

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 849**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2017 PCT/US2017/059967**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018 WO18128688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2017 E 17866365 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2023 EP 3535388**

54 Título: **Métodos de purificación de virus adenoasociado**

30 Prioridad:

04.11.2016 US 201662417775 P

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

20.09.2023

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.0%)**

**1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

**FIEDLER, CHRISTIAN;
GRILLBERGER, LEOPOLD;
HASSLACHER, MEINHARD;
KRAUS, BARBARA;
MITTERGRADNEGGER, DOMINIK;
REUBERGER, STEFAN;
SCHAFHAUSER, HORST y
BENDIK, MARIAN**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 948 849 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 de purificación de virus adenoasociado

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/417.775 presentada el 4 de noviembre de 2016.

10 **Campo técnico**

La memoria descriptiva se refiere a materiales y a métodos de purificación de virus adenoasociado (AAV).

Antecedentes

15 El virus adenoasociado (AAV) es un virus pequeño sin envuelta que encierra un genoma de ADN monocatenario lineal. El AAV pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*, dado que la infección productiva por AAV se produce sólo en presencia de un virus auxiliar, tal como, por ejemplo, adenovirus o virus del herpes. Incluso en ausencia de un virus auxiliar, el AAV (serotipo 2) puede lograr latencia integrándose en el cromosoma 19q13.4 de un genoma humano huésped. Se sabe que es el único virus de ADN de mamífero que es capaz de realizar integración específica de sitio (Daya y Berns, *Clinical Microbiology Reviews*, páginas 583-593 (2008)).

25 Para usar de manera segura el AAV en la clínica, el AAV se ha modificado genéticamente en varias ubicaciones dentro de su genoma. Por ejemplo, el gen *Rep*, que se requiere para la replicación viral, y el elemento requerido para la integración específica de sitio se han eliminado del genoma de AAV en muchos vectores virales. Este AAV recombinante (AAVr) existe en un estado extracromosómico y tiene una muy baja eficiencia de integración en el ADN genómico. Por tanto, se reduce, si no es que se elimina totalmente, la posibilidad de que el AAVr induzca mutagénesis al azar en una célula huésped. Debido a estas propiedades y a la falta de patogenicidad, el AAVr ha demostrado ser muy prometedor como vector de terapia génica en múltiples aspectos de aplicaciones preclínicas y clínicas. Están sometándose a prueba nuevos serotipos y vectores autocomplementarios en la clínica. Junto con estos desarrollos de vectores en curso, el esfuerzo continuado se ha centrado en procedimientos de fabricación escalables que puedan generar de manera eficiente altas cantidades de título de vectores de AAVr con pureza y potencia altas.

35 A pesar de que el esfuerzo por diseñar métodos eficientes a gran escala para purificar un producto de AAV adecuado para administración a humanos ha sido grande, sigue existiendo la necesidad de mejores métodos de purificación de AAV. Por ejemplo, los actuales métodos de generación de AAV en cultivo celular dan como resultado la formación de cápsides “vacías” que se ha demostrado que conducen a respuestas inmunitarias mediadas por células T contra antígeno de cápside, conduciendo a hepatotoxicidad de bajo grado y a una pérdida parcial de expresión (Wright, *Molec Therapy* 22(1): 1-2 (2014)). Por tanto, se desean métodos de purificación de AAV que incluyan etapas para retirar las cápsides de AAV vacías a partir del producto de AAV final.

Sumario

45 La presente invención se define por las reivindicaciones.

Una característica de la generación de vectores de AAV en cultivo celular es la formación de un exceso de cápsides “vacías”, que carecen del genoma de vector. Tales cápsides vacías son incapaces de proporcionar un beneficio terapéutico asociado con la producción de transgenes. El efecto de las cápsides vacías sobre el desenlace clínico no está claro. Sin embargo, existe la posibilidad de aumentar las respuestas inmunitarias innatas o adaptativas al vector, lo que luego hace que las cápsides vacías representen un problema en contextos de terapia génica. Wright, *Molecular Therapy* 22: 1-2 (2014).

55 En el presente documento se proporcionan métodos de producción de un producto de virus adenoasociado (AAV), métodos de purificación de AAV y métodos de purificación de cápsides de AAV llenas a partir de una fracción de AAV concentrada que comprende cápsides de AAV vacías y cápsides de AAV llenas. Los métodos de la presente divulgación son ventajosos con respecto a los conocidos en la técnica, ya que los métodos proporcionados en el presente documento son adecuados para la producción a gran escala de AAV y proporcionan un producto de gran pureza y potencia adecuado para uso clínico. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un producto de AAV que comprende partículas de AAV de una población homogénea y alta pureza. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un producto de AAV que comprende ADN de vector de longitud completa. En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un producto de AAV que está sustancialmente libre de contaminantes no deseados, incluyendo, pero sin limitarse a, partículas de AAV vacías (incluyendo las que contienen ADN de vector truncado o incompleto), partículas de AAV con composición de proteína incompleta y estructuras oligomerizadas, o virus contaminantes, por ejemplo, virus con envuelta lipídica distintos de AAV. En

realizaciones a modo de ejemplo, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un producto de AAV que contiene una alta cantidad de ADN (ADNc) que codifica para la proteína de interés.

En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden una etapa de ultracentrifugación para separar cápsides de AAV llenas a partir de cápsides de AAV vacías. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos comprenden (i) cargar en un rotor una fracción de AAV concentrada con al menos dos disoluciones de azúcar, cada una de las cuales tiene una concentración de azúcar diferente, (ii) hacer funcionar una ultracentrífuga que comprende el rotor cargado en modo discontinuo para formar un gradiente de azúcar, y (iii) obtener una fracción del gradiente de azúcar para obtener una fracción de AAV que comprende cápsides de AAV llenas. En aspectos a modo de ejemplo, el rotor es un rotor zonal.

En aspectos a modo de ejemplo, las al menos dos disoluciones de azúcar comprenden, cada una, un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa. En aspectos a modo de ejemplo, una disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa y otra disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa. Opcionalmente, hay otra disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa. Cuando se cargan en la parte inferior del rotor o compartimento, el orden de secuencia de carga puede ser en primer lugar la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa, si está presente, luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, y luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, la muestra que va a procesarse se añade antes de la adición de las disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, la ultracentrifugación se lleva a cabo en un modo de flujo continuo y la muestra se carga después de lograr un gradiente de densidad durante la centrifugación.

En determinadas realizaciones, los métodos de la presente divulgación comprenden una etapa de ultracentrifugación para separar cápsides de AAV llenas a partir de cápsides de AAV vacías. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos comprenden (i) cargar en un rotor una fracción de AAV concentrada con al menos dos disoluciones de azúcar, cada una de las cuales tiene una concentración de azúcar diferente y cada una de las cuales comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa, (ii) hacer funcionar una ultracentrífuga que comprende el rotor cargado en modo discontinuo para formar un gradiente de azúcar, y (iii) obtener una fracción del gradiente de azúcar para obtener una fracción de AAV en la que al menos o aproximadamente el 60% de las partículas de AAV en la fracción de AAV son cápsides de AAV llenas. En aspectos a modo de ejemplo, el rotor es un rotor zonal. En determinadas realizaciones, el volumen de las disoluciones de azúcar es mayor de o igual a aproximadamente el 50% del volumen del rotor zonal. En determinadas realizaciones, el volumen total de las disoluciones de azúcar y la fracción de AAV es menor de o igual al volumen del rotor zonal. En determinadas realizaciones, la razón del volumen de las disoluciones de azúcar con respecto al volumen de la fracción de AAV es menor de o igual a uno.

En determinadas realizaciones, cada disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, cada disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 55% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una de las disoluciones de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una de las disoluciones de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una de las disoluciones de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 60% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, una disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, en las que una segunda disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente en las que una tercera disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa.

En determinados aspectos, se cargan dos disoluciones de azúcar en el rotor zonal. En determinadas realizaciones, se cargan dos disoluciones de azúcar en el rotor zonal y en las que una disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa y una segunda disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa.

En determinados aspectos, se cargan al menos tres disoluciones de azúcar en el rotor zonal. En determinadas realizaciones, se cargan tres disoluciones de azúcar en el rotor zonal. En determinadas realizaciones, se cargan tres disoluciones de azúcar en el rotor zonal y en las que una disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa, una segunda disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, y una tercera disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, la fracción de AAV concentrada se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, y en las que la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, la fracción de AAV concentrada se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa, en las que la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, y en las que la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, cada disolución de azúcar se carga en el rotor zonal en volúmenes iguales. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor zonal a un volumen que es el doble del volumen de al menos una de las otras disoluciones de azúcar en el rotor zonal. En determinadas realizaciones, en las que la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor zonal a un volumen que es al menos el volumen de las otras disoluciones de azúcar combinadas en el rotor zonal. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor zonal a un volumen que es al menos el doble del volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande, opcionalmente, en las que el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande es igual al volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar intermedia. En determinadas realizaciones, se cargan al menos dos disoluciones de azúcar en el rotor zonal, en las que la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor zonal a un volumen que es al menos el doble del volumen de al menos otra disolución de azúcar en el rotor zonal. En determinadas realizaciones, se cargan al menos dos disoluciones de azúcar en el rotor zonal, en las que la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor zonal a un volumen que es el mismo volumen de al menos otra disolución de azúcar en el rotor zonal. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor zonal a un volumen que es la mitad del volumen de la fracción de AAV concentrada. En determinadas realizaciones, en las que la razón del volumen del gradiente de azúcar total con respecto al volumen de la fracción de AAV cargada en el rotor zonal es de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1:5.

En determinados aspectos, la fracción de AAV comprende una disolución tamponada. En determinadas realizaciones, la disolución tamponada incluye, sin limitación, tampones fosfato, histidina (por ejemplo, L-histidina), citrato de sodio, HEPES, Tris, bicina, glicina, N-glicilglicina, acetato de sodio, carbonato de sodio, glicilglicina, lisina, arginina, fosfato de sodio, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, la fracción de AAV comprende Tris-HCl y NaCl. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 900 mM. En determinadas realizaciones, el NaCl está a una concentración de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, la disolución tamponada tiene un pH de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 9,0. En determinadas realizaciones, el tampón comprende Tris-HCl a

aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 500 mM con un pH de 8,5. En determinadas realizaciones, el tampón comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 750 mM con un pH de 8,0. En determinadas realizaciones, la disolución tamponada comprende el 45-55% (p/p) de etilenglicol.

5 En determinadas realizaciones, cada disolución de azúcar comprende un disacárido o trisacárido. En determinadas realizaciones, el disacárido comprende sacarosa, maltosa, lactosa, y combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, cada disolución de azúcar comprende sacarosa. En determinadas realizaciones, cada una de las disoluciones de azúcar comprende además Tris-HCl y NaCl. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM. En determinadas realizaciones, la disolución tamponada
10 tiene un pH de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,5. En determinadas realizaciones, el tampón comprende Tris-HCl 20 mM y 8 g/l de NaCl con un pH de 7,4.

15 En determinados aspectos, los métodos comprenden hacer funcionar la ultracentrífuga a una primera velocidad de rotación de menos de 10.000 rpm durante menos de 60 minutos, y a una segunda velocidad de rotación dentro del intervalo de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 40.000 rpm durante al menos 4 horas.

20 En determinados aspectos, los métodos comprenden hacer funcionar la ultracentrífuga a una primera velocidad de rotación de menos de 10.000 rpm durante menos de 60 minutos, y a una segunda velocidad de rotación dentro del intervalo de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 40.000 rpm durante al menos 12 horas.

25 En determinadas realizaciones, la primera velocidad de rotación es de aproximadamente 3.000 rpm a aproximadamente 6.000 rpm, opcionalmente, de aproximadamente 4.000 rpm. En determinadas realizaciones, la segunda velocidad de rotación es de aproximadamente 35.000 rpm y opcionalmente se mantiene durante de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas. En determinadas realizaciones, la segunda velocidad de rotación se mantiene durante al menos aproximadamente 16 horas o al menos 20 horas. En determinadas realizaciones, la segunda velocidad de rotación es de aproximadamente 35.000 rpm y opcionalmente se mantiene durante de aproximadamente 16 a aproximadamente 20 horas.

30 En determinadas realizaciones, la fracción de AAV concentrada cargada en el rotor zonal comprende al menos 1×10^{12} cápsides de AAV por ml. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden recoger un sobrenadante a partir de un cultivo celular que comprende células HEK293 transfectadas con un sistema plasmídico triple. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden (i) recoger el sobrenadante de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días después de la transfección de las células HEK293 o (ii) cuando el cultivo celular tiene una densidad celular de más de o aproximadamente 5×10^6 células/ml y tiene una viabilidad celular de más del 50%. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden filtrar el sobrenadante recogido mediante filtración de profundidad. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden filtrar el sobrenadante recogido a través de un filtro que comprende celulosa y perlitas y que tiene una permeabilidad mínima de aproximadamente 500 l/m². En determinadas realizaciones, los métodos comprenden filtrar el sobrenadante recogido a través de un filtro con un tamaño de poro mínimo de aproximadamente 0,2 µm. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden concentrar una fracción de AAV usando un sistema de ultra/diafiltración. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden concentrar una fracción de AAV usando un sistema de ultra/diafiltración antes, después, o antes y después de una etapa que comprende aplicar una fracción de AAV a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) en condiciones que permitan que el AAV fluya a través de la columna de cromatografía de AEX. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden inactivar los virus con envuelta lipídica de una fracción de AAV con un detergente disolvente. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden la nanofiltración de una fracción de AAV para retirar los virus de más de 35 nm. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden una etapa de pulido que comprende realizar cromatografía de AEX con una columna que comprende gel tentacular.

50 En determinadas realizaciones, los métodos comprenden (i) aplicar una fracción de AAV a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) en condiciones que permitan que el AAV fluya a través de la columna de cromatografía de AEX y (ii) recoger la fracción no retenida que comprende el AAV. En determinadas realizaciones, la fracción de AAV se aplica a la columna de cromatografía de AEX con un tampón de carga que comprende NaCl a de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM, opcionalmente, en el que el pH del tampón de carga es de aproximadamente 8 a aproximadamente 9. En determinadas realizaciones, el tampón de carga comprende NaCl a de aproximadamente 115 mM a aproximadamente 130 mM, opcionalmente, el tampón de carga comprende NaCl a de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 125 mM.

60 En determinadas realizaciones, se retiran las proteínas de células huésped. En determinadas realizaciones, las proteínas de células huésped son HSP70 y/o LDH.

65 En aspectos a modo de ejemplo, al menos o aproximadamente el 55% de las partículas de AAV en la fracción obtenida a partir del gradiente de azúcar son cápsides de AAV llenas. En aspectos a modo de ejemplo, más de o aproximadamente el 60% de las partículas de AAV en la fracción obtenida a partir del gradiente de azúcar son cápsides de AAV llenas. En aspectos a modo de ejemplo, más de o aproximadamente el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el

78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de las partículas de AAV en la fracción obtenida a partir del gradiente de azúcar son cápsides de AAV llenas.

5 En determinadas realizaciones, los métodos comprenden someter a prueba una fracción de AAV mediante un ELISA específico de AAV. En determinadas realizaciones, el ELISA específico de AAV es un ELISA de tipo sándwich específico para AAV. En determinadas realizaciones, los métodos no incluyen ninguna etapa de medir la potencia mediante PCR cuantitativa.

10 En determinadas realizaciones, el AAV es AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10. En determinadas realizaciones, el AAV es AAV8.

En el presente documento también se proporcionan productos de AAV producidos mediante los métodos descritos anteriormente y en el presente documento.

15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de un método a modo de ejemplo de la presente divulgación.

20 La figura 2 es un gráfico de la cantidad de partículas de virus (gramos virales) por ml de sobrenadante de un cultivo de células transfectadas representada gráficamente frente al transcurso de tiempo (días). Propagación de AAV8 en cultivos de células HEK293 en condiciones convencionales establecidas (por ejemplo, pH, temp., velocidad de agitación) en escala de 2 l (4 ejecuciones en paralelo con dos lotes de PEI diferentes): aumento del título en sobrenadante de cultivo celular a lo largo del tiempo medido mediante qPCR específica de FIX (T01 = día 1 de transfección, T02 = día 2 de transfección, etc.). El título se midió mediante qPCR específica de FIX en 3 biorreactores de escala de 2 l.

30 La figura 3 es un gráfico de la cantidad de partículas de virus (gramos virales) por ml de sobrenadante de un cultivo de células transfectadas representada gráficamente frente al transcurso de tiempo (días). Propagación de AAV8 en cultivos de células HEK293 en condiciones convencionales establecidas (por ejemplo, pH, temp., velocidad de agitación) en escala de 2 l (4 ejecuciones en paralelo con dos lotes de PEI diferentes): aumento del título en sobrenadante de cultivo celular a lo largo del tiempo medido mediante un ELISA específico de AAV (T01 = día 1 de transfección, T02 = día 2 de transfección, etc.). El título de genoma de vector se midió mediante un ELISA específico de AAV en 3 biorreactores de escala de 2 l.

35 La figura 4 es un gráfico de la presión y la velocidad de flujo durante la etapa de filtración de profundidad, tal como se mide continuamente mediante dos sensores de presión (presión 1 antes de la filtración de profundidad, presión 2 antes del filtro de membrana después del filtro de profundidad; flujo = velocidad de flujo tal como se mide con un medidor de flujo).

40 La figura 5 es un gráfico del producto no retenido de una cromatografía de AEX Mustang Q en modo negativo (sin unión).

45 La figura 6 es una tinción con plata (izquierda) y una inmunotransferencia de tipo Western (derecha) de las fracciones indicadas.

La figura 7 es una tinción con plata (izquierda) y una inmunotransferencia de tipo Western (derecha) de las fracciones indicadas.

50 La figura 8 es un gráfico del perfil de elución por ultracentrifugación que separa las cápsides vacías frente a las llenas. Las fracciones eran de 50 ml cada una.

La figura 9 es una tinción con plata (izquierda) y una inmunotransferencia de tipo Western (derecha) de las fracciones indicadas.

55 La figura 10 es el pulido final de AAV8 en Fractogel TMAE.

La figura 11 es un esquema de un método a modo de ejemplo de la presente divulgación.

