de un tampón que comprende aproximadamente 40 mM de borato a pH 9,0 y aproximadamente 10% de PEG para dar una concentración final de aproximadamente 20 mM de borato a pH 9,0 y aproximadamente 5% de PEG.

10 En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito con las partículas de rAAV unidas al medio se lava para retirar las impurezas producidas durante el procedimiento antes de eluir las partículas de rAAV. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene concentraciones decrecientes de PEG para retirar las impurezas producidas durante el procedimiento. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene entre aproximadamente 3% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v) de PEG. En algunas realizaciones, el tampón de lavado contiene aproximadamente cualquiera de 10% (p/v), 9,5% (p/v), 9% (p/v), 8,5% (p/v), 8% (p/v), 7,5% (p/v), 7% (p/v), 6,5% (p/v), 6% (p/v), 5,5% (p/v), 5% (p/v), 4,5% (p/v), 4% (p/v), 3,5% (p/v) y 3% (p/v) de PEG. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene 7,5% (p/v) de PEG6000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene 7,5% (p/v) de PEG8000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene 7,5% (p/v) de PEG 10000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene 7,5% (p/v) de PEG 15000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene aproximadamente 5% (p/v) de PEG6000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene aproximadamente 5% (p/v) de PEG8000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene aproximadamente 5% (p/v) de PEG 10000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene aproximadamente 5% (p/v) de PEG15000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG6000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG8000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG 10000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG15000. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que no contiene PEG.

40 En algunas realizaciones, el tampón de lavado contiene tampones conocidos en la especialidad. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en borato, ácido N-2-hidoxietilpiperacino-N'-2-etanosulfónico (HEPES) y Tris-HCl. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es borato. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es HEPES. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es Tris-HCl. En algunas realizaciones, el tampón de lavado está a pH básico. En algunas realizaciones, el tampón de lavado tiene un pH entre pH 7,0 y pH 10,0, entre pH 7,2 y pH 10,0, entre pH 7,4 y pH 10,0, entre pH 7,6 y pH 10,0, entre pH 7,8 y pH 10,0, pH 8,0 y pH 10,0, pH 8,2 y pH 10,0, entre pH 8,4 y pH 10,0, entre pH 8,6 y pH 10,0, entre pH 8,8 y pH 10,0, entre pH 9,0 y pH 10,0, entre pH 9,2 y pH 10,0, entre pH 9,4 y pH 10,0, entre pH 9,6 y pH 10,0 o entre pH 9,8 y pH 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado tiene un pH de 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2, 8,4, 8,6, 8,8, 9,0, 9,2, 9,4, 9,6, 9,8 o 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es borato a un pH entre 8,0 y 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es borato a pH 8,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es borato a pH 9,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es borato a pH 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es HEPES a un pH entre 7,0 y 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es HEPES a pH 7,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es HEPES a pH 8,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es HEPES a pH 9,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es HEPES a pH 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es Tris-HCl a un pH entre 7,0 y 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es Tris-HCl a pH 7,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es Tris-HCl a pH 8,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es Tris-HCl a pH 9,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende o es Tris-HCl a pH 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende además entre 100 y 500 mM de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende además entre 50 y 250 mM de NaCl.

65 En algunas realizaciones, la etapa de lavado comprende un primer lavado con un tampón de lavado que comprende aproximadamente 30 mM de borato a pH aproximadamente 9,0 y aproximadamente 7,5% de PEG; un segundo lavado con un tampón de lavado que comprende aproximadamente 150 mM de fosfato potásico, aproximadamente 20 mM de borato a pH aproximadamente 9,0 y aproximadamente 5% de PEG; un tercer lavado con un tampón de lavado que comprende aproximadamente 20 mM de borato a pH aproximadamente 9,0 y aproximadamente 5% de PEG; y un

cuarto lavado con un tampón de lavado que comprende aproximadamente 20 mM de HEPES a pH aproximadamente 7,0 y 150 mM de NaCl.

5 En algunos casos de la presente divulgación, las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito se eluyen con un tampón de elución que contiene bajas concentraciones de PEG o en ausencia de PEG. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG, menos de aproximadamente 2% (p/v) de PEG o menos de aproximadamente 1% (p/v) de PEG. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene aproximadamente 2,5% (p/v), aproximadamente 2% (p/v), aproximadamente 1,5% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) o aproximadamente 0,5% (p/v) de PEG o no contiene PEG. En algunas realizaciones, el
10 tampón de elución contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG6000. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG8000. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG10000. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene menos de aproximadamente 3% (p/v) de PEG15000. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito se eluyen con un tampón de elución en ausencia de PEG. En algunas realizaciones, el
15 tampón de elución comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en borato, ácido N-2-hidroxietilpiperacino-N'-2-etanosulfónico (HEPES) y Tris-HCl. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende o es borato. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende o es HEPES. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende o es Tris-HCl. En algunas realizaciones, el tampón de elución está a pH neutro. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende o es HEPES a pH neutro. En algunas
20 realizaciones, el tampón de elución comprende o es Tris-HCl a pH neutro. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende además menos de 100 mM de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende además entre 50 y 250 mM de NaCl. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito se eluyen con un tampón de elución que comprende aproximadamente 50 mM de fosfato potásico, aproximadamente 20 mM de
25 HEPES a pH aproximadamente 7,0, y aproximadamente 150 mM de NaCl.

En algunas realizaciones, el método para aislar las partículas de rAAV de impurezas producidas durante el procedimiento en una corriente de alimentación comprende las etapas de: (a) poner en contacto una corriente de
30 alimentación que contiene las partículas de rAAV con un medio cromatográfico de apatito en presencia de aproximadamente 5% (p/v) de PEG en un tampón básico a pH aproximadamente 9,0, en donde las partículas de rAAV se unen al medio cromatográfico de apatito; (b) lavar el medio cromatográfico de apatito con un primer tampón de lavado que comprende aproximadamente 30 mM de borato a pH aproximadamente 9,0 y aproximadamente 7,5% de PEG; (c) lavar el medio cromatográfico de apatito con un segundo tampón de lavado que comprende aproximadamente
35 150 de fosfato potásico, aproximadamente 20 mM de borato a pH aproximadamente 9,0, y aproximadamente 5% de PEG; (d) lavar el medio cromatográfico de apatito con un tercer tampón de lavado que comprende aproximadamente 20 mM de borato a pH aproximadamente 9,0 y aproximadamente 5% de PEG; (e) lavar el medio cromatográfico de apatito con un cuarto tampón de lavado que comprende aproximadamente 20 mM de HEPES a pH aproximadamente
40 7,0 y 150 mM de NaCl; y (f) eluir las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito con un tampón de elución que comprende aproximadamente 50 mM de fosfato potásico, aproximadamente 20 mM de HEPES a pH aproximadamente 7,0 y aproximadamente 150 mM de NaCl.

También se describen en la presente métodos para aislar una población de partículas de virus adenoasociado recombinante (rAAV) de impurezas producidas durante el procedimiento en una corriente de alimentación, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV
45 con un medio de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en un tampón de salinidad alta, en donde las partículas de rAAV y las impurezas producidas durante el procedimiento se unen al medio de HIC; y (b) eluir las partículas de rAAV unidas al medio de HIC con un tampón de salinidad media. En algunos casos, el medio de HIC se selecciona del grupo que consiste en resina Tosoh Butyl 650M, Tosoh SuperButyl 650C, Tosoh Phenyl 650C, EMD Fractogel Phenyl y Tosoh Has(butyl). En algunos casos, el tampón de salinidad alta comprende o es entre 0,5 M y 2,0 M de citrato (p. ej., citrato sódico). En algunos casos, el tampón de salinidad alta comprende aproximadamente cualquiera
50 de 0,5 M, 0,75 M, 1,0 M, 1,25 M, 1,5 M, 1,75 M, y 2,0 M de citrato. En algunos casos, el tampón de salinidad media comprende o es menos de 0,5 M de citrato (p. ej., citrato sódico). En algunos casos, el tampón de salinidad media comprende entre 0,5 M y aproximadamente 0,3 M de citrato. En algunos casos, el tampón de salinidad media comprende aproximadamente cualquiera de 0,45 M, 0,4 M, 0,35 M, 0,3 M y 0,25 M de citrato. En algunos casos, el
55 tampón de salinidad alta comprende además entre 1 y 100 mM de fosfato. En algunos casos, el tampón de salinidad media comprende además entre 1 y 100 mM de fosfato. En algunos casos, el tampón de salinidad media eluye las partículas de rAAV sin eluir partículas de rAAV con cápsides vacías, cápsides parcialmente desnaturalizadas, cápsides menos infecciosas y/o cápsides parcialmente llenas.

60 En cualquiera de los casos de la presente divulgación o cualesquiera realizaciones descritos en la presente, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-14, AAV-15 y AAV-16. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV-1, AAV-4, AAV-5, y AAV-8. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV de AAV-1. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV de AAV-4. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV de AAV-5. En
65

algunas realizaciones, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV de AAV-8. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una proteína de la cápside de AAV procedente de un serotipo de AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-14, AAV-15 y AAV-16. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV que es un aglutinante aniónico débil. En algunas realizaciones, el serotipo de la cápside de AAV que es una unión aniónica débil se selecciona del grupo que consiste en AAV-1, AAV-4, AAV-5 y AAV-8. En algunas realizaciones, la composición que contiene partículas de rAAV comprende además contaminantes de cultivos de producción. En algunas realizaciones, los contaminantes de cultivos de producción comprenden partículas de rAAV dañadas, contaminantes de células hospedadoras, contaminantes virus cooperadores y/o contaminantes de cultivos celulares. En algunas realizaciones, los contaminantes de células hospedadoras comprenden ADN de células hospedadoras, plásmidos, o una proteína de célula hospedadora. En algunas realizaciones, los contaminantes del virus cooperador comprenden partículas del adenovirus, ADN del adenovirus o proteínas del adenovirus. En algunas realizaciones, los contaminantes del cultivo celular comprenden componentes del medio, albúmina sérica u otras proteínas séricas. En algunas realizaciones, los contaminantes del cultivo celular comprenden componentes del medio. En algunas realizaciones, los contaminantes del cultivo celular no comprenden albúmina sérica u otras proteínas séricas.

Se ha de entender que una, alguna o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en la presente se pueden combinar para formar otras realizaciones de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** presenta los resultados de la digestión con Benzonase® del sobrenadante depurado de la cosecha del cultivo de producción de rAAV. Los resultados demuestran que no estaba presente ADN de alto peso molecular después de la digestión con Benzonase®.

La **Figura 2** presenta un rastreo espectrofotométrico típico para una resina típica cribada con respecto a la afinidad de unión a rAAV según se describe en el Ejemplo 4. Se indicaban la absorbancia (AU) y la conductividad (mS/cm).

La **Figura 3** presenta un análisis de capacidad de saturación con y sin PEG. Se usaron dos cultivos de producción de rAAV modélicos para juzgar la capacidad de la resina de apatito (CFT tipo I). Panel superior: Saturación durante la carga de corrientes de alimentación que contienen suero o libres de suero en presencia o ausencia de aproximadamente 5% (p/v) de PEG6000 en la carga. Los volúmenes de carga se refieren a la corriente de alimentación de partida, antes de la dilución en línea 1:1, y se normalizaron por ml de volumen de resina. Panel inferior: Volúmenes de carga (ml) en los que se observaba 1% de saturación, y recuperación en la fracción eluida. Las cosechas de TFF utilizadas en el experimento estaban en una concentración de aproximadamente 10^{16} DRP/ml para los vectores de rAAV. En presencia de aproximadamente 5% (p/v) de PEG6000, 150 ml de la cosecha de TFF se cargaron a los 1,2 ml de resina de CFT sin saturación, lo que se definió como la presencia de >1% de rAAV en el flujo pasante de columna, correspondiente a una carga de $1,8 \times 10^{14}$ de DRP de rAAV totales.

La **Figura 4** presenta un cromatograma de CHT I típico. Se muestran en línea medidas de la absorbancia UV A_{280} (AU, unidad de absorbancia) y la conductividad (mS/cm) mediante el Amersham 3 mm Skid. Las llaves indican los principales segmentos del programa descrito en el Ejemplo 7. "NaOH" indica la etapa de descontaminación de la columna.

La **Figura 5** muestra la pureza relativa de vectores de rAAV eluidos desde resinas de apatito. El Panel A muestra la distribución del vector entre el flujo pasante/el recorrido (FT), el lavado con alto contenido de fosfato/5% (p/v) de PEG6000 (PO_4), los lavados para retirar fosfato y PEG6000 (WII/WIII) y la elución. Ninguna de las diferencias entre los casos son significativas dentro de la precisión de la analítica, y es típica la falta de balance de masas. El Panel B muestra los carriles pertinentes procedentes de una SDS PAGE con tinción con Sypro orange con fracciones de elución desde la columna de apatito. Cada muestra se cargó en 2×10^{11} DRP/carril; la diferencia de migración aparente entre los carriles es un artefacto salino debido a que tiene que concentrar la elución de CFT mediante la evaporación hasta un volumen que cupiera en el gel. Las únicas bandas predominantes parecen ser proteínas de la cápside de AAV. El Panel C muestra los carriles pertinentes de una transferencia Western de Ad5 con carriles reordenados por claridad, demostrando una depuración comparable de proteínas Ad5.

La **Figura 6** muestra el examen de la purificación a través del procedimiento mediante SDS-PAGE. Muestras producidas durante el procedimiento a partir de una cosecha de cultivo de producción representativa se probaron en un gel de poliácridamida al 10% desnaturizador/reductor y se tiñó con Sypro orange. Todas las muestras después de la cosecha se cargaron en 1×10^{10} DRP/carril. Las dos muestras aguas arriba antes de la etapa de concentración de TFF (etapa de depuración inicial y flujo pasante de AEX) solo se podían cargar en 1×10^9 DRP/carril debido a restricciones de volumen en el gel. Se cargó β -galactosidasa (β -Gal) en 50 ng/carril para examinar la sensibilidad y la consistencia de la tinción a través del gel. Se indican las tres proteínas de la cápside de AAV1 (VP1, 2, y 3).

La **Figura 7** muestra la recuperación por etapas para la purificación de rAAV según se describe en los Ejemplos 1-12. La DRP total presente en el sobrenadante antes de la cosecha se definió como 100%. La recuperación en cada etapa

es la DRP total recuperada con relación a DRP total procesada a lo largo de esa etapa. La recuperación global para todo el procedimiento era aproximadamente 28%. D4 sup: cultivo de producción; AEX FT: flujo pasante del intercambio aniónico (Mustang® Q); captura: cromatografía en apatito; calor: inactivación térmica o destrucción térmica; HIC: cromatografía de interacción hidrófoba; SEC: cromatografía de exclusión por tamaño; AEX: intercambio aniónico.

5

Descripción detallada

Un objetivo de esta divulgación, incluyendo la presente invención, es proporcionar métodos para aislar una población de partículas de virus adenoasociado recombinante (rAAV) para cualquier serotipo de la cápside de AAV de contaminantes del cultivo de producción tales como partículas de rAAV dañadas, virus cooperadores, proteínas de virus cooperadores, plásmidos, proteínas y ADN celulares, componentes del medio, proteínas séricas, y similares. Por otra parte, los métodos de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, proporcionan procedimientos ortogonales comercialmente ampliables a escala de acuerdo con los requisitos reguladores para el aislamiento de una población de partículas de rAAV de cosechas o corrientes de alimentación de cultivos de producción de rAAV de título alto. Las poblaciones de partículas de rAAV aisladas mediante los métodos de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, están sustancialmente libres de contaminantes, incluyendo contaminantes del cultivo de producción y/o contaminantes producidos durante el procedimiento, tales como partículas de rAAV dañadas, virus cooperadores, proteínas de virus cooperadores, plásmidos, proteínas y ADN celulares, componentes del medio, proteínas séricas y glucanos. Los métodos de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, son particularmente adecuados para serotipos de vectores de rAAV que son aglutinantes aniónicos débiles tales como, por ejemplo, rAAV-1, rAAV-4, rAAV-5 y rAAV-8. La divulgación, incluyendo la presente invención, contempla además un método para aislar una población de título alto de partículas de rAAV sustancialmente libres de contaminantes, incluyendo contaminantes del cultivo de producción y/o contaminantes producidos durante el procedimiento, adecuado para el uso en aplicaciones de terapia génica sin la necesidad de realizar una centrifugación con gradiente de densidad.