60 La figura 12 es una curva que muestra la ultracentrifugación de partículas de AAV8 llenas y vacías separadas usando el protocolo del 50-55-60% en disolución acuosa, incluyendo partículas que contienen variantes de secuencia de ADN diferentes. El ADN de vector era factor de coagulación humano IX Padua, bicatenario, longitud completa de aproximadamente 4,8 kB. Se procesaron fracciones individuales tal como se indica en el perfil de UC en una columna de AEX-TMAE de 4 ml y se formularon para dar un producto final. Se analizó cada una de las fracciones formuladas. Se agruparon las fracciones 10 a 14 y representan el producto final homólogo que contiene AAV8 con ADN de vector de longitud completa. Las fracciones 15 a 21 y adicionalmente las fracciones 25 y 26 se

procesan por separado y muestran una longitud decreciente del ADN de vector encapsulado en las partículas de AAV8. Esto se muestra en los geles de xDNA-agarosa de la figura 14 y 15 y en los datos de la ultracentrifugación analítica (AUC) mostrados en la figura 16.

5 La figura 13 es una tinción con plata (izquierda) y una inmunotransferencia de tipo Western (derecha) de las fracciones indicadas.

10 La figura 14 es una fotografía de un gel de agarosa al 1% de las siguientes muestras tomadas de la ultracentrifugación de partículas de AAV8 descrita en el ejemplo 9: carril 1 = marcador; carril 2 = PV007 (AAV8 derivado del procedimiento de Chatham original); carril 3 = fracción 15; carril 4 = fracción 16; carril 5 = fracción 17; carril 6 = fracción 18; carril 7 = fracción 19; carril 8 = fracción 20; carril 9 = fracción 21; carril 10 = fracción 25; carril 11 = fracción 26; carril 12 = producto de AAV8 para administración clínica; y carril 13 = marcador. BDS = principio activo a granel (TMAE-eluito diluido final). Esta figura muestra que las fracciones 10 a 14 agrupadas del pico de UV obtenido a mayor densidad de sacarosa en la ultracentrifugación contienen una banda de ADN individual muy pura sin ningún rastro adicional de variantes de ADN más pequeñas del ADN de vector.

15 La figura 15 es una fotografía de un gel de agarosa alcalina al 0,8% de las siguientes muestras tomadas de la ultracentrifugación de partículas de AAV8 descrita en el ejemplo 9: carril 1 = marcador; carril 2 = PV007 (AAV8 derivado de procedimientos de producción previos); carril 3 = fracción 15; carril 4 = fracción 16; carril 5 = fracción 17; carril 6 = fracción 18; carril 7 = fracción 19; carril 8 = fracción 20; carril 9 = fracción 21; carril 10 = fracción 25; carril 11 = fracción 26; carril 12 = producto de AAV8 para administración clínica; y carril 13 = marcador. BDS = principio activo a granel (TMAE-eluito diluido final). Esta figura muestra que las fracciones 10 a 14 agrupadas del pico de UV obtenido a mayor densidad de sacarosa en la ultracentrifugación contienen una banda de ADN individual muy pura sin ningún rastro adicional de variantes de ADN más pequeñas del ADN de vector.

20 La figura 16A-16B representa los perfiles de elución con Fractogel TMAE derivados de las fracciones indicadas de la ultracentrifugación analítica (AUC) como material de partida. Las cápsides llenas y vacías se identifican con flechas. También se identifica una subpoblación de cápsides que contienen ADN de vector incompleto (también definidas en el presente documento como vacías). Los datos también se representan en la tabla 17. Véase la figura 12 en lo relativo a las fracciones.

25 La figura 17 es un gráfico del perfil de elución por ultracentrifugación en el que AAV8 en una disolución tamponada de etilenglicol al 50% (p/p) en Tris/NaCl se somete a ultracentrifugación durante 20 horas a 35.000 rpm usando un gradiente de sacarosa con disoluciones de sacarosa al 55% y al 60%. La razón de muestra de carga de AAV8 con respecto al gradiente de sacarosa es de 1:1. El ADN de vector es factor de coagulación humano IX Padua, monocatenario, autocomplementario, de longitud completa (2,6 kB).

30 La figura 18 es un gráfico de una separación de AAV8 que contiene ADN de vector monocatenario de factor de coagulación humano IX Padua (2,6 kB) usando ultracentrifugación con el protocolo de capas de azúcar del 55-60%, en el que la muestra de AAV8 se carga en una disolución tamponada de etilenglicol al 50% (p/p) en Tris/NaCl. Cada fracción se somete a prueba mediante: qPCR de ITR de AAV8, antígeno de AAV8, WAX (intercambiador débilmente aniónico-cápsides llenas), la razón de ADN/AAV es la razón de genomas de vector de qPCR de ITR (gv/ml) / ELISA de antígeno de cápside de AAV8 (cp/ml). Los datos se normalizaron para permitir la presentación de los gráficos en los mismos ejes.

35 La figura 19 es un gráfico del perfil de elución por ultracentrifugación en el que AAV8 en etilenglicol al 50% (p/p) en tampón Tris/NaCl se somete a ultracentrifugación durante 20 horas a 35.000 rpm en a través de un gradiente de sacarosa con disoluciones de sacarosa al 55% y al 60%. La razón de muestra de carga de AAV8 con respecto al gradiente de sacarosa es de 1:1, con un volumen central de 3.200 ml. El ADN de vector es factor de coagulación humano VIII, de longitud completa (~4,8 kB).

40 La figura 20 es una superposición de gráficos de coeficiente de sedimentación de las fracciones 8-10 (véase la figura 19) que demuestra la separación de subespecies. La flecha indica un desplazamiento hacia AAV8 con menor peso desde fracciones con mayor densidad hasta fracciones con menor densidad en el gradiente de UC. Fracción 8 > fracción 9 > fracción 10.

45 La figura 21 es un gráfico de una separación de AAV8 que contiene ADN de vector monocatenario de factor de coagulación humano IX Padua (2,6 kB) usando ultracentrifugación con el protocolo de capas de azúcar del 50-55-60%, en el que la muestra de AAV8 se carga en una disolución tamponada en Tris-HCl/NaCl. Cada fracción se somete a prueba mediante: qPCR de ITR de AAV8 y ELISA. La razón de ADN/AAV es la razón de genomas de vector de qPCR de ITR (gv/ml) / ELISA de antígeno de cápside de AAV8 (cp/ml). Los datos se normalizaron para permitir la presentación de los gráficos en los mismos ejes.

50 La figura 22 es un gráfico del perfil de elución por ultracentrifugación en el que AAV8 en etilenglicol al 50% (p/p) en tampón Tris/NaCl se somete a ultracentrifugación durante 20 horas a 35.000 rpm en a través de un gradiente de sacarosa con disoluciones de sacarosa al 55% y al 60%. La razón de muestra de carga de AAV8 con respecto al

gradiente de sacarosa es de 1:1, con un volumen central de 7.700 ml. El ADN de vector es factor de coagulación humano IX Padua, monocatenario, autocomplementario, de longitud completa (~2,6 kB).

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan métodos de producción de un producto de virus adenoasociado (AAV), métodos de purificación de AAV y métodos de purificación de cápsides de AAV llenas a partir de una fracción de AAV concentrada que comprende cápsides de AAV vacías y cápsides de AAV llenas.

Ventajosamente, los métodos son escalables a volúmenes grandes de material de partida, por ejemplo, cultivo celular. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento son métodos a gran escala capaces de purificar AAV a partir de volúmenes de al menos o aproximadamente 150 l, al menos o aproximadamente 250 l, al menos o aproximadamente 500 l, al menos o aproximadamente 600 l, al menos o aproximadamente 700 l, al menos o aproximadamente 800 l, al menos o aproximadamente 900 l, o al menos o aproximadamente 1000 l. En determinadas realizaciones, los métodos son escalables a un volumen mínimo de material de partida (por ejemplo, cultivo celular) de al menos o aproximadamente 1250 l, al menos o aproximadamente 1500 l, al menos o aproximadamente 2000 l, al menos o aproximadamente 2500 l, al menos o aproximadamente 3000 l, al menos o aproximadamente 4000 l, al menos o aproximadamente 5000 l, al menos o aproximadamente 6000 l, al menos o aproximadamente 7000 l, al menos o aproximadamente 8000 l, al menos o aproximadamente 9000 l, al menos o aproximadamente 10.000 l, o más. Por ejemplo, los métodos se llevan a cabo con un volumen mínimo de aproximadamente 1000 l o aproximadamente 10.000 l o 25.000 l o más de cultivo celular que produce AAV.

Los métodos de producción y purificación de AAV descritos en el presente documento también son ventajosos, porque los métodos dan como resultado una producción de AAV de alto título. En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 10^{10} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 10^{11} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 10^{12} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 10^{13} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 10^{14} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 10^{15} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 2×10^{15} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En determinadas realizaciones, un producto de AAV que comprende al menos aproximadamente 5×10^{15} partículas de virus (pv) se produce a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular).

Los métodos de la presente divulgación que proporcionan altos rendimientos de AAV incluyen, en determinadas realizaciones, una etapa de nanofiltración para retirar los virus más grandes que la especificación de exclusión del filtro usado en la etapa de nanofiltración. Esta etapa de filtración permite que el producto de AAV final sea un producto más seguro para su administración a humanos, en comparación con los productos de AAV logrados mediante otros métodos. La etapa de nanofiltración es una etapa de reducción de virus eficaz para virus más grandes que la especificación de exclusión del filtro usado en la etapa de nanofiltración, que, en determinadas realizaciones, significa que el método tiene la capacidad de retirar más de 4 logs de virus contaminantes a partir del producto de AAV mediante nanofiltración, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Otra ventaja de los métodos descritos en el presente documento es que los métodos producen un producto de AAV muy puro. En determinadas realizaciones, el producto de AAV producido a través de los métodos de la presente divulgación está sustancialmente libre de una o más contaminantes: proteínas de células huésped, ácidos nucleicos de células huésped (por ejemplo, ADN de células huésped), ADN plasmídico, vectores virales vacíos (incluyendo los que contienen ADN de vector truncado o incompleto), partículas de AAV con composición de proteína incompleta y estructuras oligomerizadas, o virus contaminantes, por ejemplo, virus con envuelta lipídica distintos de AAV, proteína de choque térmico 70 (HSP70), lactato deshidrogenasa (LDH), proteasomas, virus contaminantes distintos de AAV (por ejemplo, virus con envuelta lipídica), componentes de cultivo de células huésped (por ejemplo, péptidos, antibióticos), componentes relacionados con el procedimiento (por ejemplo, tri-n-butilfosfato al 0,3%; Triton X100 al 1,0%, polietilenimina), micoplasma, pirógenos, endotoxinas bacterianas y agentes accidentales. Puede determinarse que los productos de AAV están sustancialmente libres si aparecen libres de la impureza tal como se determina mediante métodos de análisis convencionales, tales como, pero sin limitarse a, cromatografía en capa fina (CCF), electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), ensayo de inmovilización ligado a enzimas (ELISA) o qPCR de ITR, usados por los expertos en la técnica para evaluar tal pureza, o suficientemente puros de manera que una purificación adicional no alteraría de manera detectable las propiedades físicas y

químicas, tales como las actividades enzimática y biológica, de la sustancia. En una realización, el término “sustancialmente libre de una impureza” incluye preparaciones de AAV que tienen menos de aproximadamente el 50% (en peso seco), el 45%, el 40%, el 35%, el 30%, el 25%, el 20%, el 15%, el 10%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% o el 1% de material de AAV de cápside distinta de llena. En otra realización, el término “sustancialmente libre de una impureza” incluye preparaciones de AAV en las que la impureza representa menos de aproximadamente, o exactamente, el 50%, el 45%, el 40%, el 35%, el 30%, el 25%, el 20%, el 15%, el 10%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% o el 1% del volumen del producto de AAV.

En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación proporcionan un producto de AAV purificado en el que se retira al menos o aproximadamente el 50% del contaminante hallado en el material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación proporcionan un producto de AAV purificado en el que se retira al menos o aproximadamente el 60% del contaminante hallado en el material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación proporcionan un producto de AAV purificado en el que se retira al menos o aproximadamente el 70% del contaminante hallado en el material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación proporcionan un producto de AAV purificado en el que se retira al menos o aproximadamente el 80% del contaminante hallado en el material de partida (por ejemplo, cultivo celular). En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación proporcionan un producto de AAV purificado en el que se retira al menos o aproximadamente el 90% del contaminante hallado en el material de partida (por ejemplo, cultivo celular).

En determinadas realizaciones, el producto de AAV producido a través de los métodos de la presente divulgación es adecuado para su administración a un humano. En determinadas realizaciones, el AAV es un AAV recombinante (AAVr). En determinadas realizaciones, el producto de AAV producido a través de los métodos de la presente divulgación es estéril y/o de calidad para Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). En determinadas realizaciones, el producto de AAV producido a través de los métodos de la presente divulgación es conforme a los requisitos expuestos en el capítulo 1046 de la Farmacopea Estadounidense o en la Farmacopea Europea sobre medicamentos para terapia génica o tal como exige la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA de EE.UU.) o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA).

Adicionalmente, los productos de AAV producidos a partir de los métodos descritos en el presente documento son muy potentes. La potencia de un producto de AAV, por ejemplo, producto de AAV8, puede describirse en cuanto a (1) biopotencia *in vivo* (por ejemplo, producción de proteína activa en ratones) que se proporciona como unidades (FIX o FVIII) por ml de plasma de ratón; o (2) biopotencia *in vitro*. El ensayo de biopotencia *in vitro* mide el potencial de vectores AAV para transducir células, por ejemplo, células HepG2, que expresan y secretan la proteína de interés al medio, y determinan la cantidad mediante técnicas de ELISA y/o actividad enzimática. En la técnica se conocen métodos adecuados de medición de biopotencia *in vivo* e *in vitro* y también se describen en el presente documento como ejemplo 12.

En realizaciones adicionales, el producto de AAV producido a partir de los métodos descritos en el presente documento demuestra una razón de ADN/AAV superior. En realizaciones a modo de ejemplo, el producto de AAV producido a partir de los métodos descritos en el presente documento demuestra una razón de genomas de vector por μg de AAV superior, lo que demuestra que el producto de AAV tiene una alta cantidad de partículas de virus llenas. En determinadas realizaciones, los métodos de la presente divulgación comprenden someter a prueba una fracción de AAV mediante un ELISA específico de AAV. En determinadas realizaciones, el ELISA específico de AAV es suficiente para proporcionar una lectura representativa de la potencia de la fracción de AAV, porque la mayoría de las cápsides en la fracción de AAV son cápsides llenas.

Ultracentrifugación por gradiente de azúcar

En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden una etapa de ultracentrifugación durante la cual se forma un gradiente de densidad. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que la etapa de ultracentrifugación permite la separación de las cápsides de AAV llenas a partir de las cápsides de AAV vacías. Tal como se usa en el presente documento, el término “cápsides de AAV llenas” con respecto a AAV o cápsides de AAV o partículas de AAV se refiere a aquellas que contienen el genoma de vector completo. Las cápsides de AAV llenas pueden proporcionar un beneficio terapéutico a los pacientes receptores. Tal como se usa en el presente documento, el término “vacío” con respecto a AAV o cápsides de AAV o partículas de AAV se refiere a aquellas que carecen del genoma de vector completo (es decir, lleno). En determinadas realizaciones, “vacío” también puede incluir “ADN de vector incompleto” o “ADN de vector truncado”. Tales AAV vacíos o cápsides de AAV vacías o partículas de AAV vacías pueden carecer del genoma de vector en parte o en su totalidad, es decir, pueden estar parcialmente vacíos o completamente vacíos, y, como tal, son incapaces de proporcionar un beneficio terapéutico.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de separación de cápsides de AAV llenas a partir de cápsides de AAV vacías o un método de purificación de cápsides de AAV llenas a partir de una fracción de AAV concentrada que comprende cápsides de AAV llenas y cápsides de AAV vacías. En aspectos a modo de ejemplo,

los métodos de la presente divulgación comprenden (i) cargar en un rotor una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) con al menos dos disoluciones de azúcar, teniendo cada disolución de azúcar una concentración de azúcar diferente, (ii) hacer funcionar una ultracentrífuga que comprende el rotor cargado en modo discontinuo para formar un gradiente de azúcar, y (iii) obtener una fracción del gradiente de azúcar para obtener una fracción de AAV que comprende cápsides de AAV llenas. En determinadas realizaciones, se cargan al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, se cargan dos disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, se cargan tres disoluciones de azúcar.

El orden de secuencia de carga puede ser en primer lugar la fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) seguido de la concentración más baja de disolución de azúcar, luego seguido de la siguiente disolución de azúcar más concentrada, y así sucesivamente.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) con al menos dos disoluciones de azúcar, cada disolución de azúcar (a) tiene una concentración de azúcar diferente y (b) comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, el método comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa o desde aproximadamente el 55% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, otra disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 47 y el 53% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 54 y el 56% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 59 y el 61% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, otra disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 49 y el 51% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 54% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 59% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, otra disolución de azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 49% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa igual a o mayor de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa igual a o mayor de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, otra disolución de azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa igual a o mayor de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa.

En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, otra disolución de azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa.

El orden de secuencia de carga puede ser en primer lugar la fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) seguido de la concentración más baja de disolución de azúcar, luego seguido de la siguiente disolución de azúcar más concentrada (por ejemplo, en primer lugar la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 47 y el 53% (p/p) de sacarosa, si está presente, luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa, y luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa).

Una ventaja de las realizaciones con al menos una disolución de azúcar que comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa del 52-58% (p/p) de sacarosa, del 53-57% (p/p) de sacarosa o de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y con al menos otra disolución de azúcar que comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa del 57-63% (p/p) de sacarosa, del 58-62% (p/p) de sacarosa o de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa, es que los gradientes formados de tales disoluciones de azúcar pueden proporcionar una separación mejorada de las cápsides de AAV.