25

Definiciones

El término "aislado" o "purificado", según se usa en la presente, se refiere a una preparación de partículas de rAAV desprovista de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes cuando las partículas de rAAV son las presentes en la naturaleza o se preparan inicialmente a partir de las mismas. Así, por ejemplo, se pueden preparar partículas de rAAV aisladas usando una técnica de purificación para enriquecerla desde una mezcla fuente, tal como un lisado de cultivo o un sobrenadante del cultivo de producción. El enriquecimiento se puede medir de una variedad de modos, tales como, por ejemplo, por la proporción de partículas resistentes a desoxirribonucleasa (DRPs) presentes en una solución, o por la infectividad, o se puede medir con relación a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente, tal como contaminantes, incluyendo contaminantes del cultivo de producción o contaminantes producidos durante el procedimiento, incluyendo virus cooperadores, componentes del medio, y similares, según se define posteriormente.

30

Se dice que una preparación de rAAV está "sustancialmente libre" de virus cooperador si la relación de partículas de AAV infecciosas a partículas de virus cooperador infecciosas es al menos aproximadamente $10^2:1$; preferiblemente al menos aproximadamente $10^4:1$, más preferiblemente al menos aproximadamente $10^6:1$; aún más preferiblemente al menos aproximadamente $10^8:1$. Preferiblemente, las preparaciones también están libres de cantidades equivalentes de proteínas del virus cooperador (es decir, proteínas que estarían presentes como resultado de tal nivel de virus cooperador si las impurezas de las partículas de virus cooperador apuntadas anteriormente estuvieran presentes en forma alterada). La contaminación viral y/o de proteínas celulares se puede observar generalmente como la presencia de bandas de tinción con Coomassie sobre geles de SDS (p. ej., la aparición de bandas distintas a las correspondientes a las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3).

40

El término "aglutinante aniónico débil" o "aglutinante aniónico de baja afinidad", según se usa en la presente intercambiablemente, se refiere a una partícula de rAAV que tiene un serotipo de la cápside que, en presencia de contaminantes (incluyendo contaminantes del cultivo de producción o contaminantes producidos durante el procedimiento), no se une con suficiente afinidad para permitir el aislamiento de las partículas de rAAV de otros contaminantes del cultivo de producción de rAAV. Tales serotipos de la cápside son conocidos en la especialidad e incluyen, sin limitación, AAV-1, AAV-5, AAV-8 y AAV-4. Según se describe en la especialidad, tales aglutinantes aniónicos débiles se purifican generalmente mediante métodos que incluyen al menos una etapa de centrifugación por densidad que incluye centrifugación con gradiente de iodixinol (vendido bajo el nombre comercial Optiprep®) o cloruro de cesio.

50

Según se usa en la presente, el término "virus cooperador" o "virus cooperador contaminante" se refiere a un virus usado cuando se producen copias de un vector viral dependiente del virus cooperador, tal como un virus adenoasociado, que no tiene la capacidad de replicarse por sí mismo. El virus cooperador se usa para coinfectar células junto con el vector viral y proporciona las proteínas necesarias para la replicación del genoma del vector viral. El término abarca partículas virales intactas, cápsides vacías, ADN viral y similares. Virus cooperadores comúnmente usados para producir partículas de rAAV incluyen adenovirus, virus de herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus vacunal.

60

65

El término "cultivo de producción", según se usa en la presente, se refiere a un recipiente que contiene los componentes necesarios para la producción de partículas de vectores de rAAV. Los cultivos de producción incluyen, sin limitación, los siguientes componentes: 1) una célula hospedadora adecuada; 2) función de virus cooperador; 3) genes y productos génicos de rep y cap de AAV; 4) el transgén terapéutico flanqueado por secuencias de ITR de AAV; y 5) un medio adecuado, componentes del medio y complementos del medio, incluyendo sin limitación, suero, proteínas derivadas del suero, vitaminas, aminoácidos esenciales y no esenciales y glucosa, que se sabe que apoyan la producción de rAAV.

Según se usa en la presente, los términos "contaminantes", "contaminantes del cultivo de producción", "contaminantes producidos durante el procedimiento", "impurezas producidas durante el procedimiento", "impurezas" o "contaminantes", que se usan intercambiamente en la presente, se refieren, sin limitación, a formulaciones de medio que se sabe en la especialidad que apoyan la producción de vectores de rAAV; complementos del medio tales como sales, suero de ternero, complementos de aminoácidos, complementos vitamínicos, factores de crecimiento, albúmina sérica y otras proteínas de bajo peso molecular presentes en formulaciones de medio conocidas en la especialidad; células hospedadoras permisivas, proteínas de células hospedadoras o ADN de células hospedadoras; virus cooperadores, proteínas de virus cooperadores o ADN de virus cooperadores tales como proteínas de adenovirus o herpesvirus silvestres; y otros materiales de cultivos de producción no relacionados o relacionados con vectores de rAAV introducidos durante el procedimiento de purificación tales como glucanos o tampones cromatográficos utilizados en la purificación de vectores de rAAV de corrientes de alimentación.

El término "cosecha del cultivo de producción", según se usa en la presente, se define como una solución que comprende partículas de vectores de rAAV producidas a partir de cultivos de producción de vectores de rAAV por medios conocidos en la especialidad, incluyendo sin limitación procedimientos de transfección, producción de líneas celulares estables, sistemas de producción de híbridos de Ad o sistemas de producción de baculovirus. Por otra parte, el término "cosecha del cultivo de producción", según se usa en la presente, se refiere al material aislado del recipiente de cultivo de producción e incluye tanto materiales aislados mediante lisis de células productoras de rAAV por medios conocidos en la especialidad como materiales aislados de cultivos de producción de rAAV mantenidos bajo condiciones de cultivo conocidas en la especialidad para dar partículas de rAAV liberadas en el medio a partir de células intactas. Una cosecha del cultivo de producción puede contener alguno o la totalidad de los siguientes, sin limitación: partículas de vectores de rAAV, componentes de cultivos de producción, tales como componentes del medio, proteínas de células hospedadoras, ADN de células hospedadoras, células hospedadoras, virus cooperadores, proteínas de virus cooperadores, ADN de virus cooperadores, ADN plasmídico, ADN viral portador, suero, proteínas derivadas del suero y complementos del medio.

El término "corriente de alimentación", según se usa en la presente, se refiere a una fuente de partículas de vector de rAAV que se carga sobre, se hace pasar a través o se aplica a una matriz cromatográfica. Corrientes de alimentación de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, incluyen cosechas del cultivo de producción y materiales aislados de etapas cromatográficas previas de la divulgación, ya estuviera el material presente como flujo pasante procedente de la etapa, se uniera y eluyera en la etapa previa, estuviera presente en el volumen de huecos de la etapa previa o estuviera presente en cualquier fracción obtenida durante la purificación de partículas de rAAV. Estas corrientes de alimentación pueden incluir uno o más "contaminantes", "contaminantes del cultivo de producción", "contaminantes producidos durante el procedimiento", "impurezas producidas durante el procedimiento" o "impurezas" o "contaminantes", según se definen en la presente.

Los términos "captura", "unido", "se une" o "unión", según se usan en la presente intercambiamente, se refieren a la unión, la adherencia o el pegado de un componente de una corriente de alimentación a un medio cromatográfico. Los componentes se pueden unir a un medio cromatográfico mediante cualquier fuerza o química conocida en la especialidad, incluyendo sin limitación hidrófoba, iónica (incluyendo aniónica y catiónica), afinidad, quelación a metales y quelación. Los componentes se pueden unir a un medio cromatográfico mediante más de un tipo de química tal como en medios cromatográficos de apatito.

Los términos "resina de apatito", "medio cromatográfico de apatito", "matriz de apatito" o "medio de apatito", según se usan en la presente intercambiamente, se refieren a un medio cromatográfico comprendido por un mineral de fosfato cálcico, e incluye sin limitación medios cromatográficos de hidroxiapatito cerámico (CHT) y fluoroapatito cerámico (CFT).

Los términos "modo mixto" o "multimodal" se refieren a medios cromatográficos que tienen la capacidad para más de una química de unión. Medios cromatográficos en modo mixto incluyen sin limitación medios cromatográficos de apatito, que son capaces de exhibir unión por afinidad a metales a través de los restos calcio, unión por enlaces de hidrógeno a través de los grupos hidroxilo presentes sobre la cadena principal, repulsión de cargas positivas y atracción de cargas negativas a través de los restos calcio y repulsión de cargas negativas y atracción de cargas positivas a través de los restos fosfato presentes sobre el medio.

Una referencia general a "la composición" o "composiciones" incluye y es aplicable a composiciones de la divulgación, incluyendo la presente invención.

Según se usa en la presente, la forma singular de los artículos "un", "uno(a)", y "el(la)" incluye referencias plurales a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, la expresión "una partícula de virus" incluye una o más partículas de virus.

5 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro de por sí. Por ejemplo, una descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X."

10 Se entiende que los aspectos y las realizaciones de la invención en la presente incluyen que consisten y/o que consisten esencialmente en aspectos y realizaciones.

Producción de vectores de rAAV

15 Se conocen en la técnica numerosos métodos para la producción de vectores de rAAV, incluyendo sistemas de transfección, de producción de líneas celulares estables y de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus-AAV, híbridos de herpesvirus-AAV e híbridos de baculovirus-AAV. Los cultivos de producción de rAAV para la producción de partículas de virus rAAV requieren todos; 1) células hospedadoras adecuadas, incluyendo, por ejemplo, líneas celulares derivadas de ser humano tales como células HeLa, A549 o 293, o líneas celulares derivadas de insecto tales como SF-9, en el caso de sistemas de producción de baculovirus; 2) función de virus cooperador adecuada, proporcionada por adenovirus silvestres o mutantes (tales como adenovirus sensibles a la temperatura), herpesvirus, baculovirus, o una construcción plasmídica que proporciona funciones cooperadoras; 3) genes y productos génicos rep y cap de AAV; 4) un transgén (tal como un transgén terapéutico) flanqueado por secuencias de ITR de AAV; y 5) medios y componentes de medios adecuados para soportar la producción de rAAV. Medios adecuados conocidos en la especialidad se pueden usar para la producción de vectores de rAAV. Estos medios incluyen, sin limitación, medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH incluyendo medio de Eagle modificado (MEM), medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), formulaciones habituales tales como las descritas en la Patente de EE. UU. N° 6.566.118, y medio Sf-900 II SFM según se describe en la Patente de EE. UU. N° 6.723.551, particularmente con respecto a formulaciones de medios habituales para el uso en la producción de vectores de AAV recombinantes.

20

25

30

Medios de cultivo de producción de rAAV adecuados de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, se pueden complementar con suero o proteínas recombinantes derivadas de suero en un nivel de 0,5%-20% (v/v o p/v). Alternativamente, como se sabe en la especialidad, se pueden producir vectores de rAAV en condiciones libres de suero que también se pueden denominar medios sin productos derivados de animales. Un experto normal en la especialidad puede apreciar que medios comerciales o habituales diseñados para soportar la producción de vectores de rAAV también se pueden complementar con uno o más componentes de cultivo celular conocidos en la especialidad, incluyendo sin limitación glucosa, vitaminas, aminoácidos y/o factores de crecimiento, a fin de incrementar el título de rAAV en cultivos de producción.

35

40

Los cultivos de producción de rAAV se pueden desarrollar bajo una variedad de condiciones (a lo largo de un amplio intervalo de temperatura, durante espacios de tiempo variables, y similares) adecuadas para la célula hospedadora particular que se utilice. Como se sabe en la especialidad, los cultivos de producción de rAAV incluyen cultivos dependientes de la adhesión que se pueden cultivar en recipientes dependientes de la adhesión adecuados tales como, por ejemplo, botellas giratorias, filtros de fibra hueca, microportadores y biorreactores de lecho relleno o de lecho fluidizado. Los cultivos de producción de vectores de rAAV también pueden incluir células hospedadoras adaptadas a suspensiones tales como células HeLa, 293 y SF-9 que se pueden cultivar de una variedad de modos incluyendo, por ejemplo, matraces rotatorios, biorreactores de tanque agitado y sistemas desechables tales como el sistema de bolsa de Wave.

45

50

Las partículas de vector de rAAV de la divulgación, incluyendo la presente invención, se pueden cosechar de cultivos de producción de rAAV mediante la lisis de las células hospedadoras del cultivo de producción o mediante la cosecha de los medios agotados a partir del cultivo de producción, con tal de que las células se cultiven bajo condiciones que se sabe en la especialidad que provocan la liberación de partículas de rAAV en el medio a partir de células intactas, según se describe más a fondo en la Patente de EE. UU. N° 6.566.118). Métodos adecuados para someter a lisis a las células también se conocen en la especialidad e incluyen, por ejemplo, múltiples ciclos de congelación/descongelación, ultrasonidos, microfluidización y tratamiento con productos químicos, tales como detergentes y/o proteasas.

55

60 Purificación de vectores de rAAV

En la cosecha, los cultivos de producción de rAAV de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, pueden contener uno o más de los siguientes: (1) proteínas de células hospedadoras; (2) ADN de células hospedadoras; (3) ADN plasmídico; (4) virus cooperadores; (5) proteínas de virus cooperadores; (6) ADN de virus cooperadores; y (7) componentes del medio incluyendo, por ejemplo, proteínas séricas, aminoácidos, transferrinas y otras proteínas de bajo peso molecular. Además, los cultivos de producción de rAAV incluyen además partículas de rAAV que tienen un

65

serotipo de la cápside de AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-14, AAV-15 y AAV-16. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV tienen un serotipo de la cápside de AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV-1, AAV-4, AAV-5 y AAV-8.

En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, la cosecha del cultivo de producción de rAAV se depura para retirar residuos de células hospedadoras. En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, la cosecha del cultivo de producción se depura mediante filtración a través de una serie de filtros de profundidad incluyendo, por ejemplo, una clase D0HC Millipore Millistak+ HC Pod Filter, una clase A1HC Millipore Millistak+ HC Pod Filter y un filtro Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC Hydrophilic Membrane de 0,2 µm. La depuración también se puede alcanzar mediante una variedad de otras técnicas estándar conocidas en la especialidad, tales como centrifugación o filtración a través de cualquier filtro de acetato de celulosa de un tamaño de poro de 0,2 µm o más conocido en la especialidad.

En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, la cosecha del cultivo de producción de rAAV se trata adicionalmente con Benzonase® para digerir cualquier ADN de alto peso molecular presente en el cultivo de producción. En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, la digestión con Benzonase® se realiza bajo condiciones estándar conocidas en la especialidad incluyendo, por ejemplo, una concentración final de 1-2,5 unidades/ml de Benzonase® a una temperatura que varía de ambiente a 37°C durante un período de 30 minutos a varias horas.

Las partículas de rAAV se pueden aislar o purificar usando una o más de las siguientes etapas: filtración con intercambio iónico de flujo pasante, filtración con flujo tangencial (TFF) para concentrar las partículas de rAAV, captura de rAAV mediante cromatografía en apatito, inactivación térmica de un virus cooperador, captura de rAAV mediante cromatografía de interacción hidrófoba, intercambio de tampones mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), nanofiltración y captura de rAAV mediante cromatografía de intercambio aniónico. Estas etapas se pueden usar solas, en diversas combinaciones o en diferentes órdenes. En algunas realizaciones, el método comprende todas las etapas en el orden descrito posteriormente.