- En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) con al menos tres disoluciones de azúcar, cada disolución de azúcar (a) tiene una concentración de azúcar diferente y (b) comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, el método comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa.
- En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 47 y el 53% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa.
- En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 49 y el 51% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 54 y el 56% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 59 y el 61% (p/p) de sacarosa.
- En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 49% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 54% (p/p) de sacarosa, y al menos una disolución de azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa mayor de aproximadamente el 49% (p/p) de sacarosa.
- En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa igual a o mayor de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa igual a o mayor de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y al menos una disolución de azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa igual a o mayor de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa.
- En determinadas realizaciones, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa, al menos una disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución de azúcar comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa o aproximadamente el 60% (p/p).
- En determinadas realizaciones, el orden de secuencia de carga puede ser en primer lugar la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 47 y el 53% (p/p) de sacarosa, luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa, y luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa.
- El orden de secuencia de carga puede ser en primer lugar la fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) seguido de la concentración más baja de disolución de azúcar, luego seguido de la siguiente disolución de azúcar más concentrada (por ejemplo, en primer lugar la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 47 y el 53% (p/p) de sacarosa, luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa, y luego la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa).
- En aspectos a modo de ejemplo, cada una de la fracción de AAV y/o las disoluciones de azúcar puede comprender componentes adicionales, por ejemplo, agentes tamponantes, sales, y similares. En determinadas realizaciones, cada una de la fracción de AAV y/o las disoluciones de azúcar comprende, individualmente, cualquier sustancia tampón o combinaciones de las mismas para estabilizar el pH desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 8,5. En la técnica se conocen bien ejemplos de agentes tamponantes aceptables, e incluyen, sin limitación, tampones fosfato, histidina (por ejemplo, L-histidina), citrato de sodio, HEPES, Tris, bicina, glicina, N-glicilglicina, acetato de sodio, carbonato de sodio, glicilglicina, lisina, arginina, fosfato de sodio, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el tampón es Tris-HCl o Tris-HCl/NaCl. El pH del tampón/fracción/disolución puede ser de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 ó 9,0. El pH del tampón/fracción/disolución puede ser de desde 7,0 hasta 9,0, desde 7,1 hasta 8,9, desde 7,2 hasta 9,0, desde 7,0 hasta 8,8, desde 7,2 hasta 8,8, desde 7,1 hasta 8,6, desde 7,3 hasta 8,9, desde 7,4 hasta 9,0 o desde 7,4 hasta 8,5. En determinadas realizaciones, cada uno del tampón, la

fracción de AAV y/o las disoluciones de azúcar tiene, individualmente, un pH de aproximadamente 7,4. En determinadas realizaciones, cada uno del tampón, la fracción de AAV y/o las disoluciones de azúcar tiene, individualmente, un pH de aproximadamente 8,0. En determinadas realizaciones, cada uno del tampón, la fracción de AAV y/o las disoluciones de azúcar tiene, individualmente, un pH de aproximadamente 8,5.

En determinadas realizaciones, el tampón puede ser Tris-HCl/NaCl. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM o aproximadamente 100 mM. En determinadas realizaciones, el NaCl está a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 750 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM o de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de NaCl es de aproximadamente 100 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 136 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 225 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 275 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 325 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 375 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 425 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 475 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 525 mM, aproximadamente 550 mM, aproximadamente 575 mM, aproximadamente 600 mM, aproximadamente 625 mM, aproximadamente 650 mM, aproximadamente 675 mM, aproximadamente 700 mM, aproximadamente 725 mM, aproximadamente 750 mM, aproximadamente 775 mM, aproximadamente 800 mM, aproximadamente 825 mM, aproximadamente 850 mM, aproximadamente 875 mM, aproximadamente 900 mM, aproximadamente 925 mM, aproximadamente 950 mM, aproximadamente 975 mM o aproximadamente 1 M. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 750 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM o de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 500 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 20 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 136 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, el tampón es un tampón Tris-HCl/NaCl con un pH de aproximadamente 7,4. En determinadas realizaciones, el tampón es un tampón Tris-HCl/NaCl con un pH de aproximadamente 8,0. En determinadas realizaciones, el tampón es un tampón Tris-HCl/NaCl con un pH de aproximadamente 8,5.

En determinadas realizaciones, la disolución de fracción de AAV comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a 500 mM a un pH de 8,5. En determinadas realizaciones, la disolución de fracción de AAV comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a 750 mM a un pH de 8,0. En determinadas realizaciones, las disoluciones de azúcar comprenden Tris-HCl a aproximadamente 20 mM y NaCl a 136 mM a un pH de 7,4.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) que comprende una disolución tamponada de etilenglicol y al menos dos disoluciones de azúcar, cada disolución de azúcar (a) tiene una concentración de azúcar diferente y (b) comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, el método comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa o desde aproximadamente el 55% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. El intervalo de concentraciones de azúcar es el mismo que se enumeró anteriormente. Una ventaja de usar la disolución tamponada de etilenglicol es que pueden crearse gradientes poco profundos. Sin querer restringirse a una teoría, la disolución de etilenglicol puede cambiar las propiedades de viscosidad y/o densidad de la matriz de ultracentrifugación. Se halló sorprendentemente que la adición de etilenglicol en combinación con un tiempo de procesamiento aumentado crea un gradiente poco profundo, que permite la separación de las cápsidas llenas a partir de las cápsidas vacías que contienen ADN de vector más pequeño (por ejemplo, ≤ 3 kb o ≤ 5 kb) a partir de las cápsidas vacías. Tal como se usa en el presente documento, un "gradiente poco profundo" es uno en el que la densidad de disolución o la concentración de soluto formador de gradiente cambia (por ejemplo, gradiente de sacarosa) gradualmente en función de la distancia. Este es opuesto a uno en el que la densidad de disolución o la concentración de soluto formador de gradiente cambia rápidamente en función de la distancia. Por ejemplo, un AAV con un vector de ADN que tiene de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5,0 kb puede resolverse de manera más eficiente cuando el tampón de carga comprende disolución de etilenglicol a de aproximadamente el 45% a aproximadamente el 55%. En determinadas realizaciones, el uso de etilenglicol en la disolución de fracción de AAV permite la separación de un vector de ADN que tiene entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,0 kb. En determinadas realizaciones, el método permite una mayor resolución de un vector de ADN que tiene aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3,

aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9 o aproximadamente 5,0 kb. En determinadas realizaciones, la resolución potenciada se produce con una disolución de azúcar con al menos tres concentraciones de azúcar diferentes. En determinadas realizaciones, la resolución potenciada se produce con una disolución de azúcar con al menos dos concentraciones de azúcar diferentes. En determinadas realizaciones, la resolución potenciada se produce con una disolución de azúcar con al menos dos concentraciones de azúcar con dos concentraciones de azúcar diferentes. En determinadas realizaciones, la resolución potenciada se produce cuando se usa una disolución de azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa del 52-58% (p/p) de sacarosa, del 53-57% (p/p) de sacarosa o de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución de azúcar que comprende azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa del 57-63% (p/p) de sacarosa, del 58-62% (p/p) de sacarosa o de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) con una disolución tamponada de etilenglicol y al menos tres disoluciones de azúcar, cada disolución de azúcar (a) tiene una concentración de azúcar diferente y (b) comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, el método comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. El intervalo de concentraciones de azúcar es el mismo que se enumeró anteriormente.

La disolución tamponada de etilenglicol puede comprender cualquier sustancia tampón o combinaciones de las mismas para estabilizar el pH desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 8,5. En la técnica se conocen bien ejemplos de agentes tamponantes aceptables, e incluyen, sin limitación, tampones fosfato, histidina, citrato de sodio, HEPES, Tris, bicina, glicina, N-glicilglicina, acetato de sodio, carbonato de sodio, glicilglicina, lisina, arginina, fosfato de sodio, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el tampón es Tris-HCl o Tris-HCl/NaCl. El pH del tampón/disolución puede ser de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 ó 9,0. El pH del tampón/disolución puede ser de desde 7,0 hasta 9,0, desde 7,1 hasta 8,9, desde 7,2 hasta 9,0, desde 7,0 hasta 8,8, desde 7,2 hasta 8,8, desde 7,1 hasta 8,6, desde 7,3 hasta 8,9, desde 7,4 hasta 9,0 o desde 7,4 hasta 8,5. En determinadas realizaciones, el tampón/disolución tiene un pH de aproximadamente 7,4. En determinadas realizaciones, el tampón/disolución tiene un pH de aproximadamente 8,0. En determinadas realizaciones, el tampón/disolución tiene un pH de aproximadamente 8,5.

En determinadas realizaciones, la disolución tamponada de etilenglicol comprende Tris-HCl/NaCl. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM o aproximadamente 100 mM. En determinadas realizaciones, el NaCl está a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 750 mM o de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de NaCl es de aproximadamente 100 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 136 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 225 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 275 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 325 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 375 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 425 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 475 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 525 mM, aproximadamente 550 mM, aproximadamente 575 mM, aproximadamente 600 mM, aproximadamente 625 mM, aproximadamente 650 mM, aproximadamente 675 mM, aproximadamente 700 mM, aproximadamente 725 mM, aproximadamente 750 mM, aproximadamente 775 mM, aproximadamente 800 mM, aproximadamente 825 mM, aproximadamente 850 mM, aproximadamente 875 mM, aproximadamente 900 mM, aproximadamente 925 mM, aproximadamente 950 mM, aproximadamente 975 mM o aproximadamente 1 M. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 750 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM o de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 500 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 20 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 136 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, el tampón es un tampón Tris-HCl/NaCl con un pH de aproximadamente 7,4. En determinadas realizaciones, el tampón es un tampón Tris-HCl/NaCl con un pH de aproximadamente 8,0. En determinadas

realizaciones, el tampón es un tampón Tris-HCl/NaCl con un pH de aproximadamente 8,5.

La disolución tamponada de etilenglicol puede comprender desde el 45% hasta el 55% (p/p), desde el 46% hasta el 54% (p/p), desde el 45% hasta el 53% (p/p), desde el 47% hasta el 55% (p/p) o desde el 48% hasta el 52% (p/p) del tampón (por ejemplo, Tris-HCl/NaCl). La disolución tamponada de etilenglicol puede comprender el 40% (p/p), el 41% (p/p), el 42% (p/p), el 43% (p/p), el 44% (p/p), el 45% (p/p), el 46% (p/p), el 47% (p/p), el 48% (p/p), el 49% (p/p), el 50% (p/p), el 51% (p/p), el 52% (p/p), el 53% (p/p), el 54% (p/p), el 55% (p/p), el 56% (p/p), el 57% (p/p), el 58% (p/p), el 59% (p/p) o el 60% (p/p) del tampón (por ejemplo, Tris-HCl/NaCl). La disolución tamponada de etilenglicol puede ser acuosa.

En determinadas realizaciones, la disolución tamponada de etilenglicol comprende el 45-55% (p/p) de etilenglicol, Tris-HCl 50 mM y NaCl 750 mM a un pH de 8,0. En determinadas realizaciones, la disolución tamponada de etilenglicol comprende el 50% (p/p) de etilenglicol, Tris-HCl 50 mM y NaCl 750 mM a un pH de 8,0.

En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de desde aproximadamente 800 ml hasta aproximadamente 9000 ml. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de desde aproximadamente 800 ml hasta aproximadamente 7700 ml. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de aproximadamente 800 ml. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de aproximadamente 1600 ml. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de aproximadamente 3200 ml. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de aproximadamente 7700 ml.

En determinadas realizaciones, las disoluciones de azúcar se cargan con una velocidad de flujo constante. En determinadas realizaciones, la velocidad de flujo constante es de desde aproximadamente 0,25 l/h hasta aproximadamente 10 l/h o desde aproximadamente 1,5 l/h hasta aproximadamente 7 l/h. En determinadas realizaciones, la velocidad de flujo constante es de aproximadamente 0,25 l/h, aproximadamente 0,5 l/h, aproximadamente 0,75 l/h, aproximadamente 1 l/h, aproximadamente 1,25 l/h, aproximadamente 1,5 l/h, aproximadamente 1,75 l/h, aproximadamente 2 l/h, aproximadamente 2,5 l/h, aproximadamente 3 l/h, aproximadamente 3,5 l/h, aproximadamente 4 l/h, aproximadamente 4,5 l/h, aproximadamente 5 l/h, aproximadamente 5,5 l/h, aproximadamente 6 l/h, aproximadamente 6,5 l/h, aproximadamente 7 l/h, aproximadamente 7,5 l/h, aproximadamente 8 l/h, aproximadamente 8,5 l/h, aproximadamente 9 l/h, aproximadamente 9,5 l/h o aproximadamente 10 l/h.

En determinadas realizaciones, el método comprende cargar en un rotor aproximadamente el 45-55% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 45-55% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En realizaciones a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor aproximadamente el 50% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 50% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de desde aproximadamente 800 ml hasta aproximadamente 3200 ml y el rotor se carga con aproximadamente el 45-55% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 45-55% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de desde aproximadamente 800 ml hasta aproximadamente 3200 ml y el rotor se carga con aproximadamente el 50% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 50% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar en total. Por ejemplo, si el núcleo de rotor es de 800 ml, la fracción de AAV puede ser de 400 ml y la porción total de disolución de azúcar es de 400 ml.

En determinadas realizaciones, el método comprende cargar en un rotor aproximadamente el 65-85% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y el 15-35% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, el método comprende cargar en un rotor aproximadamente el 70-80% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 20-30% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En realizaciones a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor aproximadamente el 75% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 25% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de desde aproximadamente 7700 ml hasta aproximadamente 9000 ml y el rotor se carga con aproximadamente el 70-80% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 20-30% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de desde aproximadamente 7700 ml hasta aproximadamente 9000 ml y el rotor se carga con aproximadamente el 75% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 25% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. En determinadas realizaciones, el volumen del núcleo de rotor de ultracentrífuga es de desde aproximadamente 7700 ml hasta aproximadamente 9000 ml y el rotor se carga con aproximadamente el 74% (p/p) de una fracción de AAV (con o sin una disolución tamponada de etilenglicol) y aproximadamente el 26% (p/p) de las al menos dos disoluciones de azúcar. Por

ejemplo, si el núcleo de rotor es de 7700 ml, la fracción de AAV puede ser de 6100 ml y la porción total de disolución de azúcar puede ser de 1600 ml.

En determinadas realizaciones, las disoluciones de azúcar se añaden en volúmenes aproximadamente iguales. En determinadas realizaciones, el método comprende cargar al menos dos disoluciones de azúcar, y la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es igual al volumen de las otras disoluciones de azúcar en el rotor. En determinadas realizaciones, el método comprende cargar al menos dos disoluciones de azúcar, y la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es el doble del volumen de una de las otras disoluciones de azúcar en el rotor. En determinadas realizaciones, el método comprende cargar al menos dos disoluciones de azúcar, y la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es aproximadamente 1,6 veces o aproximadamente 2,6 veces el volumen de una de las otras disoluciones de azúcar en el rotor. En determinadas realizaciones, el método comprende cargar al menos dos disoluciones de azúcar, y la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es la mitad del volumen de una de las otras disoluciones de azúcar en el rotor. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es el doble del volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande, opcionalmente, en las que el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande es igual al volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar intermedia. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es aproximadamente 2,6 veces el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande, opcionalmente, en las que el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar intermedia es aproximadamente 1,6 veces el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es igual al volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande, opcionalmente, en las que el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande es la mitad del volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar intermedia. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es la mitad del volumen de la fracción de AAV. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es tres cuartas partes del volumen de la fracción de AAV. En determinadas realizaciones, la razón del volumen de las disoluciones de azúcar con respecto al volumen de la fracción de AAV es menor de o igual a uno.

En determinadas realizaciones, el método comprende cargar dos disoluciones de azúcar y la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es igual al volumen de la disolución de azúcar más grande en el rotor. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es la mitad del volumen de la fracción de AAV. En determinadas realizaciones, la razón del volumen de las disoluciones de azúcar con respecto al volumen de la fracción de AAV es menor de o igual a uno.

En determinadas realizaciones, el método comprende cargar tres disoluciones de azúcar y la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es al menos el doble del volumen de una de las otras dos disoluciones de azúcar en el rotor. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es el doble del volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande, opcionalmente, en las que el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande es igual al volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar intermedia. Por ejemplo, la disolución de azúcar con la disolución de azúcar más pequeña puede estar a un volumen de aproximadamente 750 ml a aproximadamente 900 ml o de aproximadamente 800 ml, la disolución de azúcar con una concentración de azúcar intermedia puede estar a un volumen de aproximadamente 350 ml a aproximadamente 450 ml o de aproximadamente 400 ml, y la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande puede estar a un volumen de aproximadamente 350 ml a aproximadamente 450 ml o de aproximadamente 400 ml. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es la mitad del volumen de la fracción de AAV. En determinadas realizaciones, la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más pequeña se carga en el rotor a un volumen que es tres cuartas partes del volumen de la fracción de AAV. En determinadas realizaciones, la razón del volumen de las disoluciones de azúcar con respecto al volumen de la fracción de AAV es menor de o igual a uno. En aspectos a modo de ejemplo, el rotor es un rotor zonal. En determinadas realizaciones, el volumen total de las disoluciones de azúcar y la fracción de AAV es menor de o igual al volumen del rotor zonal. En determinadas realizaciones, el volumen del volumen total de las disoluciones en el rotor zonal es de aproximadamente 800 ml a 9 l. En determinadas realizaciones, el volumen de las disoluciones de azúcar es mayor de o igual a aproximadamente el 50% del volumen del rotor zonal. Por ejemplo, el volumen de las disoluciones de azúcar es mayor de o igual a aproximadamente el 50% del volumen de un rotor zonal que tiene un volumen de menos de aproximadamente 3200 ml, por ejemplo, aproximadamente 3200 ml, aproximadamente 1600 ml o aproximadamente 800 ml. En determinadas realizaciones, el volumen de las disoluciones de azúcar es menor de o igual a aproximadamente el 25% del volumen del rotor zonal, por ejemplo, cuando se usa un núcleo de más del 7 l, por ejemplo, 7,7 l.

En determinadas realizaciones, la razón del volumen del gradiente de azúcar total con respecto al volumen de la fracción de AAV cargada en el rotor zonal es de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1:5. En algunas realizaciones, el volumen del gradiente de azúcar total con respecto al volumen de la fracción de AAV cargada en el rotor zonal es de aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:1,25, aproximadamente 1:1,5, aproximadamente 1:1,75, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:2,25, aproximadamente 1:2,5, aproximadamente 1:2,75, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:3,25, aproximadamente 1:3,5, aproximadamente 1:3,75, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:4,25, aproximadamente 1:4,5, aproximadamente 1:4,75 o aproximadamente 1:5.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor zonal la fracción de AAV concentrada con al menos dos disoluciones de azúcar, cada una de las cuales tiene una concentración de azúcar diferente y cada una de las cuales comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa (intervalos tal como se indicaron anteriormente), en el que (A) el volumen de las disoluciones de azúcar es mayor de o igual a aproximadamente el 50% del volumen del rotor zonal, (B) el volumen total de las disoluciones de azúcar y la fracción de AAV es menor de o igual al volumen del rotor zonal, (C) la razón del volumen de las disoluciones de azúcar con respecto al volumen de la fracción de AAV es menor de o igual a uno, o (D) una combinación de (A), (B) y (C). En determinadas realizaciones, el volumen del volumen total de las disoluciones en el rotor zonal es de aproximadamente 800 ml a 9 l. En determinadas realizaciones, el volumen de las disoluciones de azúcar es mayor de o igual a aproximadamente el 50% del volumen del rotor zonal. Por ejemplo, el volumen de las disoluciones de azúcar es mayor de o igual a aproximadamente el 50% del volumen de un rotor zonal que tiene un volumen de menos de aproximadamente 3200 ml, por ejemplo, aproximadamente 3200 ml, aproximadamente 1600 ml o aproximadamente 800 ml. En determinadas realizaciones, el volumen de las disoluciones de azúcar es menor de o igual a aproximadamente el 25% del volumen del rotor zonal, por ejemplo, cuando se usa un núcleo de más del 7 l, por ejemplo, 7,7 l.

En aspectos a modo de ejemplo, cada disolución de azúcar comprende un hidrato de carbono soluble o una mezcla de hidratos de carbono. En determinadas realizaciones, cada disolución de azúcar comprende un disacárido (por ejemplo, sacarosa, maltosa o lactosa) y/o un trisacárido. En determinadas realizaciones, la densidad de las disoluciones de azúcar es igual a la densidad de las disoluciones de sacarosa con una concentración que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p). En determinadas realizaciones, al menos una de las disoluciones de azúcar tiene una densidad que es igual a aproximadamente el 60% sacarosa a una temperatura dada. En determinadas realizaciones, los intervalos son tal como se recitaron anteriormente.

Para los propósitos en el presente documento, puede usarse un azúcar distinto de sacarosa siempre que el azúcar en la disolución de azúcar tenga una concentración equivalente a una concentración de sacarosa dentro del intervalo especificado o a la cantidad específica (% (p/p)). La concentración de sacarosa puede determinarse mediante un método de índice de refracción, que determina el contenido de azúcar de una disolución acuosa en grados Brix ("°Bx"), en el que un grado Brix es 1 gramo de sacarosa en 100 gramos de disolución. Los grados Brix representan la fuerza de la disolución como porcentaje en masa; si la disolución contiene sólidos disueltos distintos de sacarosa pura, entonces °Bx sólo se aproxima al contenido de sólidos disueltos. La concentración de sacarosa también puede determinarse mediante medición de densidad, en el caso de disoluciones puras. Si es necesaria una determinación tanto de la densidad como de la concentración, puede aplicarse un kit enzimático disponible comercialmente para determinar la concentración y discriminar la sacarosa de los otros disacáridos e hidratos de carbono. Puede usarse un kit de ensayo de sacarosa, tal como el comercializado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) con el número de catálogo SCA20.

En aspectos a modo de ejemplo, cada disolución de azúcar comprende sacarosa. En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor (por ejemplo, un rotor zonal) una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) con al menos dos disoluciones de sacarosa, cada disolución de sacarosa (a) tiene una concentración de sacarosa diferente y (b) comprende sacarosa a una concentración que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 47 y el 53% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 54 y el 56% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 59 y el 61% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 49 y el 51% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración mayor de aproximadamente el 54% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración mayor de aproximadamente el 59% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración mayor de aproximadamente el 49% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, al

menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, la disolución que comprende AAV es una disolución tamponada (por ejemplo, tampón Tris-HCl/NaCl). En determinadas realizaciones, la disolución que comprende AAV es una disolución tamponada de etilenglicol tal como se describió anteriormente. En determinadas realizaciones, la disolución tamponada de etilenglicol es una disolución acuosa que comprende el 45-55% (p/p) de etilenglicol y un tampón que comprende Tris-HCl y NaCl. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM. En determinadas realizaciones, el NaCl está a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 750 mM o de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM. En determinadas realizaciones, el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM y el NaCl está a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 750 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM o de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, el pH de la disolución que comprende AAV es de desde 7,4 hasta 8,5, desde 7,6 hasta 8,3, desde 7,8 hasta 8,5, desde 7,4 hasta 7,8, desde 7,6 hasta 8,0, desde 7,8 hasta 8,2 o desde 8,0 hasta 8,5.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor (por ejemplo, un rotor zonal) una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) con al menos dos disoluciones de sacarosa, cada disolución de sacarosa (a) tiene una concentración de sacarosa diferente y (b) comprende sacarosa a una concentración que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 54 y el 56% (p/p) de sacarosa y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 59 y el 61% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración mayor de aproximadamente el 54% (p/p) de sacarosa y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración mayor de aproximadamente el 59% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa y al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa y al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, la disolución que comprende AAV es una disolución tamponada (por ejemplo, tampón Tris-HCl/NaCl). En determinadas realizaciones, la disolución que comprende AAV es una disolución tamponada de etilenglicol tal como se describió anteriormente.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en un rotor (por ejemplo, un rotor zonal) una fracción de AAV (por ejemplo, una disolución que comprende AAV) con al menos tres disoluciones de sacarosa, cada disolución de sacarosa (a) tiene una concentración de sacarosa diferente y (b) comprende sacarosa a una concentración que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa, opcionalmente que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p). En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 47 y el 53% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 52 y el 58% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 57 y el 63% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 49 y el 51% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 54 y el 56% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración de entre el 59 y el 61% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración mayor de aproximadamente el 49% (p/p) de sacarosa, al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración mayor del 54% (p/p) de sacarosa, y al menos otra disolución comprende sacarosa a una concentración mayor de aproximadamente el 59% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a o mayor de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa, al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y al menos una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En determinadas realizaciones, la disolución que comprende AAV es una disolución tamponada (por ejemplo, tampón Tris-HCl/NaCl). En determinadas realizaciones, la disolución que comprende AAV es una disolución tamponada de etilenglicol tal como se describió anteriormente.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende cargar en el rotor (por ejemplo, rotor zonal) tres, cuatro,

cinco, seis o más disoluciones de sacarosa, cada disolución de sacarosa (a) tiene una concentración de sacarosa diferente y (b) comprende sacarosa a una concentración que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) de sacarosa, opcionalmente que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p), u opcionalmente que oscila desde aproximadamente el 55% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p). Los intervalos completos de concentraciones de sacarosa son tal como se enumeraron anteriormente con respecto a los intervalos de disoluciones de azúcar. La razón de disoluciones de sacarosa con respecto a la fracción de AAV y/u otras disoluciones de azúcar es tal como se enumeró anteriormente.

En aspectos a modo de ejemplo, el volumen de la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más baja y el volumen de la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más alta son de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30% y de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30% del volumen del rotor, respectivamente. En determinadas realizaciones, el volumen de la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más baja, el volumen de la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa intermedia y el volumen de la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más alta son cada uno de aproximadamente el 25% del volumen del rotor. En aspectos a modo de ejemplo, el volumen de la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más baja, la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa intermedia y la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más alta son de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 15% y de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 15% del volumen del rotor, respectivamente. En determinadas realizaciones, el volumen de la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más baja, la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa intermedia y la disolución de sacarosa con la concentración de sacarosa más alta son de aproximadamente el 25%, aproximadamente el 12,5% y aproximadamente el 12,5% del volumen del rotor, respectivamente. En determinadas realizaciones, el volumen de núcleo de ultracentrifugación o el volumen del rotor está dentro de un intervalo de aproximadamente 200 ml a aproximadamente 10.000 ml, dentro de un intervalo de aproximadamente 700 ml a aproximadamente 8500 ml o dentro de un intervalo de aproximadamente 700 ml a aproximadamente 7.700 ml.

Hay disponibles una amplia variedad de núcleos de ultracentrifugación y son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el núcleo de ultracentrifugación más pequeño disponible es el núcleo CC40S de 200 ml de Hitachi, mientras que el núcleo más grande es el núcleo CC40 de 8.000 ml Hitachi. Pueden usarse el núcleo CC40CT3 Core E y todos los demás núcleos y ultracentrifugas de flujo continuo de otros proveedores.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende hacer funcionar una ultracentrifuga que comprende el rotor (por ejemplo, rotor zonal) en modo discontinuo, mediante lo cual se forma un gradiente de azúcar. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una primera velocidad de rotación de menos de 10.000 rpm. En determinadas realizaciones, la primera velocidad de rotación es de aproximadamente 3.000 rpm a aproximadamente 6.000 rpm (por ejemplo, 4.000 rpm o 5.000 rpm) y la primera velocidad de rotación se logra en el plazo de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 minutos. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una primera velocidad de rotación a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 10°C. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a la primera velocidad de rotación con el propósito de lograr en última instancia una mayor velocidad de rotación. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se acelera hasta una segunda velocidad de rotación, que es al menos 2X o al menos 3X mayor que la primera velocidad de rotación. En determinadas realizaciones, la segunda velocidad de rotación se logra tras acelerar la ultracentrifuga durante de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 min. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una segunda velocidad de rotación mayor de o de aproximadamente 30.000 rpm. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una segunda velocidad de rotación mayor de o de aproximadamente 30.000 rpm y menor de o de aproximadamente 50.000 rpm. En determinadas realizaciones, la segunda velocidad de rotación es de entre aproximadamente 30.000 rpm y aproximadamente 40.000 rpm, por ejemplo, aproximadamente 35.000 rpm. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una segunda velocidad de rotación durante al menos o aproximadamente 3 horas, al menos o aproximadamente 4 horas, al menos o aproximadamente 5 horas, o al menos o aproximadamente 6 horas, al menos o aproximadamente 10 horas, al menos o aproximadamente 12 horas, al menos o aproximadamente 14 horas, al menos o aproximadamente 16 horas, al menos o aproximadamente 18 horas, al menos o aproximadamente 20 horas, o al menos o aproximadamente 22 horas. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una segunda velocidad de rotación durante al menos o aproximadamente 4 horas. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una segunda velocidad de rotación durante de aproximadamente 16 a aproximadamente 20 horas. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una segunda velocidad de rotación durante al menos o aproximadamente 16 horas. En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar a una segunda velocidad de rotación a una temperatura de entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 30°C, por ejemplo, al menos aproximadamente 18°C, entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 25°C (por ejemplo, aproximadamente 22°C). En determinadas realizaciones, la ultracentrifuga se hace funcionar posteriormente para decelerar la velocidad de rotación, por ejemplo, hasta la primera velocidad de rotación, por ejemplo, aproximadamente 4.000 rpm, opcionalmente, durante el transcurso de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 minutos. En determinadas realizaciones, la deceleración se produce a una temperatura menor de aproximadamente 18°C, entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 10°C, o menor de aproximadamente 8°C. En determinadas realizaciones,

la ultracentrífuga se hace funcionar a una temperatura menor de aproximadamente 8°C durante al menos 30 minutos antes de detener la ultracentrífuga.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende obtener una fracción del gradiente de azúcar para obtener una fracción de AAV. En determinadas realizaciones, la fracción de AAV obtenida tiene más del 60% de cápsides llenas. En determinadas realizaciones, la fracción de AAV obtenida tiene el 70-80% de cápsides llenas. En determinadas realizaciones, se obtienen una o más fracciones del gradiente de azúcar, y, en determinadas realizaciones, las fracciones se obtienen a partir del gradiente que contiene fracciones de mayor densidad. En determinadas realizaciones, se obtienen las fracciones equivalentes a las fracciones 7-11 tal como se muestra en la figura 8. En determinadas realizaciones, se obtienen las fracciones equivalentes a las fracciones 10-14 tal como se describe en el ejemplo 9. En determinadas realizaciones, se obtienen las fracciones equivalentes a las fracciones 1-8 tal como se describe en el ejemplo 16. En determinadas realizaciones, se separa cualquier fracción que contiene cápsides llenas a partir de la de cápsides vacías mediante su diferencia de densidad a medida que eluye a partir del rotor en el gradiente de densidad. El control de la separación puede lograrse o bien mediante fraccionamiento en volúmenes pequeños mediante pruebas analíticas [por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 9] o bien mediante fraccionamiento según las señales de UV a partir de la medición en línea de las señales de UV (por ejemplo, señales de UV a 254 nm/UV a 280 nm y control en línea de su razón). En determinadas realizaciones, la fracción de AAV se obtiene a partir de la zona con mayor densidad de sacarosa en la etapa de ultracentrifugación. En determinadas realizaciones, se confirma que la fracción de AAV (por ejemplo, AAV8) obtenida tiene principalmente cápsides llenas (por ejemplo, >60% de cápsides llenas) mediante la razón de [la señal de UV a 254 nm]/[la señal de UV a 280 nm] independientemente del volumen del núcleo de UC usado. Si esta razón (DO 254 nm/DO 280 nm) > 1, entonces la fracción tiene cápsides llenas.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de las presentes divulgaciones producen un producto de AAV en el que al menos el 50% de las cápsides de AAV son cápsides de AAV llenas. En determinadas realizaciones, los métodos de las presentes divulgaciones producen un producto de AAV en el que al menos el 55% de las cápsides de AAV son cápsides de AAV llenas. En determinadas realizaciones, los métodos de las presentes divulgaciones producen un producto de AAV en el que al menos el 60% de las cápsides de AAV son cápsides de AAV llenas. En determinadas realizaciones, los métodos de las presentes divulgaciones producen un producto de AAV en el que al menos el 70% de las cápsides de AAV son cápsides de AAV llenas. En determinadas realizaciones, los métodos de las presentes divulgaciones producen un producto de AAV en el que al menos el 80% de las cápsides de AAV son cápsides de AAV llenas. En determinadas realizaciones, los métodos de las presentes divulgaciones producen un producto de AAV en el que al menos el 90% de las cápsides de AAV son cápsides de AAV llenas. Se apreciará que “al menos el 50%” se refiere a un intervalo en el que el 50% es el porcentaje mínimo. El porcentaje máximo de un intervalo de este tipo es, en diversas realizaciones, del 100%, aunque en el presente documento también se contemplan subintervalos en los que el porcentaje máximo es, por ejemplo, el 99%, el 98%, el 95%, el 80%, el 85%, y similares. En la técnica se conocen métodos adecuados para medir la cantidad de cápsides llenas frente a cápsides vacías, e incluyen, por ejemplo, microscopía electrónica de transmisión de tinción negativa y cromatografía analítica de intercambio aniónico usando una configuración de detección que permite la discriminación entre cápsides llenas y vacías. Véanse, por ejemplo, Lock *et al.*, Human Gene Ther Part B 2356-64 (2012); y Qu *et al.*, J Virol Methods 140:183-192 (2007).

En aspectos a modo de ejemplo, las disoluciones de azúcar (por ejemplo, sacarosa) difieren en cuanto a concentración en de aproximadamente el 5% (p/p) a aproximadamente el 15% (p/p). En determinadas realizaciones, las disoluciones de azúcar difieren en cuanto a concentración equivalente de sacarosa en de aproximadamente el 5% (p/p) a aproximadamente el 10% (p/p), de aproximadamente el 4% (p/p) a aproximadamente el 8% (p/p) o de aproximadamente el 2% (p/p) a aproximadamente el 3% (p/p). En determinadas realizaciones, las disoluciones de azúcar comprenden sacarosa y difieren en cuanto a concentración de sacarosa en de aproximadamente el 5% (p/p) a aproximadamente el 10% (p/p), de aproximadamente el 4% (p/p) a aproximadamente el 8% (p/p) o de aproximadamente el 2% (p/p) a aproximadamente el 3% (p/p).

En aspectos a modo de ejemplo, el método de purificación de partículas de virus adenoasociado recombinante (AAVr) y/o el método de separación de partículas virales llenas a partir de las cápsides vacías comprende someter a ultracentrifugación una fracción que comprende partículas de AAVr con dos disoluciones de sacarosa, comprendiendo cada disolución de sacarosa una concentración de sacarosa diferente, que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p) a una primera velocidad de rotación de menos de 10.000 rpm (por ejemplo, 4.000 rpm) durante de aproximadamente 15 min a aproximadamente 45 min o de aproximadamente 17 min a aproximadamente 25 min, y a una segunda velocidad de rotación dentro del intervalo de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 40.000 rpm (por ejemplo, 35.000 rpm) durante al menos 4 horas o de aproximadamente 16 a aproximadamente 20 horas. En determinadas realizaciones, una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa y una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de ultracentrifugación se lleva a cabo tal como se describe esencialmente en el ejemplo 6.

En aspectos a modo de ejemplo, el método de purificación de partículas de virus adenoasociado recombinante (AAVr) y/o el método de separación de partículas virales llenas a partir de las cápsides vacías comprende someter a

ultracentrifugación una fracción que comprende partículas de AAVr con tres disoluciones de sacarosa, comprendiendo cada disolución de sacarosa una concentración de sacarosa diferente, que oscila desde aproximadamente el 45% (p/p) hasta aproximadamente el 65% (p/p), a una primera velocidad de rotación de menos de 10.000 rpm (por ejemplo, 4.000 rpm) durante de aproximadamente 15 min a aproximadamente 45 min o de aproximadamente 17 min a aproximadamente 25 min, y a una segunda velocidad de rotación dentro del intervalo de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 40.000 rpm (por ejemplo, 35.000 rpm) durante al menos 4 horas o de aproximadamente 16 a aproximadamente 20 horas. En determinadas realizaciones, una disolución comprende sacarosa a una concentración igual a aproximadamente el 50% (p/p) de sacarosa, una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 55% (p/p) de sacarosa, y una disolución comprende sacarosa a una concentración de aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de ultracentrifugación se lleva a cabo tal como se describe esencialmente en los ejemplos 7 ó 9.

Fuente de partículas de AAVr

Con respecto a los métodos de la presente divulgación, el AAV puede ser de cualquier serotipo de AAV. En determinadas realizaciones, el AAV purificado mediante los métodos descritos en el presente documento es de serotipo AAV1, serotipo AAV2, serotipo AAV3, serotipo AAV4, serotipo AAV5, serotipo AAV6, serotipo AAV7, serotipo AAV8, serotipo AAV9 o serotipo AAV10. En determinadas realizaciones, las partículas de AAV purificadas mediante los métodos descritos en el presente documento son de serotipo AAV8. Con respecto a los métodos de la invención, la fracción de AAV que se carga en el rotor es, en aspectos a modo de ejemplo, una fracción de AAV concentrada. En determinadas realizaciones, la fracción de AAV cargada en el rotor comprende al menos 1×10^{10} , 1×10^{11} ó 1×10^{12} cápsides de AAV por ml. En determinadas realizaciones, la fracción de AAV cargada en el rotor comprende al menos 1×10^{12} cápsides de AAV por ml, en la que las cápsides de AAV incluyen cápsides de AAV vacías y cápsides de AAV llenas.