Filtración con intercambio aniónico

Opcionalmente, en algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, la cosecha del cultivo de producción depurada y tratada con Benzonase® se somete a filtración con intercambio aniónico bajo condiciones en las que el vector de rAAV está presente en el flujo pasante y se retiene virus cooperador contaminante sobre el filtro cargado. A la intensidad iónica de la cosecha del cultivo de producción de rAAV, las partículas de rAAV se pueden distinguir del virus cooperador, por ejemplo, adenovirus, mediante el paso a través de un filtro aniónico tal como un filtro Mustang® Q (Pall Corp., East Hills, NY). Un experto en la especialidad puede determinar el tamaño y el número de filtros necesarios para alcanzar la reducción logarítmica óptima de adenovirus (LRV) y proteínas adenovirales presentes en el cultivo de producción depurado, tratado con Benzonase® y filtrado aniónicamente. En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, la LRV es al menos un logaritmo y mayor de diez logaritmos. En un caso o realización preferidos, la LRV es al menos dos y mayor de ocho logaritmos. En un caso o una realización más preferidos, la LRV es al menos seis logaritmos.

Concentración por filtración con flujo tangencial (TFF)

En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, el flujo pasante procedente de la filtración aniónica de la corriente de alimentación depurada tratada con Benzonase® se concentra a través de filtración con flujo tangencial ("TFF") antes de aplicarse a un medio cromatográfico de apatito. La concentración a gran escala de virus usando ultrafiltración TFF ha sido descrita por R. Paul y cols., HUMAN GENE THERAPY, 4:609-615 (1993). La concentración por TFF de la corriente de alimentación permite que un volumen técnicamente manejable de corriente de alimentación se someta a las etapas cromatográficas de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, y permite un dimensionamiento más razonable de las columnas sin la necesidad de tiempos de recirculación prolongados. En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, la corriente de alimentación de rAAV se concentra entre al menos dos veces y al menos diez veces. En algunos casos o realizaciones, la corriente de alimentación se concentra entre al menos diez veces y al menos veinte veces. En algunos casos o realizaciones, la corriente de alimentación se concentra entre al menos veinte veces y al menos cincuenta veces. Un experto normal en la especialidad también entenderá que la TFF también se puede usar en cualquier etapa del procedimiento de purificación en la que sea deseable intercambiar tampones antes de realizar la siguiente etapa en el procedimiento de purificación.

Captura de rAAV mediante cromatografía en apatito en presencia de polietilenglicol (PEG)

Los procedimientos aprobados por la FDA para la purificación de proteínas y otros productos biológicos adecuados para el uso en estudios clínicos humanos y productos farmacéuticos se basan en procedimientos ortogonales a escala comercial. Se considera que un esquema de purificación de varias etapas incluye un procedimiento ortogonal si emplea mecanismos de separación que son distintos entre sí, representando cada etapa un eje en el espacio cartesiano. Por ejemplo, un procedimiento en dos etapas que use intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se consideraría ortogonal. Los procedimientos para retirar contaminantes, tales como contaminantes

del cultivo de producción o contaminantes producidos durante el procedimiento, de una cosecha del cultivo de producción o una corriente de alimentación descrita en la presente son procedimientos ortogonales que incluyen etapas tanto de captura como de flujo pasante sobre una variedad de medios cromatográficos para el producto final (es decir, un vector de rAAV). Se ha demostrado en la técnica que los vectores de rAAV (específicamente rAAV-2) se unen a resinas aniónicas. Se ha demostrado que vectores de rAAV tales como rAAV-1, -5 y -8 se unen mucho menos fuertemente que rAAV-2 a medios de intercambio aniónico en presencia de componentes de producción tales como albúmina sérica, componentes del virus cooperador, componentes del medio de producción y ADN de células hospedadoras, dando como resultado un esquema de purificación menos eficaz y de calidad inferior.

Estrategias de purificación previas descritas en la especialidad para aglutinantes aniónicos de afinidad inferior tales como AAV-1 incluían una etapa de gradiente de iodixinol que reduce la concentración relativa de los contaminantes, tales como contaminantes del cultivo de producción e impurezas producidas durante el procedimiento, a fin de alcanzar una unión más fuerte del vector de rAAV a intercambiadores aniónicos. Los gradientes por etapas de iodixinol no son fácilmente ampliables a escala hasta los procedimientos a escala comercial descritos en la presente.

Los inventores de la presente solicitud han descubierto que las partículas de vectores de rAAV se pueden aislar de contaminantes, tales como contaminantes del cultivo de producción o contaminantes producidos durante el procedimiento, mediante captura y elución desde resinas de apatito. Así, además de capturar producto de una corriente de alimentación en bruto, la columna de apatito depura una variedad de impurezas relacionadas con el procedimiento, incluyendo proteínas de células hospedadoras y adenovirus, glucanos y proteínas séricas, así como proporciona factores de depuración para el virus cooperador (tal como el virus cooperador Ad5).

Las resinas de apatito son medios cromatográficos que comprenden minerales de fosfato cálcico, incluyendo sin limitación hidroxapatito cerámico (CHT) y fluoroapatito cerámico (CFT). Los medios cromatográficos de apatito también se denominan medios de modo mixto o multimodales debido a que el apatito tiene grupos funcionales que proporcionan más de una química de unión. Sin querer limitarse por una teoría, los medios de apatito proporcionan la oportunidad de unión por afinidad a calcio metálico, unión por enlaces de hidrógeno, repulsión de cargas positivas, atracción de cargas positivas, repulsión de cargas negativas y atracción de cargas negativas a través de un hospedador de diferentes grupos químicos, incluyendo residuos hidroxilo presentes sobre la cadena principal, restos calcio cargados positivamente y restos fosfato cargados negativamente presentes sobre la resina. Cada química de unión se aplica a la unión en modo mixto igual que se hace para la cromatografía en modo simple. Sin embargo, a diferencia de la cromatografía en modo simple, las diversas químicas de unión y elución no son independientes y pueden funcionar de maneras opuestas. Por ejemplo, incrementar la intensidad iónica puede impulsar la unión hidrófoba. (T. Kawasaki, M. Niikura e Y. Kobayashi, *J. Chrom.* 515:125-148 (1990) y P.S. Gagnon, P. Ng, J. Zhen, C. Aberin, y J. He, *BioProcess Int'* 4:50-60 (2006)). Específicamente, el CHT y el CFT son formas macroporosas esféricas de hidroxapatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂ sinterizado a altas temperaturas para convertir el mineral desde una forma cristalina hasta una cerámica. Esto da un medio cromatográfico con una estructura macroporosa que proporciona una gran superficie específica, una resistencia limitada a la transferencia de masa, una gran resistencia mecánica y una resistencia básica. Sinterizar a diferentes temperaturas y tiempos da como resultado diferentes estructuras físicas - tipos I y II - que son químicamente idénticas pero ofrecen diferentes capacidades para diferentes clases de moléculas. El CFT difiere del CHT en que es un material compuesto de fluoroapatito e hidroxapatito preparado al reemplazar químicamente los grupos hidroxilo por grupos flúor para incrementar la estabilidad a condiciones ácidas. Están disponibles comercialmente resinas de CFT y CHT (p. ej., de Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la presencia de polietilenglicol (PEG) en el tampón de carga incrementa drásticamente la capacidad y la reproducibilidad (al reducir la saturación variable de partículas de rAAV en el flujo pasante) de la unión de partículas de vectores de rAAV a resinas de apatito. Sin querer limitarse por una teoría, un atributo de los vectores de rAAV que los distingue de la mayoría de las impurezas relacionadas con el procedimiento es el gran tamaño físico de las partículas. Esta diferencia de tamaño se explotó en las etapas de captura y lavado al incluir polietilenglicol (PEG) en los tampones de captura y lavado cromatográficos para incrementar preferentemente los coeficientes de reparto de moléculas mayores al estado unido basándose en la compartición energéticamente favorable de envueltas de hidratación. Aunque se ha descrito en la especialidad el uso de PEG en la purificación de vectores virales y de bacteriófago, a diferencia de la presente invención, se usaba principalmente como un agente precipitante para agregar físicamente y retirar partículas virales de la solución. Puesto que se sabe en la técnica que el PEG facilita la agregación y la precipitación de partículas virales y se ha descrito en la especialidad que rAAV forma agregados a una intensidad iónica por debajo de 200 mM (Wright y cols., *Molecular Therapy* 12:171-178 (2005)), el efecto del PEG sobre la unión de vectores de rAAV a resinas de apatito era impredecible. Se sabía en la especialidad que el PEG facilitaba la unión de moléculas de inmunoglobulina a resinas de intercambio iónico según se describe, por ejemplo, en Gagnon, *J. Chromatogr.* 743A:51-55 (1996), y para resinas de modo mixto hidrófobas cargadas, según se describe, por ejemplo, en Gagnon y cols., 22nd International IBC Conference on Antibody Production and Development, 4-6 de marzo de 2009.

Los inventores de la presente solicitud han determinado basándose en la experimentación con PEG6000 a lo largo de un intervalo de concentración entre 3-10% (p/v) en la corriente de alimentación que una concentración relativa de aproximadamente 5% (p/v) de PEG6000 era óptima. Un experto normal en la técnica apreciará que se pueden utilizar otras especies y pesos moleculares de PEG incluyendo sin limitación PEG8000, PEG10000 y PEG15000, y que la

concentración relativa de PEG a la concentración final en la solución de vector de rAAV se puede determinar empíricamente de modo que a las concentraciones apropiadas de PEG, las partículas de vector de rAAV en la solución sean impulsadas a unirse a la resina de apatito pero no formen agregados o precipiten físicamente.

- 5 En algunos casos, las partículas de vector de rAAV se aíslan de contaminantes del cultivo de producción mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG y elución de la partícula de rAAV unida desde la resina de apatito en un tampón de fosfato. En realizaciones preferidas, las partículas de vector de rAAV se aíslan de contaminantes del cultivo de producción mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG y elución de la partícula de rAAV unida desde la resina de apatito en un tampón en ausencia de PEG. En algunas realizaciones, partículas de rAAV que comprenden cápsides que son aglutinantes aniónicos débiles se aíslan de contaminantes del cultivo de producción mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG y la partícula de rAAV unida se eluye desde la resina de apatito en un tampón en ausencia de PEG. En realizaciones más preferidas, partículas de rAAV que comprenden cápsides de serotipo 1 (serotipo rAAV-1) se aíslan de contaminantes del cultivo de producción mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG y la cápside de serotipo rAAV-1 que contiene partículas unidas a la resina se eluye en tampón en ausencia de PEG. En algunas realizaciones, las partículas de vectores de rAAV se aíslan de contaminantes del cultivo de producción según un método que comprende cargar una corriente de alimentación en un tampón de carga en ausencia de fosfato pero en presencia de PEG y eluir el rAAV unido desde la resina de apatito en un tampón de elución que comprende fosfato y que carece de PEG.
- 10
- 15
- 20 Aunque la cromatografía en apatito en presencia de PEG representa una estrategia de captura o unión eficaz para la purificación de vectores de rAAV, muchas impurezas producidas durante el procedimiento también eran retenidas por la resina de apatito a pH 7,0. Sin querer limitarse por una teoría, sería más probable que las proteínas presentes en la corriente de alimentación a pH básico (pH mayor de 7,0) tuvieran una carga neta negativa y fueran repelidas por los sitios de unión de fosfato negativos presentes sobre la resina de apatito, reduciendo de ese modo la capacidad de unión por intercambio catiónico global de la resina cromatográfica. Sin embargo, dada la naturaleza de modo mixto de las resinas de apatito, todavía se produce la unión a través de atracción a cargas positivas y afinidad a metales.
- 25

Los tampones de borato se usan habitualmente en la técnica como sistemas tamponadores básicos debido a sus propiedades de fabricación deseables incluyendo sin limitación facilidad de preparación, solubilidad óptima, excelente capacidad tamponadora y bajo coste. Por lo tanto, tampones de borato como el sistema tamponador básico modélico se evaluaron con respecto a la captura de rAAV sobre resinas de apatito. Un experto normal en la especialidad puede apreciar que se podrían evaluar otros tampones básicos para determinar si reducían el nivel de unión de impurezas producidas durante el procedimiento a resinas de apatito en presencia de PEG. Otros tampones básicos se pueden probar y usar con respecto a la captura de rAAV. En algunos casos de la divulgación, el tampón de carga de apatito en ausencia de PEG comprende un tampón de borato. En casos o realizaciones preferidos, el tampón de borato se formula a un pH entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente pH 9,9. En casos o realizaciones preferidos, el tampón de borato se formula a un pH de aproximadamente 9,0. En algunos casos o realizaciones, el tampón de borato está en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 500 mM. En casos o realizaciones más preferidos, el tampón de borato se formula en aproximadamente 20 mM de borato, pH 9,0. En algunos casos o realizaciones, el tampón de borato 20 mM a pH 9,0 reduce específicamente la captura de impurezas de molécula pequeña producidas durante el procedimiento sobre la resina de apatito.

30

35

40

En algunas realizaciones, la corriente de alimentación se carga sobre la resina de apatito en un tampón que contiene fosfato en presencia de PEG mediante mezclado en línea de la corriente de alimentación con un tampón de fosfato que comprende PEG en dos veces la concentración final de PEG. En algunas realizaciones, el pH del tampón de fosfato está entre pH 6,5 y pH 7,0. En algunas realizaciones, el PEG es PEG6000. En algunas realizaciones, la concentración de PEG6000 en el tampón de carga está entre aproximadamente 3% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v). En realizaciones más preferidas, la concentración de PEG6000 en el tampón de carga es aproximadamente 5% (p/v). En algunas realizaciones, la concentración de fosfato en el tampón de carga para la resina de apatito está entre 5 mM y 500 mM

45

50

En algunas realizaciones, la capacidad de unión de la resina de apatito en presencia de PEG se potencia con relación a la capacidad de unión de la resina de apatito en ausencia de PEG. En algunas realizaciones, la capacidad de unión de la resina de apatito para partículas de vector de rAAV en una corriente de alimentación en presencia de PEG se potencia desde aproximadamente medio logaritmo hasta aproximadamente diez logaritmos con relación a la capacidad de unión de la resina de apatito en ausencia de PEG. En realizaciones preferidas, la capacidad de unión de la resina de apatito para partículas de rAAV presentes en una corriente de alimentación en presencia de PEG se potencia ocho logaritmos. En algunas realizaciones, la capacidad de unión de la resina de apatito para partículas de vector de rAAV en una corriente de alimentación en presencia de PEG es de al menos aproximadamente 10^6 partículas de rAAV por ml de resina a aproximadamente 10^{16} partículas por ml de resina (tal como aproximadamente cualquiera de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} partículas por ml de resina). En algunas realizaciones, la capacidad de unión de la resina de apatito en presencia de PEG es aproximadamente 10^{14} partículas por ml de resina.

55

60

Aunque esta sorprendente capacidad de unión de aproximadamente 10^{12} - 10^{14} DRP de rAAV-1 por ml de resina de apatito en presencia de PEG permite la ampliación a escala rentable altamente eficaz de la purificación de rAAV-1 comercial, un experto normal en la especialidad apreciará que la capacidad de unión representa el número máximo

65

de rAAV-1 que se unirá por ml de resina y no pretende limitar operativamente el alcance de la invención. En efecto, los inventores aprecian que los cultivos cosechados de vectores de rAAV-1 que contienen menos de 10^{14} - 10^{16} DRP de rAAV-1/ml se pueden purificar mediante la presente invención.