En determinadas realizaciones, la fracción de AAV representa una fracción de AAV producida por células huésped transfectadas. En determinadas realizaciones, la fracción de AAV representa un sobrenadante recogido a partir de un cultivo celular que comprende células huésped transfectadas con un sistema plasmídico triple, en el que un plásmido del sistema comprende un gen o ADNc de interés, un plásmido codifica para la proteína de la cápside VP1, la proteína de la cápside VP2 y/o la proteína de la cápside VP3. En determinadas realizaciones, VP1, VP2 y/o VP3 son VP1 de AAV8, VP2 de AAV8 y/o VP3 de AAV8. En la técnica se conoce la transfección con triple plásmido con el propósito de la producción de AAVr. Véanse, por ejemplo, Qu *et al.*, 2015, citado anteriormente, y Mizukami *et al.*, "A Protocol for AAV vector production and purification". Tesis doctoral, División de Terapia Genética, Centro de Medicina Molecular, 1998; y Kotin *et al.*, Hum Mol Genet 20(R1): R2-R6 (2011). En determinadas realizaciones, la transfección puede llevarse a cabo usando compuestos inorgánicos, por ejemplo, fosfato de calcio, o compuestos orgánicos, polietilenimina (PEI), o medios no químicos, por ejemplo, electroporación.

En determinadas realizaciones, las células huésped son células adherentes. En determinadas realizaciones, las células huésped son células en suspensión. En determinadas realizaciones, las células huésped son células HEK293 o células Sf9 (por ejemplo, células Sf9 infectadas con baculovirus). En determinadas realizaciones, el cultivo celular comprende medio de cultivo que está libre de suero y proteínas. En determinadas realizaciones, el medio está definido químicamente y está libre de componentes de origen animal, por ejemplo, hidrolizados.

En determinadas realizaciones, la fracción que comprende partículas de AAVr representa una fracción que comprende células HEK293 transfectadas con un sistema plasmídico triple. En determinadas realizaciones, la fracción que comprende partículas de AAVr representa una fracción de un sobrenadante recogido de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días después de la transfección de las células HEK293 o cuando el cultivo celular tiene una densidad celular de más de o aproximadamente 5×10^6 células/ml y tiene una viabilidad celular de más de o aproximadamente el 50%. En determinadas realizaciones, la fracción que comprende partículas de AAVr representa una fracción que comprende células HEK293 tal como se describe en el ejemplo 1.

En determinadas realizaciones, el AAV se prepara mediante una transfección con triple plásmido seguido de una recogida desde uno hasta 5 días más tarde. En determinadas realizaciones, el AAV se prepara a partir de disrupción celular.

En determinadas realizaciones, el AAV se prepara de la siguiente manera: las células HEK293 son adherentes y se hacen crecer en un medio de cultivo disponible comercialmente que puede estar definido químicamente y puede estar libre de componentes de origen animal, por ejemplo, suero y proteínas. Las células se cultivan hasta una densidad celular de aproximadamente 3×10^6 a aproximadamente 12 células/ml, por ejemplo, de aproximadamente 6×10^6 a aproximadamente 10 células/ml. Luego se reparten las células en una razón de aproximadamente 1:2 de manera que la densidad celular es de aproximadamente $3-5 \times 10^6$ células/ml. Después del reparto, las células pueden transfectarse con tres plásmidos que incluyen (1) un plásmido auxiliar capaz de proporcionar una o más funciones virales auxiliares esenciales para la producción de AAV, (2) un plásmido que codifica para uno o más genes implicados en la generación de cápsides, la replicación y el empaquetamiento del virus y (3) un plásmido que comprende un gen de interés (GDI) que va a empaquetarse en la partícula de AAVr resultante. Por ejemplo, el GDI puede ser un ADN de vector que comprende factor de coagulación humano IX Padua en forma monocatenaria y

autocomplementaria, teniendo el ADN de vector una longitud completa de 2,6 kB. Como otro ejemplo, el GDI puede ser un ADN de vector que comprende factor de coagulación humano IX Padua en forma bicatenaria y autocomplementaria, teniendo el ADN de vector una longitud completa de 4,8 kB. Como otro ejemplo, el GDI puede ser un ADN de vector que comprende un factor de coagulación humano VIII con delección del dominio B en forma monocatenaria y autocomplementaria, teniendo el ADN de vector una longitud completa de 4,8 kB. Puede usarse otro GDI. La transfección puede llevarse a cabo de manera transitoria, tal como mediante el uso de polímeros catiónicos. Antes de la elución, puede cultivarse la línea celular HEK293 durante al menos aproximadamente 3 días, por ejemplo, 3-5 días, antes de la recogida.

10 Etapas adicionales

Los métodos de la presente divulgación comprenden cualquier combinación de etapas divulgadas en el presente documento, y opcionalmente pueden combinarse con una o más etapas adicionales. Por consiguiente, en aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden además la etapa de transfectar células huésped con un sistema plasmídico triple tal como se describe en el presente documento. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden recoger un sobrenadante a partir de un cultivo celular que comprende células huésped, por ejemplo, células HEK293 o Sf9 (por ejemplo, células Sf9 infectadas con baculovirus), transfectadas con un sistema plasmídico triple. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden recoger el sobrenadante de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días después de la transfección de las células HEK293 o cuando el cultivo celular tiene una densidad celular de más de o aproximadamente 5×10^6 células/ml y tiene una viabilidad celular de más del 50%. En determinadas realizaciones, el AAV se prepara mediante disrupción celular. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de transfección y recogida tiene lugar antes de la etapa de ultracentrifugación descrita en el presente documento. Los métodos de la presente divulgación pueden comprender aún otras etapas adicionales, que pueden aumentar adicionalmente la pureza del AAV y retirar otros componentes no deseados y/o concentrar la fracción y/o acondicionar la fracción para una etapa posterior. Las etapas adicionales pueden tener lugar antes o después de la etapa de ultracentrifugación descrita anteriormente.

En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende una etapa de filtración de profundidad. En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende someter una fracción de un sobrenadante de cultivo de células HEK293 transfectadas a filtración de profundidad usando un filtro que comprende celulosa y perlitas y que tiene una permeabilidad mínima de aproximadamente 500 l/m^2 . En aspectos a modo de ejemplo, el método comprende además el uso de un filtro que tiene un tamaño de poro mínimo de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$. En aspectos a modo de ejemplo, a la filtración de profundidad le sigue una filtración a través del filtro que tiene un tamaño de poro mínimo de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$. En aspectos a modo de ejemplo, se lavan uno o ambos del filtro de profundidad y el filtro que tiene un tamaño de poro mínimo de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$ y se recogen las fracciones de lavado. En aspectos a modo de ejemplo, se agrupan las fracciones de lavado y se combinan con el filtrado obtenido tras la filtración de profundidad y la filtración con el filtro que tiene un tamaño de poro mínimo de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$. El ejemplo 2 proporciona un ejemplo de método de filtración de profundidad y filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro mínimo de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de filtración de profundidad y la otra etapa de filtración tienen lugar antes de la etapa de ultracentrifugación descrita en el presente documento.

En determinadas realizaciones, la recogida se lleva a cabo de la siguiente manera: en este momento se recoge el sobrenadante del cultivo celular mediante filtración de profundidad, por ejemplo, filtrando de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 l de suspensión celular que contiene AAV a través de un elemento de filtro de profundidad y un elemento de polietersulfona. La velocidad de flujo puede ser de desde aproximadamente 40 kg/hora hasta aproximadamente 280 kg/hora o desde aproximadamente 60 kg/hora hasta 240 kg/hora. La presión total es menor de 1,7 bar. Los dos filtros se lavan con de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 l de tampón solución salina tamponada con Tris (TBS). Luego se recoge el caldo de fermentación filtrado o la fracción recogida. El procedimiento de filtración de profundidad puede retirar al menos el 70% de la proteína y el 60% de ADN de células HEK293, mientras que conserva al menos el 60% del 65% de las partículas de AAV.

En determinadas realizaciones, la fracción recogida que contiene la fracción de AAV se somete a ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) y TFF para concentrar y acondicionar la fracción recogida de la siguiente manera: se concentra la fracción recogida de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces hasta un volumen objetivo de aproximadamente 10 l a aproximadamente 15 l usando TFF. Luego se somete la fracción recogida concentrada a dos etapas de diafiltración para acondicionar la fracción recogida concentrada a un pH de aproximadamente 8,3 a aproximadamente 8,7 y una conductividad de aproximadamente 13 mS/cm a aproximadamente 17 mS/cm . Cada etapa de diafiltración puede realizarse mediante un intercambio de volumen de 5 veces con un tampón de diafiltración, por ejemplo, el primer tampón comprende TRIS 50 mM y NaCl 500 mM, que tiene un pH de $8,5 \pm 0,2$, y a 25°C , y el segundo tampón comprende TRIS 50 mM y NaCl 125 mM, que tiene un pH de $8,5 \pm 0,2$, y a 25°C . Luego se lleva a cabo TFF para concentrar la fracción retenida hasta un volumen objetivo final de aproximadamente 8 l a aproximadamente 12 l. Luego se filtra el concentrado a través de un elemento de filtro de $0,2 \mu\text{m}$. El rendimiento de AAV puede aumentar al lavar el elemento de filtro con de aproximadamente 1,5 a

aproximadamente 2,5 del segundo tampón de diafiltración.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden una o más etapas de cromatografía. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos comprenden una etapa de cromatografía negativa mediante la cual los componentes no deseados se unen a la resina de cromatografía y el AAV deseado no se une a la resina de cromatografía. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos comprenden una etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) negativa o una etapa de cromatografía de AEX en "modo sin unión". El ejemplo 4 describe una etapa de este tipo. Por consiguiente, en realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de purificación de partículas de AAV comprenden realizar cromatografía de intercambio aniónico (AEX) negativa a una fracción que comprende partículas de AAV aplicando la fracción a una membrana o columna de cromatografía de AEX en condiciones que permitan que el AAV fluya a través de la membrana o columna de cromatografía de AEX y recoger las partículas de AAV. En aspectos a modo de ejemplo, la fracción se aplica a la membrana o columna de cromatografía de AEX con un tampón de carga que comprende sal, por ejemplo, NaCl, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM, opcionalmente, en el que el pH del tampón de carga es de aproximadamente 8 a aproximadamente 9. En aspectos a modo de ejemplo, el tampón de carga comprende sal, por ejemplo, NaCl, de aproximadamente 115 mM a aproximadamente 130 mM, opcionalmente, en el que el tampón de carga comprende sal, por ejemplo, NaCl, de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 125 mM. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de AEX negativa tiene lugar antes de la etapa de ultracentrifugación descrita en el presente documento.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden concentrar una fracción de AAV usando un sistema de ultra/diafiltración. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden una o más etapas de filtración de flujo tangencial (TFF). En aspectos a modo de ejemplo, la fracción de AAV se somete a ultra/diafiltración. En aspectos a modo de ejemplo, la fracción de AAV se concentra con el sistema de ultra/diafiltración antes de una etapa que comprende realizar cromatografía de AEX negativa, después de una etapa que comprende realizar cromatografía de AEX negativa, o antes y después que comprende realizar cromatografía de AEX negativa. Los ejemplos 3 y 5 describen tales etapas de TFF. En aspectos a modo de ejemplo, las etapas de TFF tienen lugar antes de la etapa de ultracentrifugación descrita en el presente documento.

En determinadas realizaciones, se realiza una etapa de TFF adicional después de la cromatografía de AEX negativa de la siguiente manera: se concentra la fracción no retenida que contiene AAV obtenida a partir de la cromatografía de AEX y se somete a diafiltración frente a un tampón, por ejemplo, uno que comprende NaCl a aproximadamente 500 mM, Tris-HCl a aproximadamente 50 mM; a un pH de aproximadamente 8,3 a aproximadamente 8,7, para acondicionar el producto para la ultracentrifugación. Luego se lleva a cabo una etapa de TFF.

En determinadas realizaciones, las partículas de AAV vacías y llenas se separan entre sí mediante ultracentrifugación por "protocolo de dos sacarosas" de la siguiente manera. Un concentrado que comprende AAV en un tampón Tris-HCl/NaCl seguido de una primera disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 55% (p/p) y luego una segunda disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 60% (p/p). En determinadas realizaciones, la disolución de AAV comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 500 mM. En determinadas realizaciones, la disolución de sacarosa comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 136 mM. La ultracentrifugación se lleva a cabo inicialmente a aproximadamente 4.000 rpm a una temperatura de 2-10°C, con la velocidad aumentada hasta de aproximadamente 33.000 rpm a aproximadamente 37.000 rpm, la temperatura aumentada hasta de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, y luego se mantiene durante aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 14 horas a aproximadamente 20 horas, o desde aproximadamente 16 horas hasta aproximadamente 20 horas. Luego se recogen las fracciones.

En determinadas realizaciones, las partículas de AAV vacías y llenas se separan entre sí mediante ultracentrifugación por "protocolo de dos azúcares" de la siguiente manera. Un concentrado que comprende AAV y una disolución tamponada de etilenglicol que contiene el 45-50% (p/p) de etilenglicol en un tampón Tris-HCl/NaCl seguido de una primera disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 55% (p/p) y luego una segunda disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 60% (p/p). En determinadas realizaciones, la disolución de AAV comprende aproximadamente el 55% de etilenglicol, Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, la disolución de sacarosa comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 136 mM. La ultracentrifugación se lleva a cabo inicialmente a aproximadamente 4.000 rpm a una temperatura de 2-10°C, con la velocidad aumentada hasta de aproximadamente 33.000 rpm a aproximadamente 37.000 rpm, la temperatura aumentada hasta de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, y luego se mantiene durante aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 14 horas a aproximadamente 20 horas, o desde aproximadamente 16 horas hasta aproximadamente 20 horas. Luego se recogen las fracciones.

En determinadas realizaciones, las partículas de AAV vacías y llenas se separan entre sí mediante ultracentrifugación por "protocolo de tres azúcares" de la siguiente manera. Un concentrado que comprende AAV en un tampón Tris-HCl/NaCl seguido de una primera disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 50% (p/p), una segunda disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 55% (p/p) y una tercera disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una

concentración de sacarosa del 60% (p/p). La primera disolución de sacarosa se carga en la parte inferior del rotor; seguido de la segunda disolución de sacarosa y la tercera disolución de sacarosa. En determinadas realizaciones, la disolución de AAV comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 500 mM. En determinadas realizaciones, la disolución de sacarosa comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 136 mM. La ultracentrifugación se lleva a cabo inicialmente a aproximadamente 4.000 rpm a una temperatura de 2-10°C, con la velocidad aumentada hasta de aproximadamente 33.000 rpm a aproximadamente 37.000 rpm, la temperatura aumentada hasta de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, y luego se mantiene durante de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas, desde aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 14 horas a aproximadamente 20 horas, o desde aproximadamente 16 horas hasta aproximadamente 20 horas. Luego se recogen las fracciones.

En determinadas realizaciones, las partículas de AAV vacías y llenas se separan entre sí mediante ultracentrifugación por "protocolo de tres sacarosas" de la siguiente manera. Un concentrado que comprende AAV y una disolución tamponada de etilenglicol que contiene el 45-50% (p/p) de etilenglicol en un tampón Tris-HCl/NaCl seguido de una primera disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 50% (p/p), una segunda disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 55% (p/p) y una tercera disolución de sacarosa que comprende sacarosa a una concentración de sacarosa del 60% (p/p). La primera disolución de sacarosa se carga en la parte inferior del rotor; seguido de la segunda disolución de sacarosa y la tercera disolución de sacarosa. En determinadas realizaciones, la disolución de AAV comprende aproximadamente el 55% de etilenglicol, Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 750 mM. En determinadas realizaciones, la disolución de sacarosa comprende Tris-HCl a aproximadamente 50 mM y NaCl a aproximadamente 136 mM. La ultracentrifugación se lleva a cabo inicialmente a aproximadamente 4.000 rpm a una temperatura de 2-10°C, con la velocidad aumentada hasta de aproximadamente 33.000 rpm a aproximadamente 37.000 rpm, la temperatura aumentada hasta de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, y luego se mantiene durante de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas, desde aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 14 horas a aproximadamente 20 horas, o desde aproximadamente 16 horas hasta aproximadamente 20 horas. Luego se recogen las fracciones.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden tratar una fracción que comprende partículas de AAV con un detergente disolvente para inactivar virus con envuelta lipídica. El ejemplo 8 describe un ejemplo de método de inactivación de virus con envuelta lipídica. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de tratamiento con detergente disolvente tiene lugar después de la etapa de ultracentrifugación descrita en el presente documento.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden la filtración de una fracción que comprende partículas de AAVr para retirar los virus de mayor tamaño que las partículas de AAVr en la fracción. En aspectos a modo de ejemplo, el método de la presente divulgación comprende la filtración de una fracción que comprende AAV para retirar los virus con un tamaño mayor de o de aproximadamente 35 nm. En aspectos a modo de ejemplo, el tamaño de poro del filtro está en el intervalo nanométrico, y, en aspectos a modo de ejemplo, el método comprende nanofiltración. En aspectos a modo de ejemplo, el método de la presente divulgación comprende el uso de un nanofiltro con un tamaño de poro en el intervalo de 35 nanómetros $\pm$ 2 nanómetros tal como se determina mediante un método de flujo de agua. Un ejemplo de nanofiltro que tiene tal tamaño de poro contiene haces de fibras huecas microporosas construidas de una celulosa hidrófila natural regenerada con cobre-amonio. La clasificación del tipo de filtro depende de la estructura, el material y el proveedor de la membrana. En aspectos a modo de ejemplo, el nanofiltro se somete a prueba con un ensayo de integridad frente a fugas para confirmar que el filtro está libre de agujeros pequeños o defectos grandes y se lava previamente con tampón de formulación.

Un ejemplo de nanofiltración se describe en el presente documento como ejemplo 10.

En aspectos a modo de ejemplo, la fracción que comprende partículas de AAVr, por ejemplo, un eluato de intercambio aniónico, se diluye previamente con tampón de elución (PBS + NaCl 600 mM) para ajustar la concentración de las partículas de virus.

En aspectos a modo de ejemplo, durante la etapa de filtración, se mantiene una diferencia de presión sobre el filtro, En aspectos a modo de ejemplo, la presión (caída de presión a lo largo del filtro) es de aproximadamente 0,02 MPa a aproximadamente 0,1 MPa. En aspectos a modo de ejemplo, la presión (por ejemplo, caída de presión a lo largo del filtro) es de aproximadamente 0,02 MPa a aproximadamente 0,08 MPa. En caso de que el filtro se ejecute en modo de punto muerto, la diferencia de presión puede efectuarse por la presión de alimentación de la muestra aplicada (es decir, mediante el ajuste de una bomba a una presión específica que afecta a la presión de alimentación). En aspectos a modo de ejemplo, la filtración se lleva a cabo a presión constante que no supera los 0,1 MPa en un modo de punto muerto a través del nanofiltro. En aspectos a modo de ejemplo, el filtro se ejecuta en un método de flujo tangencial. En aspectos a modo de ejemplo, el rendimiento de las partículas de virus recuperadas se aumenta mediante lavado posterior del nanofiltro con tampón (por ejemplo, tampón de formulación). En aspectos a modo de ejemplo, los ensayos de integridad posterior del nanofiltro se realizan un ensayo de fugas y/o un ensayo de partículas de oro para determinar que la distribución de tamaño de poro del nanofiltro no cambia y que el nanofiltro conserva su integridad durante la filtración. En aspectos a modo de ejemplo, se aplican más de 50 l de

disolución por m² de área de filtro para aumentar el rendimiento de la muestra.

En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de filtración para la retirada de virus más grandes que las partículas de AAVr tiene lugar una vez durante el procedimiento de la presente divulgación. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de filtración tiene lugar dos veces durante el procedimiento. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de filtración para la retirada de virus más grandes que las partículas de AAVr tiene lugar después de la etapa de ultracentrifugación descrita en el presente documento. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de filtración para la retirada de virus más grandes que las partículas de AAVr tiene lugar después de una etapa de pulido.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden una etapa de pulido que comprende realizar cromatografía de AEX, opcionalmente con una columna que comprende gel tentacular. El ejemplo 8 describe un ejemplo de método que comprende una etapa de pulido de este tipo. En aspectos a modo de ejemplo, la etapa de pulido tiene lugar después de la etapa de ultracentrifugación descrita en el presente documento.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden una o más etapas de control de calidad, por ejemplo, etapas para medir la potencia. La razón de ADN/AAV, o la actividad específica de las fracciones de AAV obtenidas después de una o más etapas (por ejemplo, después de cada etapa) del procedimiento. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden realizar un ensayo para determinar la presencia de AAV en las fracciones usando qPCR, por ejemplo, qPCR de ITR. La qPCR de ITR es un ensayo basado en PCR cuantitativa para medir la cantidad de ácido nucleico de repetición terminal invertida (ITR) de AAV en la fracción. Otras secuencias específicas de AAV, o específicas de AAV8, pueden someterse a ensayo mediante qPCR.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden realizar un ensayo para determinar la presencia de AAV en las fracciones usando ELISA. En aspectos a modo de ejemplo, el ELISA es un ELISA de tipo sándwich. En aspectos a modo de ejemplo, el ELISA de tipo sándwich comprende un anticuerpo específico para un epítipo de AAV. En aspectos a modo de ejemplo, el epítipo de AAV es un epítipo conformacional presente en cápsides de AAV ensambladas. Un método adecuado para someter a prueba la razón de ADN/AAV se describe en el presente documento como ejemplo 12. Tal como se comenta en el presente documento, el ELISA puede reemplazar a la qPCR como modo para determinar la potencia de una fracción de AAV. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden someter a prueba una fracción de AAV mediante un ELISA específico de AAV y los métodos no incluyen ningún método de medición de la potencia mediante PCR cuantitativa. En aspectos a modo de ejemplo, el ELISA específico de AAV es suficiente para proporcionar una lectura representativa de la potencia de la fracción de AAV, porque la mayoría de las cápsides en la fracción de AAV son cápsides llenas.

En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden un ELISA específico de AAV después de una o más de las etapas de la presente divulgación. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden someter a prueba una fracción de AAV obtenida después de la ultracentrifugación mediante un ELISA específico de AAV para determinar la razón de ADN/AAV del AAV en esa fracción. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden someter a prueba una fracción de AAV obtenida después de la filtración de profundidad mediante un ELISA específico de AAV para determinar la razón de ADN/AAV del AAV en esa fracción. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden someter a prueba una fracción de AAV obtenida después de la concentración de una fracción de AAV usando un sistema de ultra/diafiltración mediante un ELISA específico de AAV para determinar la razón de ADN/AAV del AAV en esa fracción. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden someter a prueba una fracción de AAV obtenida después de una etapa de filtración de flujo tangencial (TFF) mediante un ELISA específico de AAV para determinar la razón de ADN/AAV del AAV en esa fracción. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos de la presente divulgación comprenden someter a prueba una fracción de AAV obtenida después de la cromatografía de intercambio aniónico (AEX) negativa mediante un ELISA específico de AAV para determinar la razón de ADN/AAV del AAV en esa fracción.

En aspectos a modo de ejemplo, el método de la presente divulgación comprende una o una combinación de las etapas ilustradas en la figura 1. En aspectos a modo de ejemplo, el método de la presente divulgación comprende todas las etapas ilustradas en la figura 1.

En el presente documento se proporciona además un producto de AAV producido mediante un método de las presentes divulgaciones. En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV comprende al menos aproximadamente 10¹² partículas de virus (pv) producidas a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular) o al menos aproximadamente 10¹³ partículas de virus (pv) producidas a partir de aproximadamente 1000 l de material de partida (por ejemplo, cultivo celular) y en el que al menos el 50% o al menos el 55% de las cápsides de AAV presentes en el producto de AAV son cápsides de AAV llenas. En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV de las presentes divulgaciones es muy puro, muy potente y adecuado para uso clínico en humanos. En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV comprende partículas de AAV de una

población homogénea y de alta pureza. En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV comprende ADN de vector de longitud completa. En realizaciones a modo de ejemplo, el producto de AAV está sustancialmente libre de contaminantes no deseados, incluyendo, pero sin limitarse a, partículas de AAV que contienen ADN de vector truncado o incompleto, partículas de AAV con composición de proteína incompleta y estructuras oligomerizadas, o virus contaminantes, por ejemplo, virus con envuelta lipídica distintos de AAV. En realizaciones a modo de ejemplo, el producto de AAV contiene una alta cantidad de ADNc codificante de la proteína de interés. En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV de la presente divulgación es adecuado para su administración a un humano. En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV es estéril y/o de calidad para Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV es conforme a los requisitos expuestos en el capítulo 1046 de la Farmacopea Estadounidense o en la Farmacopea Europea sobre medicamentos para terapia génica o tal como exige la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA de EE.UU.) o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). En aspectos a modo de ejemplo, el producto de AAV es un producto listo para su uso para la administración directa a un humano con poco o ningún procesamiento o manipulación.

Los siguientes ejemplos se proporcionan simplemente para ilustrar la presente invención y no para limitar en modo alguno su alcance.

Ejemplos

EJEMPLO 1

El siguiente ejemplo describe un ejemplo de método de transfección de una línea celular HEK293 con un sistema plasmídico triple para producir partículas de AAVr que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína de interés.

Se hacen crecer células HEK293 adherentes en condiciones de suspensión en un medio de cultivo disponible comercialmente que está definido químicamente y libre de componentes de origen animal, proteína y suero. Las células se cultivan hasta una densidad celular de aproximadamente $6-10 \times 10^6$ células/ml. Antes de la transfección, se realiza un reparto de aproximadamente 1:2 para conseguir una densidad celular de aproximadamente $3-5 \times 10^6$ células/ml.

Las células se transfectan con tres plásmidos: (1) un plásmido auxiliar, que proporciona funciones virales auxiliares esenciales para una infección de AAV productiva, (2) el plásmido *rep*cap, que porta toda la información sobre la generación de cápsides, la replicación y el empaquetamiento del virus y (3) un plásmido que contiene el gen de interés (GDI), que se empaqueta en la partícula de AAVr resultante. Por ejemplo, el GDI puede ser un ADN de vector de factor IX Padua (monocatenario (~2,6 kb) o bicatenario (~4,8 kb)) o ADN de vector monocatenario de factor VIII (~4,8 kb).

La transfección transitoria de las células HEK293 se lleva a cabo usando el polímero catiónico polietilenimina (PEI). Brevemente, se incuban PEI y ADN plasmídico durante más de 10 minutos a temperaturas de entre 4 y 37°C antes de combinar la mezcla de transfección con el cultivo celular, con el fin de que tenga lugar la formación previa de complejos de PEI y ADN plasmídico. Se añaden los complejos previamente formados al cultivo celular junto con la mezcla de transfección y se incuban durante de aproximadamente 3 a 4 horas a una temperatura de entre 30°C y 40°C, por ejemplo, a aproximadamente 37°C. La transfección se detiene añadiendo un medio de detención conocido que comprende, por ejemplo, un medio, por ejemplo, Hyclone™ CDM4HEK293, un medio de cultivo celular químicamente definido, libre de componentes animales y libre de proteínas, que incluye glutamina 0,6 g/l, al cultivo transfectado.

Las partículas de AAVr que portan el GDI están en la línea celular HEK293 durante un periodo de 3-5 días tras la transfección. Tal como se muestra en las figuras 2 y 3, el cultivo de células HEK293 presenta altas densidades celulares (por ejemplo, mayores de aproximadamente 5×10^6 células/ml) con una viabilidad de >50% en un momento que es aproximadamente 5 días tras la transfección.

EJEMPLO 2

El siguiente ejemplo describe un ejemplo de método de recogida del sobrenadante de un cultivo de células HEK293 transfectadas.

Tal como se comentó en el ejemplo 1, la producción de AAVr se produce en el plazo de los primeros 3 a aproximadamente 5 días después de la transfección. Al final de este periodo de tiempo, el cultivo de células HEK293 presenta altas densidades celulares (por ejemplo, mayores de aproximadamente 5×10^6 células/ml) con una viabilidad de >50%. El sobrenadante del cultivo celular se recogió en este momento mediante filtración de profundidad. Las partículas de AAV se separaron a partir de las células y del residuo celular filtrando aproximadamente 200 l (± 20 l) de suspensión de células que contienen AAV a través de un elemento de filtro de profundidad a base de celulosa (por ejemplo, Pall, STAX K900P; 4 m²) y un elemento de filtro de polietersulfona (PES) de 0,2 µm (por ejemplo, Pall, ECV; 2 x 5 pulgadas, en paralelo). La velocidad de flujo típica a través de los

5 filtros fue de 160 ± 100 kg/hora y la presión total fue de $<1,7$ bar. Los dos filtros se lavaron con aproximadamente 10-30 l de tampón solución salina tamponada con Tris (TBS) (Tris 20 mM, NaCl 8 g/l, pH $7,4 \pm 0,2$ a 25°C). Junto con la fracción de lavado del filtro, se recoge el caldo de fermentación filtrado en una bolsa de 500 l y se denomina fracción de recogida. Los parámetros de la etapa de recogida y la caracterización de la fracción de recogida (rendimiento) después de la etapa de recogida se muestran en las tablas 1 y 2, respectivamente. La figura 4 proporciona un registro continuo de presión y velocidad de flujo de la etapa de recogida.

TABLA 1 Parámetros de la etapa de recogida		
Etapa del procedimiento	Parámetro / Material	Valor
Condiciones de biorreactor durante la recogida	Temperatura durante el inicio de la recogida	19-37°C
	Volumen de trabajo al inicio de la filtración	200 +/- 20 l
Filtro de profundidad	Tipo de membrana	Pall, STAX K900P
	Material de membrana	A base de celulosa
	Área de filtro de profundidad de K900 STAX	4 (= 2*2) m ²
	Volumen de aclarado previo (VE-agua)	>50 l/m ²
	Recipiente entre STAX y ECV	No, stax y ecv en línea
Filtro de 0,2 µm	Tipo de filtro	Pall, Supor ECV
	Material de filtro	PES (polietersulfona)
	Tamaño de poro	0,2 µm
	Número de elementos de filtro	2*5 pulgadas
	Área de filtro de 0,2 µm (ECV; 5 pulgadas)	1,04 m ²
Parámetros de filtración	Velocidad de flujo típica	160 +/- 100 kg/hora
	Presión total (profundidad + 0,2 µm)	< 1,7 bar
	Lavado de filtro	Tampón TBS
	Volumen de lavado de filtro (profundidad + 0,2 µm)	10-30 l
	Recogida de filtrado y fracción de lavado	Pall, mezcladora 200L Allegro

TABLA 2

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO												
	Volumen	Turbidez	Proteína mediante Bradford		qPCR de ITR		ELISA de AAV		ADN de HEK		ELISA de HCP HEK293	
Código de muestra:	[ml]	[UTN]	[µg/ml]	Total [mg]	[gv/ml]	Total [gv]	[µg/ml]	Total [mg]	[ng/ml]	Total [µg]	[µg/ml]	Total [mg]
Carga	200,000	n.d.	597,5	119500-	1,09E+12	2,18E+17-	3,65	730-	800,0	160000-	69,2	13840-
STX_1	-	0,160	43	-	1,33E+11	-	1,294	-	<2,5	-	21,7	-
STX_2	-	1,450	79,34	-	3,95E+11	-	2,505	-	119,0	-	45,2	-
STX_3	-	2,250	211	-	5,64E+11	-	3,087	-	592,0	-	44,9	-
STX_F	-	2,480	164	-	4,17E+11	-	1,479	-	512,0	-	24,6	-
ECV_1	-	0,170	25	-	1,26E+11	-	0,921	-	<2,5	-	16,5	-
ECV_2	-	0,170	79	-	3,01E+11	-	1,867	-	33,0	-	31,4	-
ECV_3	-	0,520	77	-	4,01E+11	-	2,610	-	221,0	-	42,3	-
ECV_4	-	0,480	86	-	3,82E+11	-	2,862	-	280,0	-	42,8	-
ECV_5	-	0,850	198	-	5,09E+11	-	2,731	-	273,0	-	41,9	-
ECV_6	-	1,670	251	-	6,14E+11	-	3,526	-	784,0	-	45,2	-
ECV_P	201,800	2,530	169	34052	5,24E+11	1,06E+17	2,404	485	295,0	59531	38,3	7729

Código de muestra:	Descripción
Carga	Sobrenadante a los 3 días después de la transfección (tiempo de recogida)
STX_1	Después de filtración de profundidad de 1/6 de la fracción de recogida
STX_2	Después de filtración de profundidad de 1/2 de la fracción de recogida
STX_3	Después de filtración de profundidad de 5/6 de la fracción de recogida
STX_F	Después de lavado de filtro de profundidad con tampón TBS
ECV_1	Después de filtración de 0,2 µm de 1/12 de la fracción de recogida
ECV_2	Después de filtración de 0,2 µm de 1/4 de la fracción de recogida
ECV_3	Después de filtración de 0,2 µm de 5/12 de la fracción de recogida
ECV_4	Después de filtración de 0,2 µm de 7/12 de la fracción de recogida
ECV_5	Después de filtración de 0,2 µm de 3/4 de la fracción de recogida
ECV_6	Después de filtración de 0,2 µm de 11/12 de la fracción de recogida
ECV_P	Agrupación de las fracciones de recogida y de lavado

Tal como se muestra anteriormente en la tabla 2, mediante esta etapa de filtración se retiró más del 70% de la proteína y más del 62% del ADN de HEK hallados en la suspensión celular antes de la filtración. La cantidad de ácido nucleico de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV en la fracción agrupada que contiene las fracciones de recogida y de lavado de filtro (P) tal como se mide mediante PCR cuantitativa (qPCR) fue aproximadamente la mitad de la hallada en la suspensión celular antes de la filtración. Además, tal como se mide mediante ELISA, tras la filtración se retuvo más del 65% del AAV de la suspensión celular previa a la filtración.

EJEMPLO 3

El siguiente ejemplo describe un ejemplo de modo de concentración y acondicionamiento de una fracción de recogida mediante un sistema de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF)-filtración de flujo tangencial (TFF).