5 En algunas realizaciones, las partículas de rAAV unidas al medio de apatito se lavan antes de eluir las partículas de rAAV desde la resina. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene concentraciones decrecientes de PEG para retirar las impurezas producidas durante el procedimiento. En algunas realizaciones, el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado que contiene entre aproximadamente 3% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v) de PEG. En algunas realizaciones, el tampón de lavado contiene aproximadamente cualquiera de 10% (p/v), 9,5% (p/v), 9% (p/v), 8,5% (p/v), 8% (p/v), 7,5% (p/v), 7% (p/v), 6,5% (p/v), 6% (p/v), 5,5% (p/v), 5% (p/v), 4,5% (p/v), 4% (p/v), 3,5% (p/v) y 3% (p/v) de PEG. En algunas realizaciones, el medio de apatito se lava con un tampón de lavado que contiene PEG a una concentración mayor que la concentración de PEG usada para permitir la unión de las partículas de rAAV al medio de apatito. En algunas realizaciones, el medio de apatito se lava adicionalmente con una concentración decreciente de PEG. En algunas realizaciones, el tampón de lavado contiene tampones conocidos en la especialidad. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en borato, ácido N-2-hidroxietilpiperacino-N'-2-etanosulfónico (HEPES) y Tris-HCl. En algunas realizaciones, el tampón de lavado está a un pH básico. En algunas realizaciones, el tampón de lavado tiene un pH entre pH 7,0 y pH 10,0, entre pH 7,2 y pH 10,0, entre pH 7,4 y pH 10,0, entre pH 7,6 y pH 10,0, entre pH 7,8 y pH 10,0, pH 8,0 y pH 10,0, pH 8,2 y pH 10,0, entre pH 8,4 y pH 10,0, entre pH 8,6 y pH 10,0, entre pH 8,8 y pH 10,0, entre pH 9,0 y pH 10,0, entre pH 9,2 y pH 10,0, entre pH 9,4 y pH 10,0, entre pH 9,6 y pH 10,0, o entre pH 9,8 y pH 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado tiene un pH en 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2, 8,4, 8,6, 8,8, 9,0, 9,2, 9,4, 9,6, 9,8 o 10,0. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende además entre 100 y 500 mM de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende además entre 50 y 250 mM de NaCl.

25 En algunos casos de la divulgación, los vectores de rAAV aislados de una corriente de alimentación mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG se eluyen en un tampón en concentraciones bajas de PEG. En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, las bajas concentraciones de PEG están entre aproximadamente 2,9% (p/v) y aproximadamente 0,1% (p/v) de PEG. En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, los vectores de rAAV aislados de una corriente de alimentación mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG se eluyen en un tampón en ausencia de PEG. En casos o realizaciones preferidos, los vectores de rAAV aislados de una corriente de alimentación mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG se eluyen en un tampón que contiene fosfato en ausencia de PEG.

35 En algunas realizaciones, los vectores de rAAV aislados de una corriente de alimentación mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG se eluyen en un tampón que contiene fosfato. En algunas realizaciones, los vectores de rAAV aislados de una corriente de alimentación mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG se eluyen en un tampón que contiene fosfato en una concentración entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 500 mM (tal como entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM). En realizaciones preferidas, los vectores de rAAV aislados de una corriente de alimentación mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG se eluyen en un tampón de fosfato 50 mM.

45 Los inventores de la presente solicitud han descubierto que los vectores de rAAV presentes en una corriente de alimentación se pueden aislar mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG. Sin embargo, si virus cooperadores usados en el cultivo de producción (tales como adenovirus) están presentes en la corriente de alimentación aplicada a la resina de apatito, son capturados por la resina de apatito en presencia de PEG. Las partículas de vector de rAAV capturadas por la resina de apatito en presencia de PEG se pueden aislar fácilmente del adenovirus por su perfil de elución en tampones de fosfato. Las partículas de vector de rAAV unidas a la resina de apatito en presencia de PEG se eluyen, en ausencia de PEG, en tampones que contienen tan poco como 0 mM de fosfato; mientras que las partículas adenovirales de virus cooperador son retenidas sobre las resinas de apatito bajo las concentraciones de fosfato usadas para eluir las partículas de vector de rAAV. Experimentalmente, se encontró que los vectores de rAAV se eluyen en un solo pico agudo en tan poco como 50 mM de fosfato en ausencia de PEG, mientras que un virus cooperador tal como adenovirus si está presente se retiene sobre la resina. En estudios de agregación en los que a las corrientes de alimentación de rAAV se agregaban 8^9 partículas resistentes a desoxirribonucleasa (DRPs) de adenovirus infeccioso y se sometían a cromatografía sobre resinas de apatito en presencia de PEG, los vectores de rAAV se capturaban sobre la resina de apatito y se eluían en tampón de fosfato 50 mM en ausencia de PEG, mientras que aproximadamente 4 logaritmos de proteínas adenovirales se retenían sobre la resina de apatito. Según esto, en algunas realizaciones, los vectores de rAAV presentes en una corriente de alimentación se aíslan del virus cooperador contaminante mediante captura sobre una resina de apatito en presencia de PEG y elución en tampones de fosfato en ausencia de PEG. En algunas realizaciones, los tampones de fosfato se formulan en concentraciones que retienen el virus cooperador contaminante unido a la resina de apatito. En algunas realizaciones, de dos a ocho logaritmos de adenovirus son retenidos por ml de resina de apatito. En algunas realizaciones, los vectores de rAAV presentes en una corriente de alimentación se aíslan mediante elución desde una resina de apatito en tampón de fosfato 0-500 mM (tal como 0-400 mM, 0-300 mM, 0-200 mM, 0-100 mM, 0-50 mM) bajo condiciones que retienen el virus cooperador unido a la resina de apatito.

Sistemas de producción conocidos en la técnica para producir vectores de rAAV pueden incluir medios de producción que contienen suero en el intervalo de 0,5%-20% (v/v), o pueden estar desprovistos por completo de suero. Por otra parte, esquemas de purificación descritos en la especialidad pueden incluir una o más etapas de concentración que pueden dar como resultado un incremento de proteínas séricas y otros componentes séricos en la corriente de alimentación aplicada a la resina de apatito. Por ejemplo, el sobrenadante del cultivo de producción que se describe en la presente que estaba formulado con 1% (v/v) de suero se concentró aproximadamente veinte veces en la etapa de TFF, de modo que la corriente de alimentación cargada sobre la resina de apatito contuviera tanto como 20% de contaminantes de proteína sérica en comparación con un concentrado de la corriente de alimentación procedente de un cultivo de producción formulado sin suero. Los inventores de la presente solicitud probaron los métodos de captura en apatito proporcionados en la presente con concentrados de corrientes de alimentación procedentes de cultivos de producción formulados en presencia o ausencia de suero. Se encontró que la presencia de proteínas séricas en la corriente de alimentación no tenía efecto sobre el comportamiento de la etapa cromatográfica en apatito.

15 Inactivación térmica de virus cooperador (destrucción térmica)

Si se usan adenovirus infecciosos como una fuente de virus cooperador en los cultivos de producción para la producción de rAAV, se puede incorporar una etapa de inactivación térmica (destrucción térmica) opcional para inactivar cualesquiera partículas adenovirales residuales que puedan estar presentes en la corriente de alimentación. La etapa de destrucción térmica se beneficia de una de las principales diferencias entre AAV y adenovirus: las partículas de adenovirus se inactivan a temperaturas de aproximadamente 54-56°C, mientras que las partículas virales de AAV y rAAV son estables y no se ven afectadas por esas temperaturas. En la presente divulgación, incluyendo una realización de la presente invención, los inventores han ajustado la etapa de inactivación térmica para ajustarse a una optimización del procedimiento a mayor escala tal como los cultivos de producción a una escala de 250 l realizados en la presente. En particular, el eluido del apatito se inactivó térmicamente en una bolsa de bioprocesamiento de un solo uso estéril de 5 l sobre una plataforma giratoria de temperatura controlada ajustada a 53°C con una velocidad de giro de 40 RPM, con un ángulo de 12° para la mezcla (recipiente calentador de Wave de 20 l). El eluido del apatito se incubó sobre la plataforma hasta que alcanzaba 52°C, y a continuación se mantuvo a esa temperatura durante 10 minutos adicionales. Se añadió MgCl₂ al eluido del apatito en una concentración final de 2 mM para estabilizar el vector de rAAV durante el calentamiento. Un experto normal en la especialidad puede apreciar que la escala, el punto de ajuste final para el calentamiento y el tiempo de calentamiento se pueden probar empíricamente para encontrar condiciones óptimas para inactivar partículas adenovirales mientras se mantiene la infectividad y la integridad de las partículas de rAAV. La etapa de inactivación térmica se puede omitir para la purificación de partículas de rAAV de cultivos de producción que utilizan construcciones plasmídicas para proporcionar una función cooperadora.

35 Cromatografía de interacción hidrófoba

La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es una técnica para separar biomoléculas basándose en diferencias en su hidrofobia superficial. Así, la HIC se considera un método ortogonal a las otras etapas de purificación en el procedimiento de AAV. Los medios cromatográficos de HIC contienen ligandos hidrófobos tales como hidrocarburos de cadena lineal (p. ej., propilo (C3), butilo (C4), hexilo (C6) u octilo (C8)) o compuestos aromáticos (p. ej., fenilo). En agua pura, el efecto hidrófobo es demasiado débil para la interacción funcional entre el ligando y proteínas, o entre las propias proteínas. Sin embargo, las sales liotrópicas potencian las interacciones hidrófobas, y la adición de sal impulsa la captura de proteínas en medios de HIC. Por esta razón, las resinas de HIC se cargan habitualmente bajo altas concentraciones de sal y se eluyen a concentraciones de sal inferiores. Como apreciará un experto normal en la especialidad, el sulfato amónico [(NH₄)₂SO₄] es la sal más comúnmente usada para controlar la captura de proteínas a través de cromatografía HIC, debido a la alta clasificación liotrópica de los iones tanto amonio como sulfato en la serie de Hofmeister, y la alta solubilidad de la sal. En la presente divulgación, partículas de rAAV presentes en una corriente de alimentación se cargaron sobre una resina de HIC mediante la mezcla en línea de una relación 75:25 (volumen:volumen) de tampón de sulfato amónico 2 M + BisTris 50 mM (pH 7,0):corriente de alimentación, respectivamente. La mezcla en línea de la corriente de alimentación con el tampón de carga evita el riesgo de cualquier precipitación de vectores de rAAV por la alta concentración de sulfato amónico presente en el tampón. Como apreciará un experto normal en la especialidad, la concentración de sal (sulfato amónico) se puede manipular para alcanzar la concentración óptima para la unión a rAAV. Según esto, en algunos casos, la concentración de sulfato amónico está entre 1 M y 3 M. En algunos casos preferidos, la concentración de sulfato amónico en el tampón de carga es 2 mM. Como puede apreciar un experto normal en la especialidad, la mezcla en línea del sulfato amónico y la corriente de alimentación se realiza por comodidad y fluidez de la operación de la unidad, pero se podría mezclar fácilmente la corriente de alimentación con la concentración apropiada de tampón de carga por cualquier medio conocido en la especialidad y a continuación cargar la corriente de alimentación + la solución de tampón de carga sobre el medio cromatográfico de HIC.

Los codisolventes también pueden afectar a la interacción hidrófoba. Por ejemplo, el etilen- o el propilenglicol puede reducir la interacción entre la proteína y el ligando inmovilizado y así ser útil para mejorar los perfiles de elución. Según esto, la columna de HIC se lavó con una mezcla 75:25 (v:v) de tampón de sulfato amónico 2 M + BisTris 50 mM (pH 7,0):tampón de BisTris 50 mM (pH 7,0) + 10% de propilenglicol (v:v) (EMD BioSciences), y el rAAV se eluyó en un tampón con bajo contenido de sal más propilenglicol (tampón de sulfato amónico 800 mM + BisTris 50 mM (pH 7,0) +

4% de propilenglicol. Bajo esas condiciones de elución, cualesquiera virus cooperadores y proteínas residuales presentes en la corriente de alimentación cargada sobre la columna permanecerían unidos a la columna. El propilenglicol en este ejemplo se añadió a los tampones para agudizar el perfil de elución, en comparación con el perfil de elución amplio del tampón sin propilenglicol, pero es opcional en el procedimiento.

5 Ejemplos de resinas hidrófobas adecuadas incluyen sin limitación Tosoh Butyl 650M, Tosoh SuperButyl 650C, Tosoh Phenyl 650C y EMD Fractogel Phenyl (Tosoh Bioscience LLC, PA)

10 Un residuo procedente de procedimientos de producción de rAAV requiere una descontaminación rigurosa antes de la eliminación al menos por dos razones: (1) el producto comprende un vector viral; y (2) los cultivos de producción comúnmente usan adenovirus tipo 5 (Ad5) vivo como un virus cooperador para la producción de rAAV. Un residuo líquido procedente de operaciones cromatográficas típicamente se descontamina en primer lugar con lejía en el punto de uso y a continuación se somete a una descontaminación adicional manteniendo a pH alto antes de la neutralización y la eliminación.

15 El sulfato amónico presente en los tampones de HIC reacciona tanto como lejía como con hidróxido sódico para liberar cloro y amoníaco gaseosos nocivos, respectivamente. Por lo tanto, una primera consideración para la optimización de un procedimiento de la etapa de cromatografía HIC era el desarrollo de un sistema tamponador adecuado que se pudiera descontaminar de forma segura mediante métodos conocidos en la especialidad.

20 Como apreciará un experto normal en la especialidad, los tampones con altas concentraciones de sal usados en la cromatografía de interacción hidrófoba se deben cribar con respecto a cuestiones de viscosidad que pueden dar como resultado altas contrapresiones que bien pueden limitar los caudales o bien provocar problemas de mezcladura, incrementando de ese modo el riesgo de precipitación del producto mediante cristalización de sales en los tampones que se producen a temperaturas usadas para el almacenamiento o el funcionamiento. Basándose en los datos de la Tabla 6 posterior y considerando los factores descritos anteriormente, los inventores seleccionaron el citrato sódico 1 M (pH 7,0) como el tampón óptimo para la unión de vectores de rAAV al medio cromatográfico de HIC, aunque se pueden usar tampones de citrato en la cromatografía de interacción hidrófoba a concentraciones de 0,5 M a 2,0 M.

30 Intercambio de tampones mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)
Se conocen en la especialidad numerosos métodos para realizar el intercambio de tampones descrito en la presente, incluyendo TFF y diálisis. El uso de cromatografía de exclusión por tamaño tiene la ventaja adicional de proporcionar una depuración proteínica adicional de proteínas con tamaños que atraviesan los poros de las resinas y ser relativamente rápido en cuanto al tiempo necesario para intercambiar los tampones. El intercambio de tampones se realizó en esta etapa para asegurar que el eluido de HIC de la etapa previa se intercambiaba por un tampón apropiado para rAAV que se une a la etapa de cromatografía de intercambio aniónico final en el procedimiento.

Agente adventicio (depuración viral)

40 Opcionalmente, una etapa adicional para depurar oligocontaminantes, tales como virus adventicios que pueden estar presentes en la corriente de alimentación, se puede incorporar en el procedimiento, dando de ese modo un procedimiento ortogonal comercialmente razonable. Así, en algunos casos o realizaciones, el procedimiento incluye además un filtro de depuración viral. Ejemplos de estos filtros se conocen en la especialidad e incluyen Millipore Viresolve NFR (50 nm), Pall Ultipore VF (50 nm) y Asahi 70 nm.

45 Cromatografía de intercambio aniónico

50 Una etapa de captura con intercambio aniónico para el vector de rAAV sometido a cromatografía en apatito se realizó como una etapa de concentración y refinado final. Medios para cromatografía de intercambio aniónico adecuados son conocidos en la especialidad e incluyen, sin limitación, Unosphere Q (Biorad, Hercules, California) y amino- e iminorresinas cargadas en N tales como, p. ej., POROS 50 PI, o cualquier DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria o resinas basadas en PEI conocidas en la especialidad (Patente de EE. UU. Nº 6.989.264; N. Brument y cols., *Mol. Therapy* 6(5):678-686 (2002); G. Gao y cols., *Hum. Gene Therapy* 11:2079-2091 (2000)). Un experto normal en la especialidad puede apreciar que se pueden identificar tampones de lavado de intensidad iónica adecuada de modo que el rAAV permanezca unido a la resina mientras se separan otras impurezas producidas durante el procedimiento incluyendo sin limitación glucanos que se pueden introducir mediante percolación desde diversos filtros utilizados en las etapas de purificación. En algunas realizaciones, el tampón de lavado es NaCl 60 mM y el vector de rAAV se eluye desde la columna con NaCl 130 mM, de modo que cualesquiera oligoimpurezas producidas durante el procedimiento residuales presentes, tales como albúmina sérica o virus cooperadores, se retengan en la columna.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Cosecha de rAAV-1 de la depuración del medio de cultivo y la digestión con Benzonase®

65 Medio de producción de rAAV-1 gastado (sobrenadante) procedente de un cultivo de producción viral de rAAV-1 de 250 l producido mediante cualquier método conocido en la especialidad que contiene el vector de rAAV-1 se depuró

para retirar cualesquiera células contenidas en el sobrenadante. El sobrenadante se hizo pasar a través de una serie de filtros conectados en serie, que incluyen: (1) a Millipore Millistak+® HC Pod Filter, Grade D0HC (Millipore Corp., Bedford, MA) (4 veces); (2) un Millipore Millistak+® HC Pod Filter, Grade A1HC; y (3) un Opticap® XL10 Millipore Express SHC Hydrophilic Membrane 0,2 µm Filter a una velocidad de 5 litros por minuto (LPM) que se reducía escalonadamente hasta 4 LPM.

Todos los filtros se prelavaron en agua de ósmosis inversa/desionizada ("RO/DI") según las especificaciones del fabricante. El flujo pasante se recogió en una bolsa de bioprocesamiento para la digestión con Benzonase®. Una concentración final de 2 unidades/ml de Benzonase® (número de catálogo de EM Industries 1.01695.0002) se disolvió en el medio de producción de rAAV-1 y se añadió al sobrenadante viral depurado para alcanzar una concentración final de 2,5 unidades/ml. El sobrenadante más Benzonase® se incubó a temperatura ambiente con recirculación constante a 4 LPM para permitir la digestión del ADN. Datos de la digestión con Benzonase® se muestran en la Figura 1, que demuestra que no estaba presente ADN de alto peso molecular después de la digestión con Benzonase®.

15 **Ejemplo 2:** Retirada de contaminantes de producción a través de intercambio aniónico

El sobrenadante depurado y digerido con Benzonase® de rAAV-1 del Ejemplo 1 se hizo pasar sobre una serie de filtros Pall Mustang® Q ("MQ") de 5,1 cm por 55,9 cm (dos pulgadas por veintidós pulgadas) conectados en serie (Pall Corp., número de catálogo NP6MSTGQP1). Antes de la carga del sobrenadante viral de rAAV-1, los filtros se esterilizaron con 15 l de NaOH 0,5 M a 0,5 LPM con un tiempo de espera de 15 minutos, se cargaron al enjuagar con 15 l de TMEG + NaCl 2M (TMEG: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, 2-mercaptoetanol 1 mM, Na₂EDTA 1 mM, 10% (v/v) de glicerol) a una velocidad de 6 LPM, y se equilibraron con 15 l de medio de producción de vectores a 6 LPM. A continuación, el sobrenadante se bombeó a un caudal de aproximadamente 6 LPM a través de una serie de filtros y se recogió en una bolsa de bioprocesamiento. A la intensidad iónica del medio de producción, se demostró que el filtro MQ de intercambio aniónico depuraba virus cooperador y ADN residual, entre otras impurezas, del sobrenadante de rAAV-1 mediante la unión de los contaminantes a la membrana cargada. Sin embargo, a la intensidad iónica del cultivo de producción, el vector de rAAV-1 presente en el sobrenadante fluía a través de la membrana de intercambio aniónico. Durante la optimización del procedimiento, se determinó experimentalmente que usar un solo filtro MQ daba como resultado una saturación de contaminantes en el procedimiento, incluyendo el virus cooperador Ad5. Por consiguiente, un segundo filtro se añadió en serie o en tándem en el procedimiento.

15 **Ejemplo 3:** Concentración de sobrenadante de vector rAAV-1

El sobrenadante de producción completo del vector de rAAV-1 procesado en los Ejemplos 1 y 2 se concentró aproximadamente 20 veces a través de filtración con flujo tangencial ("TFF") desde un volumen inicial de aproximadamente 250 L hasta un volumen de aproximadamente 12,5 L. Cartuchos filtrantes de polietersulfona de flujo tangencial con un corte de peso molecular de 100 kD, tamiz C y una superficie específica total de 5 m² (Millipore Pellicon® 2 Biomax, N° Catálogo P2B 100C05) se barrieron con 50 L de agua RO/DI, se esterilizaron con 15 L de NaOH 0,5 M con un tiempo de espera de 15 minutos, se barrieron de nuevo con 100 L de WFI (agua purificada WFI HyPure™; HyClone, Logan, UT), se barrieron con 15 L de TMEG + NaCl 2 M y finalmente se equilibraron con 15 L de medio de producción de rAAV-1. El sobrenadante se hizo pasar a través del cartucho de TFF a un caudal de aproximadamente 3 LPM con una velocidad de recirculación de 16 LPM. El material de TFF retenido sobre el filtro ("retenido") se concentró hasta aproximadamente 10,5 L y se transfirió a un depósito. El filtro se barrió con aproximadamente 2 L de medio de producción. El lavado y el concentrado se reunieron a continuación para dar un volumen final de aproximadamente 12,5 L.

La concentración de rAAV-1 hasta un volumen de 12,5 L mediante TFF también concentraba los restantes contaminantes de producción de rAAV-1 en la solución en aproximadamente 20 veces. Así, se introdujo una etapa de fabricación de espera después de la etapa de TFF, durante la cual el concentrado de TFF se filtraba a través de una membrana filtrante de 0,22 µm Opticap de 10,2 cm (4 pulgadas) (Millipore Opticap® N° Catálogo KVSC04HB3). Esta etapa de filtración suplementaria permite que el concentrado de TFF que contiene rAAV-1 avance hasta la siguiente etapa del procedimiento sin requerir diafiltración e intercambio de tampones. El material después de la TFF se puede almacenar a 2-8°C durante cualquier período de tiempo, incluyendo desde tan poco como 24 horas hasta tanto como 3 meses o más, antes del procesamiento adicional sin pérdida en la estabilidad según se mide por el rendimiento de vector o la infectividad valorados mediante ensayos conocidos en la especialidad. Alternativamente, la TFF realizada como se describe en la presente se podía usar en cualquier etapa del procedimiento de purificación para concentrar o someter a intercambio de tampones el vector de rAAV-1.

15 **Ejemplo 4:** Cribado de resinas con respecto al vector de rAAV-1 frente a la unión a impurezas del procedimiento

Procedimientos comerciales aprobados por la FDA para la purificación de proteínas y otros productos biológicos se basan en procedimientos ortogonales de incorporación a escala comercial. Los procedimientos ortogonales son procedimientos que tienen más de una etapa o procedimiento para la retirada de impurezas producidas durante el procedimiento, incluyendo etapas tanto de captura como de flujo pasante para el producto final tal como, por ejemplo, un vector de rAAV-1. Se ha demostrado en la especialidad que los vectores de rAAV (específicamente rAAV-2) se unen a resinas aniónicas. Se ha demostrado que vectores de rAAV tales como rAAV-1, -5 y -8 se unen mucho menos fuertemente que rAAV-2 a intercambiadores aniónicos en presencia de componentes de producción tales como

albúmina sérica, componentes de virus cooperadores, componentes del medio de producción y ADN de células hospedadoras, dando como resultado un esquema de purificación menos eficaz y de menor calidad.

5 Estrategias de purificación previas descritas en la especialidad para aglutinantes aniónicos de afinidad inferior tales como rAAV-1 incluyen un gradiente por etapas de iodixinol que reduce la concentración relativa de los componentes de producción a fin de alcanzar una unión más fuerte del vector de rAAV a intercambiadores aniónicos. Los gradientes por etapas de iodixinol no son fácilmente ampliables a escala hasta procedimientos a escala comercial tales como los descritos en la presente. Por lo tanto, a fin de optimizar la purificación del vector de rAAV con respecto a aglutinantes aniónicos de baja afinidad tales como rAAV-1 sin la necesidad de realizar ultracentrifugación y gradientes por etapas, se cribó un número de resinas con respecto a su capacidad para unirse a vectores de rAAV o excluir los vectores de rAAV en el flujo pasante en comparación con la capacidad para unirse a o dejar fluir a su través impurezas del procedimiento observadas comúnmente incluyendo ADN de células hospedadoras, virus cooperadores, albúmina sérica, proteínas séricas (si se incluye suero en el medio de producción), y otras proteínas de bajo peso molecular encontradas en los cultivos de producción a fin de desarrollar un procedimiento de purificación de rAAV comercialmente ampliable a escala, ortogonal y eficaz.

15 El cribado de resinas se realizó usando una columna de 1 ml (altura del lecho 5 cm) con caudales lineales recomendados por el vendedor para cada resina a capacidades sobrecargadas intensamente con relación a las recomendaciones del fabricante. Se recogieron rastreos espectrofotométricos de absorbancia ultravioleta a 280 nanómetros (A_{280}) con respecto a la unión a y la elución de cada resina. Los picos se analizaron mediante el ensayo apropiado tanto para el vector de rAAV-1 como para impurezas del procedimiento representativas. Los datos presentados en la Figura 2 representan un rastreo espectrofotométrico típico para una resina típica de la lista. La Tabla 2 lista algunas de las resinas rastreadas así como las afinidades de unión relativas de la resina para el vector de rAAV-1 y diversas impurezas del procedimiento.

25

Tabla 2: Cribado de resinas con respecto a la unión de rAAV-1 en comparación con la unión de contaminantes del procedimiento

Resina	Tipo de Resina	rAAV-1	Virus cooperador	ADN de Células Hospedadoras	Albúmina Sérica	Proteínas séricas
UnoS pH 5,5	Intercambio Catiónico	+	0	-	+	+
UnoS pH 7,0	Intercambio Catiónico	-	-	-	-	-
UnoQ pH 8,5	Intercambio Aniónico	+	++	++++	++	++
UnoQ pH 7,0	Intercambio Aniónico	+	+++	++++	++	++
Fractogel EMD SO ₃	Intercambio Catiónico	+	++	-	0	0
CHT	Apatito	+	0	++	+	+
CFT	Apatito	+	0	++	+	+
HIC Phenyl	Intercambio Hidrófobo	-	-	-	0	0
HIC Butyl	Intercambio Hidrófobo	+	++	-	0	0
HIC Hexyl	Intercambio Hidrófobo	+	++	-	0	0
HIC PPG	Intercambio Hidrófobo	-	-	-	0	0
Source S	Intercambio Iónico	+	0	0	++	0
Source Q	Intercambio Iónico	+	0	0	++	0
TMAE	Intercambio Iónico	+	0	0	++	0

Resina	Tipo de Resina	rAAV-1	Virus cooperador	ADN de Células Hospedadoras	Albúmina Sérica	Proteínas séricas
IMAC FeCl ₃		0	0	-	+	+
Superdex 200	Filtración en Gel	hueco	hueco	recorrido	recorrido	recorrido
HW55	Filtración en Gel	hueco	hueco	recorrido	recorrido	recorrido
HW65	Filtración en Gel	hueco	hueco	recorrido	recorrido	recorrido
HW75	Filtración en Gel	hueco	hueco	recorrido	recorrido	recorrido

Clave: (-) = presente en el flujo pasante (sin unión); + = débilmente unido (eluido muy pronto en el gradiente); ++ a ++++ = unión más fuerte (eluida más adelante en el gradiente).

Ejemplo 5: Desarrollo de cromatografía en apatito en presencia de polietilenglicol ("PEG") para la captura de rAAV-1

5 Basándose en los resultados del cribado de resinas realizado en el Ejemplo 4, una resina de apatito o una resina de apatito cerámico se eligió como una de las resinas de captura para rAAV-1. Se realizaron experimentos iniciales usando resinas de CFT II, pero para la última purificación la resina se cambió por CHT I, según se analiza con detalle posteriormente. Los datos indicaban que ambas resinas cromatográficas se comportaban equivalentemente. Los experimentos se realizaron para incrementar adicionalmente la capacidad de unión a rAAV-1 de la resina de apatito y mejorar la capacidad de la resina para discriminar entre partículas de rAAV-1 y otras impurezas producidas durante el procedimiento. Se desarrollaron además dos mejoras clave para la función de las resinas de apatito según se describe en la presente: 1) la adición de PEG; y 2) el desarrollo de las condiciones del tampón de carga.

15 Basándose en la saturación variable de la columna de apatito debido a cuestiones de capacidad en los tamaños de columna comercialmente razonables, se mezcló PEG con el concentrado de TFF (véase el Ejemplo 3 anterior) antes de la carga sobre la resina de apatito a fin de incrementar la unión del vector de rAAV-1 con relación a otras impurezas producidas durante el procedimiento tales como albúmina sérica, virus cooperador y otras impurezas proteínicas que desplazan al vector de rAAV-1 con respecto a la unión a la columna en el Ejemplo 4.

20 La cromatografía en apatito en presencia de PEG representa una estrategia de captura o unión eficaz para la purificación de vectores de rAAV-1, aunque muchas impurezas producidas durante el procedimiento también eran retenidas por la resina de apatito a pH 7,0.

25 Se realizaron experimentos para determinar si modificar las condiciones de tamponación podía mejorar la resolución de rAAV-1 de otras impurezas producidas durante el procedimiento. Se realizaron experimentos a pequeña escala usando un AKTAexplorer FPLC System (GE Healthcare, Piscataway, NJ) equipado con 5 columnas Tricorn de 1,2 ml (GE Healthcare) rellenas a una altura del lecho de 6 cm con resina de CFT, con circulación a un caudal de 150 cm/h. Esas columnas se evaluaron con respecto a la captura del vector de rAAV-1 frente a la unión de albúmina sérica bovina ("BSA"), una impureza producida durante el procedimiento, de molécula pequeña, modélica, en diversos sistemas tamponadores en presencia o ausencia de 5% de PEG6000.

30 Se inyectó rAAV-1 o BSA en pequeños volúmenes (<5% del volumen total) en la columna de CFT en el sistema tamponador que se va a ensayar, bien en presencia o bien en ausencia de 5% (p/v) de PEG6000. Se usaron pequeños volúmenes a fin de obviar la necesidad de intercambio de tampones entre las muestras. Los productos se eluyeron junto con un gradiente de PO₄ 500 mM. Se usó ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico ("MES") 50 mM para tamponar el sistema a pH=6,50, y se usó borato 20 mM para tamponar el sistema a pH 9,0.