Se sometió la fracción de recogida obtenida en el ejemplo 2 a un sistema de UF/DF-TFF para concentrar y acondicionar la fracción de recogida. En una primera etapa, se concentró la fracción de recogida aproximadamente 16 veces hasta un volumen objetivo de 12 l mediante TFF usando 3 membranas de Omega Centramate de la serie T de Pall de 0,5 m² de 100 kDa (n.º de pieza: OS100T06). Luego se sometió la fracción de recogida concentrada a dos etapas de diafiltración para reducir los componentes del medio y para acondicionar la fracción de recogida concentrada hasta un pH de 8,5 y una conductividad de 15 mS/cm. La primera etapa de diafiltración se realizó mediante un intercambio de volumen de 5 veces con tampón de diafiltración 1 (DB1: TRIS 50 mM/NaCl 500 mM/pH 8,5±0,2 a 25°C). La segunda etapa de diafiltración se llevó a cabo mediante un intercambio de volumen de 5 veces con tampón de diafiltración 2 (DB2: TRIS 50 mM/NaCl 125 mM/pH 8,5±0,2 a 25°C). Cada etapa de diafiltración se llevó a cabo usando 3 membranas de Omega Centramate de la serie T de Pall de 0,5 m² de 100 kDa (n.º de pieza: OS100T06). Después de la segunda etapa de diafiltración, se concentró la fracción retenida hasta un volumen objetivo final de 10 l mediante TFF tal como se describió anteriormente. Luego se filtraron los 10 l de concentrado a través de un elemento de filtro de 0,2 µm (5 pulgadas, filtro Pall ECV, n.º de pieza: NP5LUECV1S). Con el fin de aumentar el rendimiento de AAV8, se lavaron las membranas de UF/DF, el sistema de UF/DF y el filtro de 0,2 µm con aproximadamente 2 l de DB2. Se recogieron la fracción retenida y la fracción de lavado de filtro y se mezclaron en una bolsa con el fin de prepararlas para la etapa de captura posterior. La figura 7 muestra las etapas intermedias de la TFF en tinción con plata (izquierda) e inmunotransferencia de tipo Western (derecha). Los parámetros de las etapas de UF/DF-TFF y la caracterización del concentrado acondicionado resultante [tras las etapas de UF/DF-TFF] se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Descripción de la tinción con plata

Gel de Bis-Tris Midi al 4-12% de NuPAGE 1,0 mm. 20 pocillos. N.º de cat. WG1402BX10

Tampón de ejecución MES SDS. Invitrogen. N.º de cat. NP0002

Incubación con SB+DTT 10 min a 70°C. Enfriamiento durante 10 min, tratamiento con JAA

Descripción de la inmunotransferencia de tipo Western

Gel de Bis-Tris Midi al 4-12% de NuPAGE 1,0 mm. 20 pocillos. N.º de cat. WG1402BX10

Tampón de ejecución MES SDS. Invitrogen. N.º de cat. NP0002

Incubación con SB+DTT 10 min a 70°C. Enfriamiento durante 10 min, tratamiento con JAA

1º anticuerpo: AcM contra VP1. VP2 y VP3 de AAV (virus adenoasociado)

Cromatografía de afinidad de proteína A

PROGEN61058

2º anticuerpo: anticuerpo de cabra anti-ALP de ratón

SIGMA A4656 1:2000 1 h

TABLA 3

Etapa	Tampón	Volumen	Presión [bar]				Flujo [l/h]		Conductividad [mS/cm]
			Alimentación	Fracción retenida	Filtrado	PTM (presión transmembrana)	Fracción retenida	Filtrado	
Acondicionamiento y equilibrado	Tampón de ultrafiltración	Aprox. 12 l	0,7-1,1	0,0-0,3	0,0-0,2	0,20-0,40	n.a.	n.a.	n.a.
Ultrafiltración (1ª concentración)	n.a.	Hasta 12 l	1,4-1,8	0,9-1,4	0,1-0,6	1,00-1,09	240-420	110-260	11,75
1ª ultrafiltración	Tampón de ultrafiltración	5 cambios de volumen	1,4-1,5	0,8-1,0	0,1-0,2	1,00-1,06	401-425	92-118	48,1
2ª ultrafiltración	Tampón de ultrafiltración	5 cambios de volumen	1,4	0,8	0,1	0,99-1,02	439-447	82-94	15,57
Ultrafiltración (2ª concentración)	n.a.	Hasta 10 l	1,4	0,8	0,1	0,99-1,02	n.a.	n.a.	n.a.
Lavado de membrana	Tampón de ultrafiltración	~2 l	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: no aplicable

TABLA 4

Código de muestra:	Volumen [ml]	Proteína mediante Bradford			qPCR de ITR			ELISA de AAV			ELISA de HCP HEK293		
		[µg/ml]	Total [mg]	Rendimiento (%)	[gv/ml]	Total [gv]	Rendimiento (%)	[µg/ml]	Total [mg]	Rendimiento (%)	[µg/ml]	Total [mg]	Rendimiento (%)
Carga	201800	149,9	30247,8	100,0	4,12E+11	8,31E+16	100,0	2,2	449,2	100,0	39,4	7950,9	100,0
Fracción retenida	12000	1672,3	20067,0	66,3	5,64E+12	6,77E+16	81,4	34,3	411,4	91,6	368,0	4416,0	55,5
Filtrado	189800	47,5	9017,4	31,7	7,97E+08	1,51E+14	0,2	<0,03125	-	-	n.d.	-	-
Fracción diarretenida 1	12000	1433,7	17203,8	56,9	5,25E+12	6,30E+16	75,8	35,1	420,8	93,7	271,0	3252,0	40,9
Diafiltrado 1	60000	31,0	1857	6	6,18E+08	3,71E+13	0,0	<0,03125	-	-	n.d.	-	-
Fracción diarretenida 2	12000	1621,4	19456,4	64,3	5,20E+12	6,24E+16	75,1	42,8	513,3	114,3	284,0	3408,0	42,9
Diafiltrado 2	60000	13,4	802	3	8,88E+08	5,33E+13	0,1	<0,03125	-	-	n.d.	-	-
Fracción retenida (2 x diafiltrada) agrupado con fracción de lavado tras filtración de 0,2 µm	11857	1202,0	14252,6	47,1	4,81E+12	5,70E+16	68,6	28,0	332,5	74,0	227,0	2691,5	33,9

n.d.: no determinado

Tal como se muestra en la tabla 4, el volumen del concentrado acondicionado resultante fue aproximadamente el 6% del volumen inicial, aunque el porcentaje de AAV en el concentrado fue del 74%, tal como se mide mediante ELISA.

5

EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra un ejemplo de método de cromatografía negativa con un intercambiador aniónico.

10 Después de la concentración y diafiltración de la fracción de recogida mediante TFF tal como se describió en el ejemplo 3, se acondiciona el tampón que contiene AAV con respecto a NaCl 125 mM/Tris-HCl 50 mM/pH 8,5 para la cromatografía negativa usando una membrana de intercambiador aniónico Mustang (número de pieza de Pall XT5000MSTGQP1). En estas condiciones, el AAV no se une sobre la membrana de intercambiador aniónico y, en vez de eso, fluye a través de la columna. Después de cargar la columna, se usaron dos volúmenes totales (iguales a 2X la cápsula de membrana) de un tampón de lavado (NaCl 125 mM/Tris HCl 50 mM; pH 8,5) para eliminar por lavado cualquier cantidad de AAV8 no unido de la columna. La figura 5 proporciona el cromatograma del producto no retenido de una cromatografía de AEX con Mustang Q en modo negativo (sin unión). Se llevó a cabo una elución para examinar las proteínas unidas. La tabla 5 detalla el esquema de la etapa de cromatografía negativa y la tabla 6 detalla el rendimiento.

20

TABLA 5

Etapas	Tampón	Entrada	Velocidad de flujo	CV	Pos. de col.	Salida	Fracción
Equilibrado 1 NaOH 0,5 M	NaOH 0,5 M	B2	400 ml/min	5	1 hacia abajo 2 de derivación	F1	Residuo
Equilibrado 2 NaOH 2 M	TWA-Tampón	A4	400 ml/min	5	1 hacia abajo 2 de derivación	F1	Residuo
Equilibrado 3	Tampón de equilibrado	A1	400 ml/min	4	1 hacia abajo 2 de derivación	F1	Residuo
Carga con sensor de aire	Muestra-Carga:	S1	400 ml/min	---	1 hacia abajo 2 de derivación	0-0,059 CV F1 Ab0,59 CV F2	Residuo FT
Lavado	Tampón de equilibrado	A1	400 ml/min	3	1 hacia abajo 2 de derivación	0-1,68 CV F2 1,68-3 CV F1	FT Residuo
Elución	Tampón de elución	B1	400 ml/min	2,6	1 hacia abajo 2 de derivación	0-0,4 CV F1 0,4-2,6 CV F3	Residuo E

Tampón de equilibrado: Tris 50 mM; NaCl 125 mM (pH 8,5±0,1 a 25°C)
Tampón de elución: Tris 20 mM; NaCl 1000 mM (pH 9,0±0,1 a 25°C)

TABLA 6

Código	Volumen (g)	qPCR de ITR			ELISA de AAV8			AKT	Biopotencia in vitro	Proteína mediante Bradford OR-1300443			ELISA de HCP HEK293		
		gv/ml	gv	%	µg/ml	µg	%			µg/ml	mg	%	µg/ml	mg	%
L	11628,40	2,91E+12	3,38E+16	100	34,361	399563,45	100	8,47E+10	1,54	1295,98	15070,17	100,00	269	3128,04	100,00
FT	22054,20	7,45E+11	1,64E+16	48,56	11,782	259842,58	65,03	6,32E+10	1,64	234,55	5172,81	34,32	107	2359,80	75,44
E	21009,20	8,31E+10	1,75E+15	5,16	1,055	22164,71	5,55	7,88E+10	-	108,04	2269,83	15,06	-	-	-

L = fracción cargada; FT = fracción no retenida; E = fracción eluida

5 Tal como se muestra en la tabla 6, la etapa de cromatografía negativa retiró con éxito una cantidad sustancial de proteína total mientras que retuvo una cantidad significativa de AAV. Este aumento de pureza también se ilustra mediante la tinción con plata y la inmunotransferencia de tipo Western en la figura 6. La fracción no retenida comprendía aproximadamente el 65% de la cantidad inicial de AAV, mientras que en la fracción eluida estaba presente menos del 6% del AAV. Además, la cantidad de proteína total de la fracción no retenida se redujo significativamente. Sólo permaneció aproximadamente el 34% de la proteína total en la fracción FT.

Descripción de la tinción con plata

10 Gel de Bis-Tris Midi al 4-12% de NuPAGE 1,0 mm. 20 pocillos. N.º de cat. WG1402BX10
 Tampón de ejecución MES SDS. Invitrogen. N.º de cat. NP0002
 Incubación con SB+DTT 10 min a 70°C. Enfriamiento durante 10 min, tratamiento con JAA

Descripción de la inmunotransferencia de tipo Western

15 Gel de Bis-Tris Midi al 4-12% de NuPAGE 1,0 mm. 20 pocillos. N.º de cat. WG1402BX10
 20 Tampón de ejecución MES SDS. Invitrogen. N.º de cat. NP0002
 Incubación con SB+DTT 10 min a 70°C. Enfriamiento durante 10 min, tratamiento con JAA
 1ª anticuerpo: AcM contra VP1, VP2 y VP3 de AAV (virus adenoasociado)

25 Cromatografía de afinidad de proteína A

PROGEN61058

30 2º anticuerpo: anticuerpo de cabra anti-ALP de ratón

SIGMA A4656 1:2000 1 h

EJEMPLO 5

35 Este ejemplo demuestra un ejemplo de método de una segunda etapa de TFF.

Se concentró la fracción no retenida (FT) que contiene AAV8 obtenida a través de cromatografía negativa (ejemplo 4) y se sometió a diafiltración frente a un tampón de diafiltración (DB1) que comprendía NaCl 500 mM/Tris-HCl 50 mM; pH 8,5 para acondicionar el producto para la etapa de ultracentrifugación (UC) posterior (por ejemplo, ejemplo 6, 7, 9, 14 ó 16). La segunda etapa de TFF (TFF2) se llevó a cabo usando 4 membranas de Omega Centramate de la serie T de Pall de 0,1 m² de 100 kDa (4x Pall, n.º de pieza: OS100T12) y el sistema de UF/DF CM500 de Pall. Después de la ultracentrifugación/diafiltración, se concentró el producto hasta un volumen objetivo de 1200 ml y se drenó del sistema. Con el fin de aumentar el rendimiento de AAV8, posteriormente se lavaron la membrana y el sistema de UF/DF con aproximadamente 400 ml de tampón de diafiltración (10 min de recirculación en el lado de fracción retenida a 1 bar de presión de alimentación). Se agruparon la fracción de lavado de membrana y el producto concentrado y se filtraron usando un filtro de 0,2 µm (PALL, n.º de pieza: KA02EAVP2S) para la reducción de la biocarga. La tabla 7 detalla el esquema de TFF2 y la tabla 8 detalla el rendimiento de esta etapa.

TABLA 7

Etapas	Tampón	Volumen	Presión [bar]			PTM (presión transmembrana)		Flujo [l/h]		Conductividad [mS/cm]
			Alimentación	Fracción retenida	Filtrado			Fracción retenida	Filtrado	
Acondicionamiento y equilibrado	Tampón de diafiltración	Aprox. 2000 ml	0,5-1,2	0,0-0,1	0,0	0,25-0,65		n.a.	n.a.	n.a.
Ultrafiltración (concentración)	n.a.	Hasta 1600 ml	1,6	0,1	0,0	0,85		188,4-190,8	61,0-77,5	14,84
Diafiltración	Tampón de diafiltración	4-5 cambios de volumen	1,5-1,6	0,1	0,0	0,80-0,85		184,2-186,0	61,3-63,8	46,92
Ultrafiltración (2ª concentración)	n.a.	Hasta 1200 ml	0,5-1,6	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
Lavado de membrana	Tampón de diafiltración	~400 ml	1,0	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.

Tampón de diafiltración = Tris 50 mM/NaCl 500 mM, pH 8,5±0,2 a 25°C

TABLA 8

Etapas	Volumen* [ml]	OR- 1300448 de proteína mediante Bradford (µg/ml)	Proteína mediante Bradford (mg)	Rendimiento de proteína mediante Bradford (%)	qPCR de ITR (gv/ml)	qPCR de ITR (gv)	Rendimiento de qPCR de ITR (%)	ELISA de AAV (µg/ml)	ELISA de AAV total (mg)	Rendimiento de ELISA de AAV (%)	ELISA de HCP HEK293 (µg/ml)	ELISA de HCP HEK293 total (mg)	Rendimiento de ELISA de HCP HEK293 (%)
Carga	22037,4	247	5437	100	4,61E+11	1,02E+16	100,0	16,64	366,81	100	122	2689	100
Fracción retenida	1600,0	1078	1725	32	5,88E+12	9,41E+15	92,61	194,27	310,84	85	356	570	21
Filtrado	20301,5	171	3480	64	7,73E+08	1,57E+13	0,15	<0,03125	---	---	---	---	---
Diafiltrado	7716,5	129	992	18	6,41E+08	4,95E+12	0,05	<0,03125	---	---	---	---	---
Fracción retenida (diafiltrada)	1600,0	523	837	15	6,32E+12	1,01E+16	99,53	187,07	299,31	82	101	162	6
Fracción retenida (diafiltrada) agrupada													
fracción de lavado antes de filtración de 0,2 µm	1671,4	523	875	16	6,32E+12	1,06E+16	103,98	174,54	291,78	80	---	---	---
Fracción retenida (diafiltrada) agrupada													
fracción de lavado tras filtración de 0,2 µm	1686,0	534	901	17	6,76E+12	1,14E+16	112,19	192,53	324,61	88	104	175	7

Tal como se muestra en la tabla 8, la etapa de TFF2 redujo con éxito el volumen hasta aproximadamente el 7,5% del volumen original (volumen de carga) al tiempo que retuvo el 88% del AAV inicial.

5 EJEMPLO 6

Este ejemplo demuestra un ejemplo de método de separación de partículas de AAV vacías a partir de llenas a través de ultracentrifugación usando disolución tamponada de etilenglicol al 50% (p/p) y gradiente de sacarosa al 50% (p/p). Esta etapa retira adicionalmente proteínas de células huésped (por ejemplo, HSP70). Mediante esta etapa también se eliminan las impurezas relacionadas con el producto como "cápsides vacías" y proteínas de células huésped tales como HSP70 y LDH.

Se cargó en la ultracentrífuga (UC) una disolución tamponada de etilenglicol al 50% (p/p) en Tris-HCl 50 mM/NaCl 750 mM a pH 8,0 que contenía la muestra de AAV8 que comprende ADN de vector de factor de coagulación humano IX Padua en una forma monocatenaria y autocomplementaria (2,6 kb), seguido de dos disoluciones de sacarosa diferentes que varían en cuanto a concentración de sacarosa. La disolución de sacarosa cargada en primer lugar en la UC tenía una concentración de sacarosa del 55%. La disolución de sacarosa cargada en la UC inmediatamente después de la primera disolución de sacarosa tenía una concentración de sacarosa del 60%. La razón de muestra cargada con respecto a gradiente de sacarosa es de 1:1 y las disoluciones de sacarosa tenían volúmenes iguales. El volumen de núcleo total es de 1.600 ml.

Se preparó un kilogramo de la disolución de sacarosa tamponada con una concentración de sacarosa del 55% mezclando 2,42 g de tris(hidroximetil)aminometano (trometamol) con 8,00 g de cloruro de sodio y 550,00 g de sacarosa. Se añadió API hasta casi 1 kg, usándose NaOH 1 M y HCl al 25% para ajustar el pH según fuese necesario. Luego se añadió API hasta 1 kg.

Se preparó un kilogramo de la disolución de sacarosa tamponada con una concentración de sacarosa del 60% mezclando 2,42 g de tris(hidroximetil)aminometano (trometamol) con 8,00 g de cloruro de sodio y 600,00 g de sacarosa. Se añadió API hasta casi 1 kg, usándose NaOH 1 M y HCl al 25% para ajustar el pH según fuese necesario. Luego se añadió API hasta 1 kg.

Se formó un gradiente de densidad durante la primera fase de UC en el que la velocidad de rotación se ajustó a 4.000 rpm y la temperatura se mantuvo a 2-10°C. Después de la primera fase, se aumentó la velocidad de rotación hasta 35.000 rpm y se aumentó la temperatura hasta 22°C. Durante esta segunda fase a velocidad y temperatura mayores, se separaron las partículas de AAV llenas a partir de las cápsides vacías. Después de 20 horas, se detuvo la ultracentrífuga y se recogieron las fracciones que contenían la mayor parte de las partículas de AAV llenas. A continuación, en la tabla 9, se proporcionan detalles adicionales relativos a la etapa de UC que se realizó, incluyendo los detalles sobre parámetros de entrada para la construcción del gradiente, la recogida de la fracción que contenía las partículas llenas, la tasa de elución, etc.