35 Los datos presentados en la Tabla 3 demuestran que la unión de vector de rAAV-1 a la resina de apatito era esencialmente la misma a pH 6,5 o pH 9,0 en presencia de 5% (p/v) de PEG6000, mientras que la unión de BSA, la impureza producida durante el procedimiento, de molécula pequeña, modélica, se reducía drásticamente a pH 9,0 en presencia o ausencia de 5% (p/v) de PEG6000, según se indica por los rastreos espectrofotométricos (datos no mostrados). Un análisis adicional de la capacidad reducida de BSA para unirse a la columna de apatito en condiciones de carga de tampón básico (es decir, pH=9,0) mediante un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas ("ELISA") demostraba que la mayoría de la BSA (~78%) estaba presente en el flujo pasante a condiciones tamponadoras de pH 9,0, mientras que se podían alcanzar niveles adicionales de depuración o reducción en la unión a BSA durante etapas de lavado posteriores (-19%), dejando sólo ~0,1% de la BSA cargada en la columna realmente unida a la resina de apatito y coeluyendo con el vector de rAAV-1. Las partículas de rAAV-1 eran estables a pH=9,0, según se indicaba por la falta de pérdida de infectividad o la disminución en el número de partículas resistentes a desoxirribonucleasa ("DRP") eluidas.

50

Tabla 3: Fuerza relativa de la unión de rAAV-1 y BSA a resina de apatito a pH=6,5 o pH=9,0, con o sin 5% (p/v) de PEG6000

Condiciones de unión	BSA	rAAV-1
pH=6,50	++	+
pH=6,50 + 5% (p/v) de PEG6000	++	++++
pH=9,0	+	+
pH=9,00 + 5% (p/v) de PEG 6000	+	++++

Clave: + = unión débil; ++ = unión media; ++++ = unión fuerte.

5

Ejemplo 6: Efecto del suero en el cultivo de cosecha de rAAV-1 sobre la captura de rAAV-1 a través de cromatografía en apatito en presencia de PEG

10

Los cultivos de producción de rAAV-1 o las corrientes de alimentación que contienen rAAV-1 que se van a purificar mediante los métodos descritos en la presente pueden contener suero y proteínas séricas si los cultivos de producción se sembraban en medio que contiene suero. Aunque se ha descrito la producción de vectores rAAV-1 que usa concentraciones muy bajas de suero (es decir, 1% o menos) (véase, p. ej., la Pat. EE. UU. N° 6.995.006), la concentración del cultivo de producción o la corriente de alimentación según se describe en el Ejemplo 3 puede producir una corriente de alimentación que contiene efectivamente 20% de suero y proteínas séricas como resultado de la concentración de 20 veces de la cosecha del cultivo de producción. A fin de evaluar el efecto de componentes séricos sobre el comportamiento de la cromatografía en apatito, se efectuaron experimentos sobre cultivos de producción producidos en presencia o ausencia de suero, en presencia o ausencia de PEG6000.

15

20

Se usaron dos cultivos de producción de rAAV-1 modélicos para valorar la capacidad de la resina de apatito (CFT tipo I) mediante análisis de saturación tradicional en un total de cuatro experimentos de carga en columna. En un experimento, los cultivos de producción contenían suero; y, en el segundo experimento, el cultivo de producción no contenía suero. Ambas corrientes de alimentación se probaron en presencia de 5% (p/v) de PEG6000 o en ausencia de PEG. Las corrientes de alimentación eran representativas del procedimiento de cosecha, y eran sobrenadantes de cultivo depurados que se habían hecho pasar sobre un filtro de intercambio aniónico y se habían concentrado 20 veces mediante filtración con flujo tangencial según se describe en la presente. Columnas de CFT tipo I se cargaron mediante la mezcla en línea 1:1 de la corriente de alimentación con un tampón de borato a pH=9,0. El tampón contenía bien 0% o bien 10% (p/v) de PEG6000 (para alcanzar una concentración final de 5% (p/v) de PEG6000). A medida que se cargaban las columnas, el flujo pasante se recogió en una serie de fracciones que se analizaron con respecto al producto mediante DRP-PCR. La capacidad funcional se definió como el punto en el que la concentración de producto en el flujo de salida de la columna alcanzaba justo 1% de la concentración que entraba en la columna, después de tener en cuenta la dilución en línea. Para cargas de columna que contenían PEG, el resto del procedimiento cromatográfico se realizó a continuación para valorar la recuperación de vector en las fracciones eluidas.

25

30

35

Los datos presentados en la Figura 3 demuestran que la adición de PEG6000 incrementa la capacidad de la resina de apatito con respecto a la unión al vector de rAAV-1 independientemente de si estaba presente suero en el cultivo de producción. Sin querer limitarse por una teoría, el sobrenadante posterior a TFF en presencia de PEG se une preferentemente rAAV-1 a la resina de apatito sobre otras impurezas producidas durante el procedimiento a través de una interacción aniónica con los restos fosfato que puede ser desplazada por la presencia de fosfato en el tampón de elución. Además, la unión de rAAV-1 a la resina de apatito se discrimina adicionalmente de impurezas producidas durante el procedimiento a través de la interacción con metales que puede ser desplazada por la presencia de sal. La unión de rAAV-1 a los restos fosfato no es impulsada principalmente por la hidrofobia, ya que los tampones de captura y elución están formulados para ser principalmente de naturaleza iónica (es decir, el tampón de elución contiene fosfato 50 mM, en comparación con tampones de elución que contienen fosfato 150 mM o superior usados comúnmente para eluir composiciones unidas por interacciones principalmente hidrófobas). Bajo estas condiciones de elución de alto contenido de sal y bajo contenido de fosfato, el virus cooperador, el ADN de células hospedadoras y otras proteínas de bajo peso molecular residuales contenidos en el sobrenadante de los cultivos de producción, si estuvieran presentes, serían retenidos sobre la resina. Sorprendentemente, los datos demuestran que en presencia de PEG6000, los vectores de rAAV-1 producidos en medios bien libres de suero o bien que contienen suero demuestran una capacidad de unión para las resinas de apatito de al menos $1,2 \times 10^{12}$ DRP/ml (una carga de 1 ml) a más de $1,5 \times 10^{14}$ DRP/ml de resina (150 ml). En ausencia de 5% (p/v) de PEG6000, la capacidad de unión de la resina de apatito para la cosecha por TFF era menos de $2,4 \times 10^{12}$ DRP/ml para vectores producidos medios que contienen suero y $7,2 \times 10^{12}$ DRP/ml para vectores producidos en medios libres de suero, ya que no se recuperaba vector de rAAV-1 en el eluido de CFT.

50

55

Ejemplo 7: Purificación de rAAV-1 a través de cromatografía en apatito

La columna de CHT tipo I se rellenó con NaCl 2 M y se esterilizó con NaOH 1 M. Antes de la carga, la columna se equilibró con 6 volúmenes de columna ("VC") de borato 20 mM (pH = 9) + 5% (p/v) de PEG6000. El concentrado de la corriente de alimentación de TFF se cargó a través de un BioProcess Skid de 3 mm (GE Healthcare) sobre una columna de CHT de 923 ml (14 cm de diámetro x 6 cm de altura del lecho) preparada como se describe previamente a un caudal de 96 cm/h. El concentrado de la corriente de alimentación de TFF se mezcló con un volumen igual de un tampón de borato 40 mM (pH = 9) + 10% (p/v) de PEG6000 para dar una concentración final de 20 mM de borato (pH = 9) + 5% (p/v) de PEG6000.

Se realizó una serie de 4 lavados secuenciales para retirar impurezas producidas durante el procedimiento mientras se retenía el vector de rAAV-1 sobre la columna. El lavado 1 ("el recorrido") se realizó mediante la mezcladura en línea de 5 VC de un borato 20 mM (pH = 9,0) + 5% (p/v) de PEG6000:borato 40 mM (pH = 9,0) + 10% (p/v) de PEG6000 50:50 (volumen:volumen) para seguir todos los conductos de carga con PEG6000. Además, se encontró que esta etapa incrementaba preferentemente la afinidad de unión de los vectores de rAAV-1. El lavado 2 se realizó con 15 VC de fosfato potásico 150 mM + borato 20 mM (pH = 9) + 5% (p/v) de PEG6000 para retirar la mayoría de la albúmina sérica y otras impurezas producidas durante el procedimiento proteínicas de bajo peso molecular mientras se retenía rAAV-1 en la columna. El lavado 3 ("WII" en la Figura 5) se realizó con 15 VC de borato 20 mM (pH = 9) + 5% (p/v) de PEG6000 para retirar cualquier fosfato residual de modo que el rAAV-1 permaneciera unido a la columna una vez que se retiraba el PEG6000. El lavado 4 ("WIII" en la Figura 5) se realizó con 5 VC de tampón de HEPES 20 mM (pH = 7,0) + NaCl 150 mM para retirar el PEG6000 y para ajustar la concentración de sal, permitiendo de ese modo la discriminación entre rAAV-1 y cualquier virus cooperador residual u otras impurezas producidas durante el procedimiento, tales como contaminantes proteínicos, que pueden permanecer unidos a la columna.

El vector de rAAV-1 se eluyó de la columna mediante 6 VC de un tampón de fosfato potásico 50 mM + HEPES 20 mM (pH = 7,0) + NaCl 150 mM. La Figura 4 muestra un rastreo espectrofotométrico típico de absorbancia UV a 280 nm (A₂₈₀) y conductividad para el procedimiento cromatográfico en CHT I. La Figura 5 muestra la pureza relativa de vectores de rAAV eluidos de la resina de apatito.

Depuración de glucanos mediante cromatografía en apatito

Los glucanos son carbohidratos similares a celulosa que se filtran en el procedimiento desde el filtro de profundidad a base de celulosa usado para recolectar partículas de rAAV-1 desde cultivos de producción. Los glucanos en concentraciones por encima de ~1 ng/mL pueden interferir con pruebas de lisados de amebocitos de *Limulus* estándar ("LAL") con respecto a la contaminación con endotoxinas bacterianas. Según se demuestra en la Tabla 4 posteriormente, la columna de apatito CHT tipo I se depuraba ~2,5 logaritmos de glucanos procedentes del cultivo de producción. Bajo las condiciones tamponadoras descritas en la presente, la gran mayoría de los glucanos estaba presente en el flujo pasante y no se unía a la columna.

Tabla 4: Depuración de glucanos en el procedimiento

Etapa de procesamiento	Concentración de glucanos (ng/ml)	Cantidad total por lote (ng) (escala de 250 L)
Depuración	10,4	2.600.000
TFF	136	1.541.016
Elución de CHT	1,9	4.769
Después de HIC y SEC	0,2	662
Eluido Final del Intercambio Aniónico	0,1	71

Las muestras se ensayaron con respecto al glucano usando un ensayo cromogénico cinético basado en LAL específico para glucanos (GlucateLL®, Cape Cod, MA).

Depuración de virus cooperador Ad5 mediante cromatografía en apatito

Para confirmar que la cromatografía en CHT depuraba Ad5 de la corriente de alimentación, se realizó un estudio de agregación preliminar usando una corriente de alimentación procedente del procedimiento aguas arriba final. Los niveles de agregación de Ad5 se establecieron basándose en datos obtenidos del estudio de depuración viral en fase I con resinas de CFT II, y se usaron tres relaciones de carga diferentes de la corriente de alimentación: 6,6 ml; 13,5 ml y 33 ml de corriente de alimentación posterior a TFF por ml de resina de CHT.

Los datos presentados en la Tabla 5, depuración de Ad5 mediante CHT, eran comparables con la depuración de 4 LRV, demostraban aproximadamente 4 logaritmos de depuración viral de Ad5 y parecían ser independientes del volumen de corriente de alimentación cargada, dentro del intervalo de 5 veces valorado. La baja recuperación de Ad5

está de acuerdo con datos previos que indican que bajo las condiciones tamponadoras utilizadas, el Ad5 se une más fuertemente que rAAV-1 a la resina de apatito.

Tabla 5: Unidades infecciosas totales de Ad5 en fracciones de la columna de CHT

Fracción de relación de carga	6,6 ml	13,5 ml	33 ml
Carga	$9,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$
Flujo pasante + recorrido	$<2,5 \times 10^5$	$<3,6 \times 10^5$	$<6,9 \times 10^5$
Lavado con PO ₄	$2,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$<2,6 \times 10^6$
Lavados II y III	$3,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
Elución	$<6,9 \times 10^4$	$<6,9 \times 10^4$	$<3,5 \times 10^5$
Valor de reducción logarítmico (LRV)	$>4,1$	$>4,3$	$>3,4$

Un total de 8×10^9 partículas infecciosas de Ad5 (es decir, partículas totales con una P:I de ~10) se agregó a diferentes volúmenes de corriente de alimentación posterior a TFF para circular por la columna de CHT de 1,2 ml. La circulación en las columnas era de 100 cm/h y se recogieron fracciones para ensayar el vector mediante DRP y Ad5 mediante un ensayo de valoración de la infección. Se usó una versión controlada por agregación del ensayo de infectividad de Ad5 puesto que se sabe que altas concentraciones de las muestras tanto de carga como de elución de CHT interfieren en el ensayo basado en células. La depuración de Ad5 se determinó como el valor de reducción logarítmico ("LRV"), calculado como el logaritmo de la cantidad total de Ad5 cargada dividida por la cantidad total de Ad5 recuperada en la fracción de elución (valor de reducción logarítmico).

Ejemplo 8: Inactivación térmica de virus cooperador residual

Se realizó una etapa de inactivación a fin de inactivar y retirar cualquier virus cooperador residual presente en el eluido de CHT I. Para experimentos a menor escala, el eluido de CHT I se dividió entre dos botellas de PETG de 1 l (Nalgene®) y se añadió MgCl₂ hasta una concentración final de 2 mM a fin de incrementar la estabilidad del receptor de rAAV-1. Las botellas se incubaron en un baño de agua a 53,5°C con mezcladura hasta que la temperatura en la botella alcanzaba aproximadamente 52°C. A continuación, las botellas se enfriaron mediante transferencia a un baño de agua a temperatura ambiente y se mezclaron hasta que la temperatura de la botella fuera no mayor de 5°C por encima de la temperatura ambiente. La mezcla destruida térmicamente se filtró a través de una membrana filtrante de 0,22 µM Opticap® de 10,2 cm (4 pulgadas) (Millipore Opticap® número de catálogo KVSC04HB3). Alternativamente, para experimentos a mayor escala, el eluido de CHT I se inactivó térmicamente en una bolsa de bioprocesamiento estéril de un solo uso (bolsa Custom Hyclone 5 l, película CX5-14) sobre una plataforma giratoria de temperatura controlada con un punto de ajuste de temperatura de 53°C a una velocidad de giro de 40 RPM y un ángulo de mezcladura de 12° (recipiente calentador de Wave de 20 l). El eluido de CHT I se incubó sobre la plataforma hasta que la temperatura alcanzaba 52°C y a continuación se mantuvo durante 10 minutos adicionales. Para estabilizar el rAAV-1 durante el calentamiento, se añadió MgCl₂ hasta una concentración final de 2 mM. Después de la prueba, el producto se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente para minimizar posibles efectos de la temperatura sobre la columna de interacción hidrófoba posterior.

Ejemplo 9: Captura de rAAV-1 a través de cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC")

La HIC es una técnica para separar biomoléculas basada en diferencias en su hidrofobia superficial. Como tal, la HIC se considera un método ortogonal a las otras etapas de purificación en el procedimiento de rAAV-1. Los medios de HIC contienen ligandos hidrófobos tales como hidrocarburos de cadena lineal (p. ej., propilo (C3), butilo (C4), hexilo (C6) u octilo (C8)) o hidrocarburos aromáticos (p. ej., fenilo). En agua pura, el efecto hidrófobo es demasiado débil para la interacción funcional entre el ligando y proteínas, o entre las propias proteínas. Sin embargo, las sales liotrópicas potencian las interacciones hidrófobas, y añadir estas sales impulsa la adsorción de proteínas a medios de HIC. Por esta razón, las resinas de HIC se cargan habitualmente bajo altas concentraciones de sal y se eluyen a concentraciones de sal inferiores.

Cromatografía HIC con tampones de sulfato amónico

Resumiendo, una columna butílica de HIC de 170 ml (6 cm de diámetro × 6 cm de altura del lecho) (Toyopearl® Butyl 650M; Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA; Número de catálogo 14702) se esterilizó con varios volúmenes de columna de NaOH 0,5 M y se equilibró con una mezcla 75:25 (volumen:volumen) de sulfato amónico 2 M + Bis Tris 50 mM (pH = 7,0):Bis Tris 50 mM (pH = 7,0). El eluido de apatito de vectores de rAAV-1 destruidos térmicamente se cargó a una velocidad de 3,3 l/h con mezcladura en línea en una relación 75:25 (volumen:volumen) de sulfato amónico 2 M + Bis Tris 50 mM (pH = 7,0):eluido del apatito de rAAV-1. La mezcladura en línea evita el riesgo de cualquier precipitación del vector de rAAV-1 por el sulfato amónico presente en el tampón. La columna se lavó con uno o más volúmenes de columna de una mezcla 75:25 (volumen:volumen) de un tampón de sulfato amónico 2 M + Bis Tris 50 mM pH = 7,0:tampón de Bis Tris 50 mM pH = 7,0 + 10% de propilenglicol (volumen:volumen) (EMD Biosciences). En este ejemplo, el propilenglicol se añadió a los tampones para agudizar el perfil de elución, en comparación con el perfil de elución amplio del tampón sin propilenglicol, aunque es opcional en el procedimiento. El vector de rAAV-1 se eluyó

de la columna con tampón de sulfato amónico 800 mM + Bis Tris 50 mM (pH = 7,0) + 4% de propilenglicol. A las condiciones de elución utilizadas, cualesquiera virus cooperador y proteínas residuales presentes en la carga permanecería unidos a la columna.

5 El residuo procedente de procedimientos de producción de rAAV-1 requiere una descontaminación rigurosa antes de la eliminación, debido a que tanto el producto que es un vector viral como el uso de adenovirus tipo 5 (Ad5) vivo como un virus cooperador para la producción. El residuo líquido procedente de operaciones cromatográficas típicamente se descontamina en primer lugar con lejía en el punto de uso y a continuación se descontamina adicionalmente al mantener a pH alto antes de la neutralización y la eliminación. El sulfato amónico presente en los tampones de HIC reacciona tanto con lejía como con hidróxido sódico para liberar cloro y amoníaco gaseosos nocivos, respectivamente. Por lo tanto, una consideración primaria para la optimización del procedimiento de la etapa cromatográfica de HIC era el desarrollo de un sistema tamponador adecuado que se podría descontaminar con seguridad mediante métodos conocidos en la especialidad.

15 Cribado con respecto a tampones adecuados para la unión de rAAV-1 a la columna de HIC

Vector de rAAV-1 se cargó en columnas en una variedad de diferentes condiciones tamponadoras y la eficacia de unión relativa se determinó al medir la cantidad de vector de rAAV-1 presente en la fracción de flujo pasante (Tabla 6). Los tampones evaluados incluían tanto sales liotrópicas a alta concentración utilizadas tradicionalmente con procedimientos cromatográficos de HIC como varios tampones de pH bajo en los que se produciría potencialmente una interacción en modo mixto (HIC/intercambio catiónico). Las resinas tanto Tosoh Butyl 650M como EMD Phenyl se unían al vector en varios de los tampones alternativos.

Los tampones con altas concentraciones salinas usados en la cromatografía de interacción hidrófoba se deben cribar adicionalmente con respecto a cuestiones de viscosidad que pueden dar como resultado altas contrapresiones que bien pueden limitar los caudales o bien provocar problemas de mezcladura y el riesgo de precipitación del producto debido a la cristalización durante el almacenamiento o las temperaturas de trabajo de los tampones. Basándose en los datos de la Tabla 6 posterior, y después de considerar los factores descritos anteriormente, se eligió citrato sódico 1 M, pH = 7,0 como el tampón óptimo para la unión de vectores de rAAV-1 al medio cromatográfico de HIC.

Tabla 6: Cribado con respecto a la unión de AAV1 en tampones alternativos

Sistema Tamponador Probado	Butyl 650M (% en flujo pasante)	EMD-Phenyl (% en flujo pasante)
Sulfato Sódico 1,1 M (pH = 7)	0%	0%
Citrato Sódico 1 M (pH = 7)	0%	0%
Fosfato Potásico 1,3 M (pH = 7)	3%	3%
NaCl 2,9 M, Citrato Sódico 50 mM (pH = 4)	0%	28%
Glicina 1 M, Citrato Sódico 50 mM (pH = 4)	4%	1%
Fosfato Potásico 50 mM (pH = 4,5)	3%	NT
Citrato Sódico 50 mM (pH 4)	4%	NT
NaCl 2,9 M, Fosfato Potásico 50 mM (pH 4,5)	17%	NT

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente en columnas Tricorn 5/50 (6 cm de altura del lecho, volumen de la columna 1,2 ml) usando vector de rAAV-1 purificado. Las columnas se equilibraron con los tampones listados y se cargaron a la columna $\sim 2 \times 10^{11}$ DRP o rAAV-1. El rAAV-1 se eluyó a lo largo de un gradiente lineal de 20 VC desde Bis Tris 145 mM (pH = 7,0), 10% (v/v) de propilenglicol. El flujo pasante se recogió y se ensayó mediante análisis de DRP con respecto a la fracción de rAAV-1 aplicada a la columna que fluía a su través o no se unía.

Se realizó una caracterización adicional sobre la depuración de impurezas producidas durante el procedimiento en la columna de HIC en los diversos tampones demostrando buena unión de rAAV-1 en el experimento previo. Los datos de la Tabla 7 posterior para la unión de contaminantes modélicos demuestran que tanto el adenovirus como el ADN si están presentes en la corriente de alimentación se discriminan eficazmente mediante la etapa cromatográfica de HIC.

Tabla 7: Unión relativa de rAAV-1 frente a impurezas producidas durante el procedimiento modélicas en diferentes tampones de HIC

Sistema Tamponador	rAAV-1	Ad5	DNA
tampón de sulfato sódico 0,1 M + bis tris, pH = 7,0	+	++	-
tampón de sulfato sódico 0,8 M, bis tris, pH = 7,0	+	++	0
citrato sódico 1 M, pH = 7,0	+	++	0
NaCl 2,9 M (citrato sódico 50 mM hasta tampón a pH = 4,0)	-	-	0

Clave: "0" = sin material de unión presente en el flujo pasante; "-" = aglutinante muy débil; "+" = aglutinante fuerte; "++" = aglutinantes más fuerte.

5 Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente en columnas Tricorn 5/50 (altura del lecho 6 cm, volumen de la columna 1,2 ml). Las columna se equilibraron con los tampones listados y las muestras indicadas se cargaron a la columna. Cada muestra se eluyó a lo largo de un gradiente lineal de 20 VC. Las muestras se recogieron y se ensayaron con respecto al material de carga pertinente.

10 Cromatografía HIC con tampones de citrato sódico

El eluido de apatito de vector rAAV-1 destruido térmicamente se cargó posteriormente a una columna butílica de HIC a fin de reducir adicionalmente cualesquiera impurezas del procedimiento residuales y como una etapa de concentración y desalado. Una columna butílica de HIC de 373 ml (6 cm de diámetro × 8,9 cm de altura del lecho) (Tosoh Biosciences Toyopearl® Butyl 650M número de catálogo 14702) se esterilizó con varios volúmenes de columna de NaOH 0,5 M y se equilibró con 5 VC de una mezcla 75:25 (volumen:volumen) de citrato 1 M + fosfato sódico 20 mM:fosfato sódico 20 mM. El eluido de CHT I de vector de rAAV-1 destruido térmicamente se cargó a una velocidad de 106 cm/h con mezcladura en línea en una relación de 75:25 (volumen:volumen) de citrato 1 M + fosfato sódico 20 mM:eluido de CHT I. La mezcladura en línea evita el riesgo de cualquier precipitación del vector de rAAV-1. La columna se lavó con 5 VC de una mezcla 75:25 (volumen:volumen) de tampón de citrato 1 M + fosfato sódico 20 mM:fosfato sódico 20 mM. El vector de rAAV-1 se eluyó de la columna con 6 VC de citrato 0,35 M + fosfato sódico 20 mM. A continuación, la columna se lavó con 3,5 VC de tampón de fosfato sódico 20 mM. Este lavado bajo en sal (sodio 20 mM) eluye una fracción de partículas de vector de rAAV-1 que son hidrófobamente distintas en su perfil de elución de las partículas de vector de rAAV-1 que se eluyen en el tampón de elución de salinidad superior. De hecho, si la fracción eluida en bajo contenido de sal se aísla y se aplica de nuevo a la columna de HIC bajo las condiciones descritas, esa población de vector todavía se eluía solamente en la fracción de baja salinidad, indicando que la fracción no era el resultado de una saturación en la capacidad de la columna. El análisis de infectividad sugiere que esta fracción de rAAV-1 probablemente representa una población que comprende cápsides vacías, cápsides parcialmente desnaturalizadas, material de la cápside menos infeccioso y cápsides parcialmente llenas. Por lo tanto, esta observación puede conducir a mejoras en la separación de partículas de rAAV-1 que son menos infecciosas y por lo tanto menos deseables como material obtenido como producto. A las condiciones de elución utilizadas, cualesquiera virus cooperadores y proteínas residuales presentes en la carga permanecerían unidos a la columna y así estarían presentes en la separación con bajo contenido de sal.

35 **Ejemplo 10:** Intercambio de tampón mediante cromatografía de exclusión por tamaño ("SEC")

El intercambio de tampones mediante cromatografía de exclusión por tamaño proporciona depuración proteínica adicional de proteínas de un tamaño que atraviesa los poros de las resinas, y es relativamente rápido en cuanto al tiempo necesario para intercambiar los tampones. El intercambio de tampones realizado en esta etapa era para asegurar que el eluido de HIC de la etapa previa se intercambiara por un tampón apropiado para la unión de rAAV-1 a la etapa de cromatografía de intercambio aniónico final del procedimiento. Una resina de calidad preparativa Amersham Superdex® 200 de 3,2 l (14 cm de diámetro × 21 cm de altura del lecho) (Amersham/GE Healthcare, Piscataway, NJ; Número de catálogo 17-1043-04) se relleno y se preparó al esterilizar con NaCl 2 M + NaOH 1 M y se equilibró con 2,8 VC de NaCl 20 mM + Tris 20 mM (pH = 8,0). La elución de HIC se subdividió al procedimiento a lo largo de la SEC en tres ciclos secuenciales de aproximadamente 400 ml cada uno, cargando no más de 12,5% del volumen de la columna de SEC para cada ciclo. Los picos de producto (contenidos en el volumen de huecos) de los tres ciclos de SEC se recogieron en una sola bolsa de bioprocesamiento. El eluido de HIC se cargó a la columna a un caudal de 49 cm/h. La columna se recorrió y se barrió con 1,4 VC de NaCl 20 mM + Tris 20 mM (pH = 8,0) y el vector de rAAV-1 presente en el eluido de HIC estaba presente en el volumen de huecos de la columna. Después de la recogida del volumen de huecos según se describe, las fracciones segunda y tercera se cargaron y se recogieron en la misma columna como se describe previamente para la primera fracción.

Ejemplo 11: Agente adventicio (depuración viral)

Como un procedimiento opcional para depurar virus adventicios que pueden estar presentes como oligocontaminantes y así dar un procedimiento ortogonal comercialmente razonable, se introdujo en el procedimiento un filtro de depuración viral. Ejemplos de estos filtros son conocidos en la especialidad e incluyen Millipore Viresolve® NFR (50 nm), Pall Ultipore® VF (50 nm) y Asahi 70 nm. Un filtro de depuración viral Millipore Viresolve® NFR (filtro Millipore 4" Virosolve NFR Número de catálogo KZRV 04T C3) se preparó según las instrucciones del fabricante, se barrió con NaCl 20 mM + Tris 20 mM (pH = 8,0) y la elución de SEC se filtró a través de la membrana. El filtro se barrió con varios volúmenes de NaCl 20 mM + Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) y se reunió con el eluido de SEC filtrado.

Ejemplo 12: Cromatografía de intercambio aniónico

Se realizó una segunda etapa de captura por intercambio aniónico para el vector de rAAV-1 como una etapa de concentración final y refinado sobre una resina Unosphere® Q (Biorad, Hercules, CA). Una columna de 373 ml (8,9 cm de diámetro × 6 cm de altura del lecho) se esterilizó con varios volúmenes de columna de NaOH 0,5 M y se equilibró con 7 VC de tampón de NaCl 20 mM + Tris 20 mM (pH = 8,0). La fracción de volumen de huecos de SEC u opcionalmente el eluido filtrado viralmente se cargó a una velocidad de 309 cm/h. La columna se lavó con 10 VC de NaCl 60 mM. La intensidad iónica de la solución de lavado se eligió para retener rAAV-1 unido a la resina mientras se separaban cualesquiera otras impurezas producidas durante el procedimiento, tales como glucanos que se pueden introducir mediante percolación desde diversos filtros utilizados en las etapas de purificación. El vector de rAAV-1 se eluyó de la columna con 6 VC de un NaCl 130 mM. La intensidad iónica de la elución salina de NaCl 130 mM separará el rAAV-1 de la columna mientras cualesquiera oligoimpurezas producidas durante el procedimiento residuales, tales como albúmina sérica o virus cooperador, permanecerán unidas.

La Figura 6 compara el grado de purificación a través de diversas etapas de procedimiento mediante SDS-PAGE. Muestras obtenidas durante el procedimiento procedentes de una cosecha del cultivo de producción representativas se hicieron circular en un gel de poliarilamida al 10% desnaturalizador/reductor y se tiñeron con Sypro Orange. Todas las muestras posteriores a la cosecha se cargaron a 1×10^{10} DRP / carril. Las dos muestras aguas arriba antes de la etapa de concentración por TFF (flujo pasante de la etapa de depuración inicial y el intercambio aniónico ("AEX")) solo se podían cargar a 1×10^9 DRP/carril debido a restricciones de volumen sobre el gel. Se cargó β -galactosidasa (β -Gal) en 50 ng/carril para valorar la sensibilidad y la consistencia de la tinción a través del gel. Se indican las tres proteínas de la cápside de AAV1 (VP1, 2, y 3).

Ejemplo 13: Porcentaje de recuperación de rAAV durante la purificación

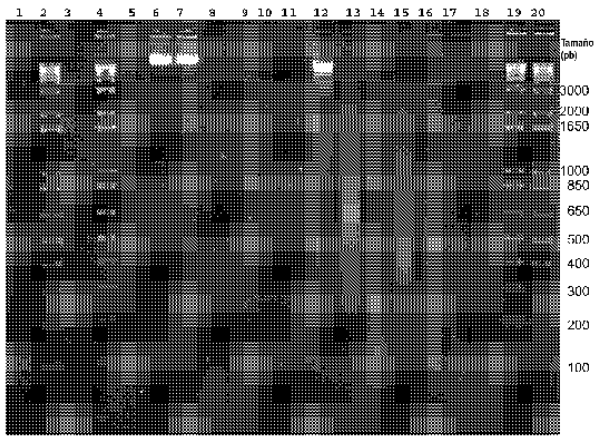
Los datos presentados en la Figura 7 muestran el porcentaje de recuperación de partículas infecciosas de rAAV después de cada etapa de procedimiento del esquema de purificación a partir de un cultivo de producción representativo de un vector de rAAV-1. El porcentaje de recuperación se calculó basándose en las DRPs totales del vector de rAAV-1 recuperado de cada etapa de procedimiento dividido por el número total de DRPs cargadas o sometidas a esa etapa de purificación. Los datos demuestran que en cada etapa en el procedimiento de purificación, se alcanzaban recuperaciones de aproximadamente 60% o más. En numerosos experimentos, el intervalo de recuperación de cada etapa de procedimiento era al menos de 60% a 90%. De forma particularmente notable, el intervalo de recuperación en la etapa de captura (es decir, la etapa cromatográfica en apatito) en experimentos individuales variaba de 57% a más de 90%. Por otra parte, el intervalo de recuperación en la etapa de HIC variaba de 60% a 80%.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar una población de partículas de virus adenoasociado recombinante (rAAV) de impurezas de producción en una corriente de alimentación, que comprende las etapas de:
- 5 (a)
- (i) poner en contacto una corriente de alimentación que contiene partículas de rAAV con un medio cromatográfico de apatito en presencia de polietilenglicol (PEG), en donde las partículas de rAAV se unen al medio cromatográfico de apatito; y
- 10 (ii) eluir las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito con un tampón de elución que contiene menos de 3% (p/v) de PEG; y
- 15 (b) unir las partículas de rAAV en la corriente de alimentación eluida del medio cromatográfico de apatito con cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).
2. El método de la reivindicación 1, en el que el medio cromatográfico de apatito es hidroxiapatito cerámico (CHT) o fluoroapatito cerámico (CFT).
- 20 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV en la etapa (a) (i) se pone en contacto con un medio cromatográfico de apatito en presencia de polietilenglicol (PEG) y un tampón básico.
- 25 4. El método de la reivindicación 3 en el que el tampón básico está entre pH 8,0 y 10,0.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que el tampón básico comprende borato.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el PEG tiene un peso molecular medio entre aproximadamente 5.000 (PEG5000) gramos por mol y aproximadamente 15.000 (PEG15000) gramos por mol.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV se pone en contacto con el medio cromatográfico de apatito en presencia de entre aproximadamente 3% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v) de PEG.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende, además, la etapa de lavar el medio cromatográfico de apatito con un tampón de lavado después de que la corriente de alimentación se ponga en contacto con el medio cromatográfico de apatito pero antes de eluir las partículas de rAAV del medio cromatográfico de apatito.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en el que el medio cromatográfico de apatito se lava una o más veces con un tampón de lavado de pH básico que contiene aproximadamente 7,5% (p/v) de PEG y/o un tampón de lavado que contiene aproximadamente 5% (p/v) de PEG.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, en el que el medio cromatográfico de apatito se lava, además, con un tampón de lavado de pH básico que contiene menos de 3% (p/v) de PEG y/o un tampón de lavado que no contiene PEG.
11. El método de las reivindicaciones 8-10, en el que el tampón de lavado comprende borato a un pH de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 10,0.
- 50 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que las partículas de rAAV unidas al medio cromatográfico de apatito se eluyen con un tampón de elución que comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en borato, ácido N-2-hidoxietilpiperacino-N'-2-etanosulfónico (HEPES) y Tris-HCl a pH neutro.
- 55 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende, además:
- (i) hacer que la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV fluya a través de una filtración con intercambio aniónico antes de la etapa (a);
- (ii) someter la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV a filtración con flujo tangencial (TFF) antes de la etapa (a); y/o
- 60 (iii) una etapa de inactivación térmica, para inactivar el virus cooperador.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la etapa (b) comprende un medio HIC, en donde el medio HIC se selecciona del grupo que consiste en resina Tosoh Butyl 650M, Tosoh SuperButyl 650C, Tosoh Phenyl 650C, EMD Fractogel Phenyl y Tosoh Has(butyl).
- 65

- 5 15. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende unir las partículas de rAAV a un medio cromatográfico con cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en un tampón de salinidad alta, en donde las partículas de rAAV y las impurezas de producción se unen al medio HIC; y eluir las partículas de rAAV unidas al medio HIC con un tampón de salinidad media, en donde el tampón de salinidad alta comprende entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 2,0 M de citrato.
- 10 16. El método de la reivindicación 15, en el que el tampón de salinidad media comprende menos de 0,5 M de citrato, opcionalmente en el que el tampón de salinidad media comprende aproximadamente 0,45 M, 0,4 M, 0,35 M, 0,3 M o 0,25 M de citrato.
- 15 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-16, que comprende, además, someter la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV eluidas del medio de HIC a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, que comprende, además, someter la corriente de alimentación que contiene las partículas de rAAV eluidas del medio de HIC a cromatografía de intercambio aniónico.

Figura 1



Carril	Muestra
1	Tampón solo
2	Escalera en TE
3	-
4	Escalera en la corriente de alimentación después de la depuración (PCLF)
5	-
<u>Controles</u>	
6	ADN λ en PCLF (sin Benz.)
7	control de parada (λ +PCLF+EDTA+Benz.)
8	control positivo (ADN λ en tampón + Benz.)
9	PCLF del lote de producción
10	muestra de Benzonase del lote de producción
11	muestra de AEXFT del lote de producción
<u>Digestiones con agregación</u>	
12	5 min. a 15°C
13	20 min. a 15°C
14	62 min. a 15°C
15	5 min. a 37°C
16	20 min. a 37°C
17	62 min. a 37°C
18	-
19	Escalera en PCFL
20	Escalera en TE

Figura 2

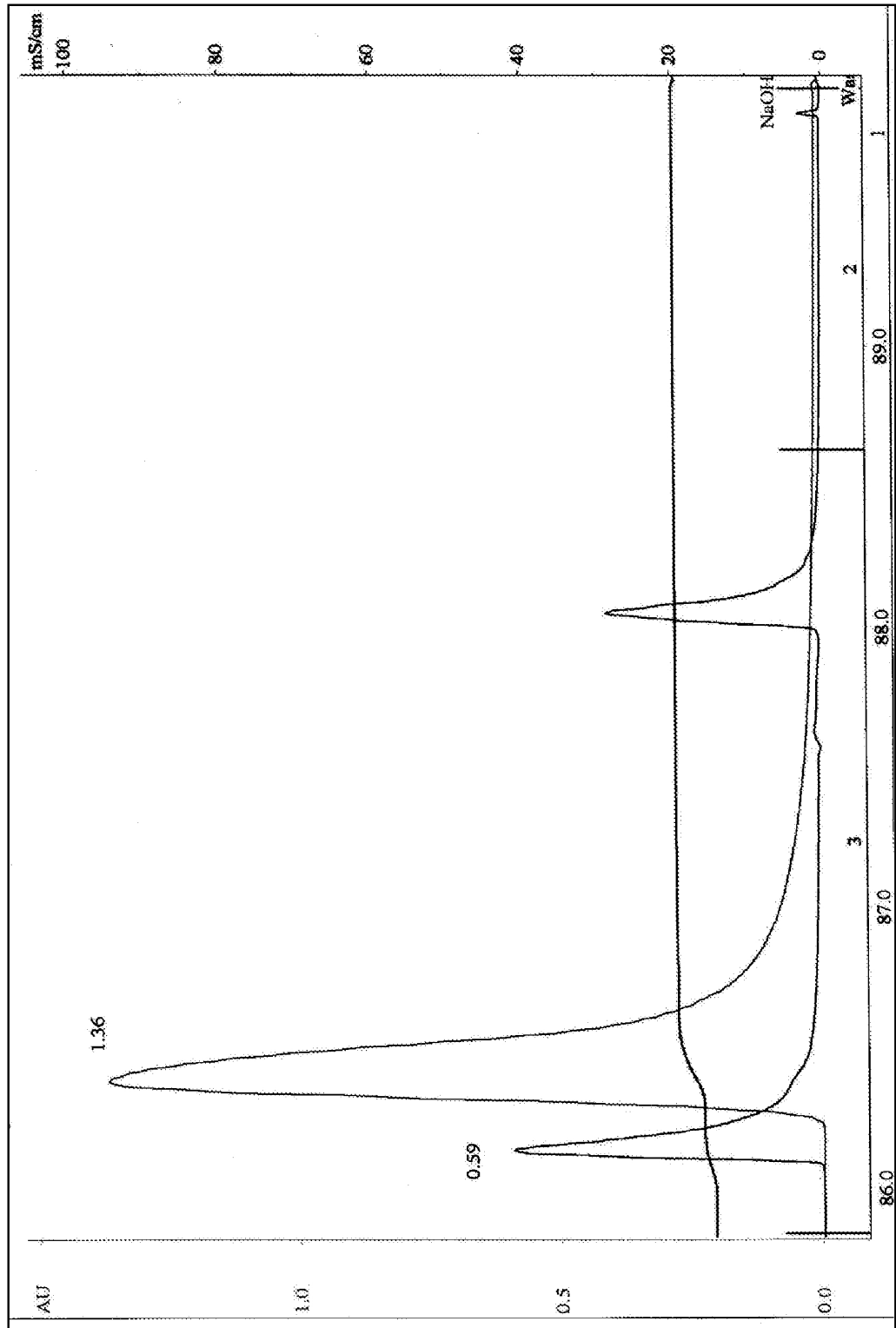
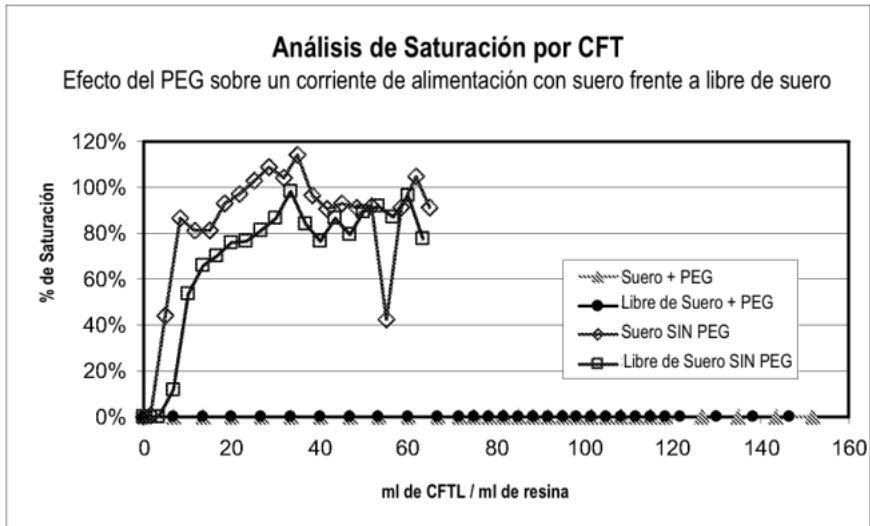


Figura 3



	Relación de cargas para 1% de saturación	% Recuperado en la Elución
Suero SIN PEG	~ 2	NE
Libre de Suero SIN PEG	~ 6	NE
Suero + PEG	> 150	71%
Libre de Suero + PEG	> 150	69%

Figura 4

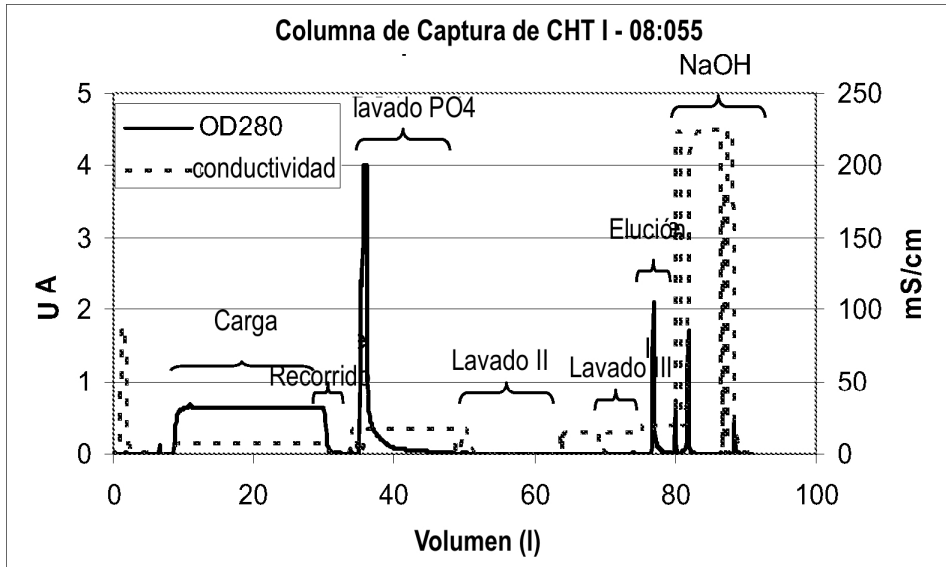


Figura 5

A

Fracción	CFT	CHT
FT	0%	0%
PO4	1%	2%
WII/III	0%	0%
Elución	71%	65%
Balance de Masas	72%	68%

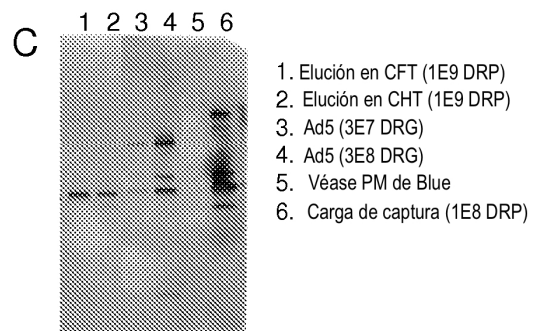
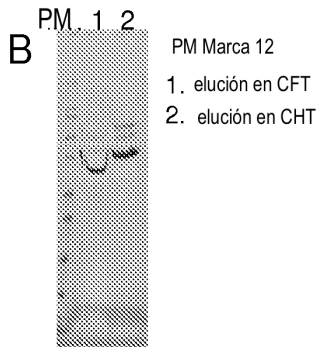


Figura 6

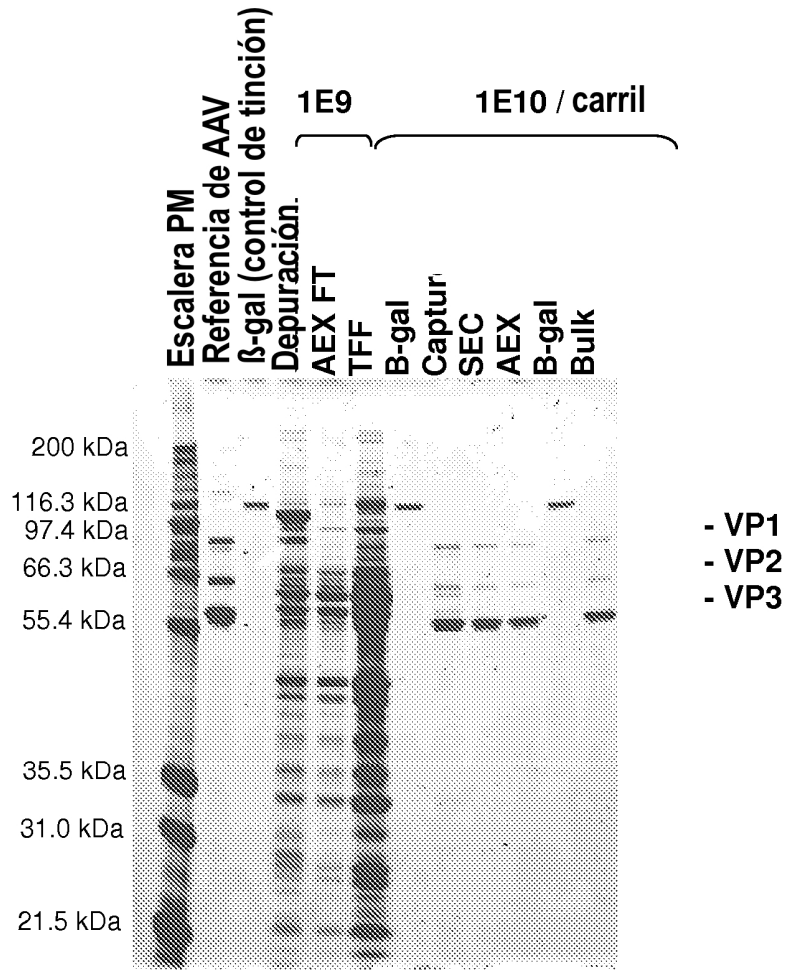


Figura 7