TABLA 9

Etapa del procedimiento	Parámetro / Material	Valor
General	Equipo	CC40
	Equivalente de fermentación	1/2 de 500 l
	Volumen de núcleo	3,2 l
Carga	Secuencia de carga	Disolución tamponada de etilenglicol que contiene AAV8 -> sac. al 55% -> sac. al 60%
	Volumen de producto intermedio de UFB por ejecución	1,6 l
	Velocidad de flujo de alimentación de producto intermedio de UFB	11,5 l/h
	Velocidad de flujo de alimentación de disoluciones de sacarosa	4,8 l/h
	Volumen de sacarosa al 55%	Aproximadamente 800 ml
	Volumen de sacarosa al 60%	Aproximadamente 800 ml
	Concentración de sacarosa, sacarosa al 55%	55% ± 1%
	Concentración de sacarosa, sacarosa al 60%	60% ± 1%
	pH de tampones de sacarosa (55%, 60%)	7,4 +/- 0,3

Construcción del gradiente	Velocidad de rotación: aumento desde	0 rpm-4.000 rpm
	Tiempo para la construcción del gradiente	17-25 min
	Temperatura de cámara durante la construcción del gradiente	2-10°C
Aceleración	Velocidad de rotación: aumento desde	4.000-35.000 rpm
	Tiempo para la aceleración	5-60 min
	Temperatura de cámara durante la aceleración	2-10°C
Separación	Velocidad de rotación	35.000 ± 2.000 rpm
	Temperatura de cámara durante la separación	Objetivo: 22 +/- 2°C
	Duración de la separación	20 horas (puede durar 16-20 horas)
Deceleración	Velocidad de rotación: disminución desde	35.000-4.000 rpm
	Tiempo para la deceleración	5-90 min
	Temperatura de cámara durante la deceleración	2-10°C
Detención lenta	Velocidad de rotación: disminución desde	4.000-0 rpm
	Tiempo para la detención lenta	15-30 min
	Temperatura de cámara durante la detención lenta	2-10°C
Fraccionamiento	Velocidad de flujo de elución	6 l/h
	Masa de fracción	100-600 g
	Masa de agrupación pico (por lote de fermentación)	200 -1800 g
	Tiempo de espera después de UC - Temperatura	2-8°C
Tampón	pH y conductividad	Composición
Disolución de sacarosa al 55%	pH 7,4 ± 0,2 a 25°C	Tris 20 mM NaCl 8 g/kg sacarosa al 55%
Disolución de sacarosa al 60%	pH 7,4 ± 0,2 a 25°C	Tris 20 mM NaCl 8 g/kg sacarosa al 60%

Los resultados se muestran en la figura 17, en la que las cápsides vacías (en la fracción 15) se resuelven a partir de las cápsides llenas (en la fracción 11).

- 5 La figura 18 muestra los resultados de llevar a cabo cuatro ensayos diferentes en cada una de las fracciones mostradas en la figura 17. qPCR se refiere a PCR cuantitativa de ITR de AAV8 (qPCR de ITR). AAV8:AG se refiere a ELISA frente a un antígeno de AAV8. % de WAX se refiere al porcentaje de cápsides llenas tal como se cuantifica mediante intercambio aniónico débil. La razón de ADN/AAV (algunas veces denominada en el presente documento act. espec. o actividad específica) se refiere a la razón de genomas de vector totales (qPCR de ITR) con respecto a la cantidad total de partículas de AAV8r (AAV8:AG), que proporciona una indicación en cuanto a la proporción de cápsides que contienen ADN así como de cápsides llenas. Una mayor razón de ADN/AAV se correlaciona con una mayor cantidad de cápsides llenas. La transición de cápsides llenas a vacías se observa por la abrupta disminución en la act. espec. desde la fracción 13 hasta la fracción 15. Los valores para cada ensayo se normalizaron entre sí, tal como indica el eje Y.

15

TABLA 10

Fracción	qPCR de Blue 06	AAV8:AG	WAX	Razón de ADN/AAV
N.º:	gv/ml	cp/ml	[%] de AAV8 lleno	gv/cp
1	2,61E+11	8,9E+11	86	2,93E+10
2	6,05E+11	1,99E+12	82	3,04E+10
3	1,08E+12	2,47E+12	82	4,37E+10
4	1,21E+12	3,32E+12	85	3,64E+10
5	2,04E+12	4,94E+12	87	4,13E+10
6	2,51E+12	7,85E+12	90	3,20E+10
7	4E+12	1,57E+13	94	2,55E+10

8	6,41E+12	2,62E+13	96	2,45E+10
9	1,1E+13	4,4E+13	97	2,50E+10
10	1,86E+13	6,25E+13	98	2,98E+10
11	3,18E+13	8,4E+13	97	3,79E+10
12	4,19E+13	1,3E+14	97	3,22E+10
13	4,09E+13	1,395E+14	90	2,93E+10
14	2,69E+13	1,56E+14	76	1,72E+10
15	2,05E+13	1,79E+14	54	1,15E+10
16	1,18E+13	2,025E+14	42	5,83E+09
17	7,87E+12	1,985E+14	35	3,96E+09
18	6,28E+12	2,1E+14	39	2,99E+09
19	5,06E+12	1,43E+14	36	3,54E+09
20	3,1E+12	8,79E+13	38	3,53E+09

EJEMPLO 7

Este ejemplo demuestra un ejemplo de método de separación de partículas de AAV vacías a partir de llenas a través de ultracentrifugación usando un gradiente de sacarosa. Esta etapa retira adicionalmente proteínas de células huésped (por ejemplo, HSP70). Mediante esta etapa también se eliminan las impurezas relacionadas con el producto como “cápsides vacías” (tal como se definió anteriormente).

Se cargó en la ultracentrífuga (UC) la fracción concentrada que contenía ADN de vector que comprendía ADN monocatenario que codifica para factor de coagulación humano VIII con delección del dominio B obtenido mediante TFF2 del ejemplo 5, seguido de tres disoluciones de sacarosa diferentes que varían en cuanto a concentración de sacarosa. La disolución de sacarosa cargada en primer lugar en la UC tenía una concentración de sacarosa del 50%. La disolución de sacarosa cargada en la UC inmediatamente después de la primera disolución de sacarosa tenía una concentración de sacarosa del 55% y la disolución de sacarosa cargada en último lugar en la UC tenía una concentración de sacarosa del 60%.

Se preparó un kilogramo de la disolución de sacarosa tamponada con una concentración de sacarosa del 50% mezclando 2,42 g de tris(hidroximetil)aminometano (trometamol) con 8,00 g de cloruro de sodio y 500,00 g de sacarosa. Se añadió API hasta casi 1 kg, usándose NaOH 1 M y HCl al 25% para ajustar el pH según fuese necesario. Luego se añadió API hasta 1 kg.

Se preparó un kilogramo de la disolución de sacarosa tamponada con una concentración de sacarosa del 55% mezclando 2,42 g de tris(hidroximetil)aminometano (trometamol) con 8,00 g de cloruro de sodio y 550,00 g de sacarosa. Se añadió API hasta casi 1 kg, usándose NaOH 1 M y HCl al 25% para ajustar el pH según fuese necesario. Luego se añadió API hasta 1 kg.

Se preparó un kilogramo de la disolución de sacarosa tamponada con una concentración de sacarosa del 60% mezclando 2,42 g de tris(hidroximetil)aminometano (trometamol) con 8,00 g de cloruro de sodio y 600,00 g de sacarosa. Se añadió API hasta casi 1 kg, usándose NaOH 1 M y HCl al 25% para ajustar el pH según fuese necesario. Luego se añadió API hasta 1 kg.

Se formó un gradiente de densidad durante la primera fase de UC en el que la velocidad de rotación se ajustó a 4.000 rpm y la temperatura se mantuvo a 2-10°C. Después de la primera fase, se aumentó la velocidad de rotación hasta 35.000 rpm y se aumentó la temperatura hasta 22°C. Durante esta segunda fase a velocidad y temperatura mayores, se separaron las partículas de AAV llenas a partir de las cápsides vacías. Después de aproximadamente 5 horas, se detuvo la ultracentrífuga y se recogieron las fracciones que contenían la mayor parte de las partículas de AAV llenas. A continuación, en las tablas 11 y 12, se proporcionan detalles adicionales relativos a la etapa de UC que se realizó, incluyendo los detalles sobre parámetros de entrada para la construcción del gradiente, la recogida de la fracción que contenía las partículas llenas, la tasa de elución, etc.

TABLA 11

Etapa del procedimiento		Parámetro / Material	Valor
General	Equipo		CC40S
	Equivalente de fermentación		200 l
	Volumen de núcleo		3,2 l
Carga	Secuencia de carga		Producto intermedio de UFB -> sac. al 50% -> sac. al 55% -> sac. al 60%
	Volumen de producto intermedio de UFB por ejecución		1,6 l
	Velocidad de flujo de alimentación de producto intermedio de UFB		6 l/h

	Velocidad de flujo de alimentación de disoluciones de sacarosa	1,5 l/h
	Volumen de sacarosa al 50%	400 ± 20 ml
	Volumen de sacarosa al 55%	200 ± 10 ml
	Volumen de sacarosa al 60%	200 ± 10 ml
	Concentración de sacarosa, sacarosa al 50%	50% ± 1%
	Concentración de sacarosa, sacarosa al 55%	55% ± 1%
	Concentración de sacarosa, sacarosa al 60%	60% ± 1%
	pH de tampones de sacarosa (50%, 55%, 60%)	7,4 +/- 0,3
Construcción del gradiente	Velocidad de rotación: aumento desde	0 rpm-4.000 rpm
	Tiempo para la construcción del gradiente	17-25 min
	Temperatura de cámara durante la construcción del gradiente	2-10°C
Aceleración	Velocidad de rotación: aumento desde	4.000-35.000 rpm
	Tiempo para la aceleración	5-60 min
	Temperatura de cámara durante la aceleración	2-10°C
Separación	Velocidad de rotación	35.000 ± 2.000 rpm
	Temperatura de cámara durante la separación	Objetivo: 22 +/- 2°C
	Duración de la separación	300 ± 30 min
Deceleración	Velocidad de rotación: disminución desde	35.000-4.000 rpm
	Tiempo para la deceleración	5-90 min
	Temperatura de cámara durante la deceleración	2-10°C
Detención lenta	Velocidad de rotación: disminución desde	4.000-0 rpm
	Tiempo para la detención lenta	15-30 min
	Temperatura de cámara durante la detención lenta	2-10°C
Fraccionamiento	Velocidad de flujo de elución	3 l/h
	Volumen de fracción	25-50 ml
	Volumen de agrupación pico (por lote de fermentación)	300-450 ml
	Densidad Brix al inicio de fracción	56,5-54
	Aumento al inicio de fracción (UV 254)	>0,004
	Fin de fracción (UV 254)	después de máximo de pico de UV254 y ninguna disminución de señal
	Densidad Brix al final de fracción	51
	Tiempo de espera después de UC - Temperatura	2-8°C
	Tiempo de espera después de UC - Tiempo	máx. 7 días
Tampón	pH y conductividad	Composición
Disolución de sacarosa al 50%	pH 7,4 ± 0,2 a 25°C	Tris 20 mM NaCl 8 g/kg sacarosa al 50%
Disolución de sacarosa al 55%	pH 7,4 ± 0,2 a 25°C	Tris 20 mM NaCl 8 g/kg sacarosa al 55%
Disolución de sacarosa al 60%	pH 7,4 ± 0,2 a 25°C	Tris 20 mM NaCl 8 g/kg sacarosa al 60%

TABLA 12

Etapa	Volumen	qPCR de ITR			ELISA de AAV			ELISA de HCP HEK293		
			Total	Rendimiento		Total	Rendimiento		Total	Rendimiento
	[ml]	(gv/ml)	(gv)	(%)	(µg/ml)	(mg)	(%)	(µg/ml)	(mg)	(%)
Carga	1600	7,8E+12	1,3E+16	100	206,4	330	100	95,9	153,44	100
Ejecución inicial	300	-	-	-	4,1	1	0	-	-	-
Agrupación de pico	250	1,6E+13	3,9E+15	31	83,7	21	6	<0,5	0,125	0,08147
Cápsides principalmente vacías	350	-	-	-	719,6	252	76	-	-	-
Ejecución final	2300	-	-	-	10,7	25	7	-	-	-

Etapa	Volumen	PCR de ADN de HEK293			Biopotencia <i>in vitro</i>	WAX
			Total	Rendimiento		
	[ml]	(ng/ml)	(µg)	(%)	(BPU)	(% de área de pico 2)
Carga	1600	5	8	100	0,65	n.d.
Ejecución inicial	300	-	-	-	-	-
Agrupación de pico	250	1,35	0,3375	0,10	1,25	82%
Cápsides principalmente vacías	350	-	-	-	-	-
Ejecución final	2300	-	-	-	-	-

5 El patrón de elución se presenta en la figura 8 y la tinción con plata y las inmunotransferencias de tipo Western de las fracciones de carga e individuales se presentan en la figura 9. Tal como se muestra en la tabla 12, el 82% de las partículas en la agrupación de pico se consideran como partículas llenas.

10 Descripción de la tinción con plata

Gel de Bis-Tris Midi al 4-12% de NuPAGE 1,0 mm. 20 pocillos. N.º de cat. WG1402BX10

Tampón de ejecución MES SDS. Invitrogen. N.º de cat. NP0002

15

Incubación con SB+DTT 10 min a 70°C. Enfriamiento durante 10 min, tratamiento con JAA

Descripción de inmunotransferencia de tipo Western

20 Gel de Bis-Tris Midi al 4-12% de NuPAGE 1,0 mm. 20 pocillos. N.º de cat. WG1402BX10

Tampón de ejecución MES SDS. Invitrogen. N.º de cat. NP0002

25

Incubación con SB+DTT 10 min a 70°C. Enfriamiento durante 10 min, tratamiento con JAA

1º anticuerpo: AcM contra VP1, VP2 y VP3 de AAV (virus adenoasociado)

Cromatografía de afinidad de proteína A

30

PROGEN61058

2º anticuerpo: anticuerpo de cabra anti-ALP de ratón

SIGMA A4656 1:2000 1 h

35

EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra un ejemplo de método de inactivación de virus con envuelta lipídica y una etapa de pulido.

Se agruparon las fracciones que contienen AAV8 obtenidas tras la etapa de UC del ejemplo 7 y se diluyeron 1:2,5 con un tampón de equilibrado (Tris 50 mM; pH 8,5±0,2). Se realizó un tratamiento con un detergente disolvente (tri-n-butilfosfato al 0,3%; Triton X100 al 1,0%; polisorbato 80 al 0,3%). Posteriormente se ajustó la conductividad del disolvente a 3,6±0,2 mS/cm con una dilución 1:2 adicional. Se cargó la disolución resultante sobre una columna de cromatografía que contenía Fractogel® EMD TMAE (M) (n.º de cat. De Merck-Millipore: 116881), d.i. de 22 mm, altura de lecho de 57 mm (Merck-Millipore Vantage VL 22x250. N.º de cat.: 96220250), y luego se lavó con tampón de equilibrado (Tris 50 mM, pH 8,5±0,2). Se realizó una segunda etapa de lavado con un tampón (Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5%). La elución de la columna se llevó a cabo mediante un gradiente de NaCl de 12 volúmenes de columna, desde un primer tampón de elución que comprende Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5% hasta un último tampón de elución que comprende Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5% + NaCl 600 mM. La cantidad principal del AAV8 eluye como un pico agudo distinto y se recogió como E2 (eluato 2) que representa el producto de AAV8 purificado. La columna se limpió finalmente con cloruro de sodio 2 M seguido de un procedimiento de regeneración. Las tablas 13 y 14 detallan estas etapas y el rendimiento obtenido después de realizar estas etapas. La figura 10 es el pulido final de AAV8 sobre Fractogel TMAE.

TABLA 13

Etapa	Tampón	Entrada	Velocidad de flujo	CV	Salida	Fracción
Activación de gel	TWA-tampón	A13	60 cm/h	5	F1	Residuo
Equilibrado	T50EQ-tampón	A11		10	F1	Residuo
Carga de muestra con sensor de aire	Muestra-Carga	A2		---	F3	ABS
Reequilibrado	T50EQ-tampón	A11		10	F3	ABS
Lavado	Fractogel-tampón de equilibrado	A12		10	F4	FRACCIÓN DE LAVADO
Elución: gradiente desde A12 hasta B1 en 12 CV	Fractogel-tampón de equilibrado	A12		12	F2 (frac.)	Diversa
	Tampón de elución	B1				
Elución:	Tampón de elución	B1 (100%)		3	F2 (frac.)	Diversa

TAMPÓN	
T50EQ-tampón	Tampón de equilibrado Tris 50 mM pH 8,5±0,2
Fractogel-tampón de equilibrado	Fosfato de sodio 20 mM / cloruro de potasio 2,68 mM / pH 8,0±0,2 + sorbitol al 5%
Tampón de elución	Fosfato de sodio 15 mM / fosfato de potasio 5 mM / cloruro de potasio 2,68 mM / NaCl 600 mM / pH 7,4±0,2 + sorbitol al 5%

TABLA 14

RENDIMIENTO

	Volumen (g)	qPCR de FVIII			ELISA de AAV8			Razón de ADN/AAV gv/µg
		gv/ml	gv	%	µg/ml	µg	%	
L Dil	611,91	3,25E+12	1,99E+15	100,00	17,542	10734,04	100,0	1,85E+11
E	32,86	4,59E+13	1,51E+15	75,84	273,857	8998,94	83,84	1,68E+11
Producto a granel	59,34	1,89E+13	1,12E+15	74,36	122,89	7292,29	81,04	1,54E+11

	Volumen (g)	ELISA de HCP HEK293			ADN de HEK ng/ml	Razón de ADN/AAV gv/µg
		µg/ml	µg	%		
L Dil	611,91	<0,2	<122,38	---	---	<0,01

E	32,86	---	---	---	---	---
Producto a granel	59,34	<0,1	<5,93	---	2,8	<0,01

L Dil es la agrupación diluida a partir de la ultracentrifugación antes del tratamiento con DD y la tasa de dilución final; E es el eluato a partir de la columna de AEX; el producto a granel es el eluato diluido 1:2 a partir de la columna de AEX. El producto a granel es el producto formulado antes de la dilución para dar el producto farmacéutico final (FDP)

EJEMPLO 9

Este ejemplo demuestra un ejemplo de método de purificación de AAV a partir de fracciones no purificadas que comprende una etapa de ultracentrifugación durante la cual se forma un gradiente de densidad.

La figura 11 es un esquema de las etapas llevadas a cabo en el método a modo de ejemplo. La etapa de ultracentrifugación se realizó usando un núcleo con una capacidad para 3,2 l de volumen (1,6 l de producto + 1,6 l de gradiente / tampón TBS).

Con la UC en reposo, se cargaron los 1,6 l de material de partida (producto intermedio a partir de la etapa previa de procedimiento = UFB) en el rotor con una velocidad de flujo constante de 6 l/h seguido de la carga de 3 disoluciones de sacarosa de densidad variable. Se cargaron las disoluciones de sacarosa con una velocidad de flujo constante de 1,5 l/h en el siguiente orden: 800 ml de sacarosa al 50%, 400 ml de sacarosa al 55% y 400 ml de sacarosa al 60%.

Se aceleró el rotor llenado desde 0 hasta 4.000 rpm con el fin de lograr el modo zonal para construir un gradiente de sacarosa con densidad creciente, seguido de una segunda aceleración de desde 4.000 hasta 35.000 rpm. La UC se desarrolla a 35000 rpm (aproximadamente 90.000 g-fuerza) durante 5 horas. Una vez se logró la velocidad final, se cambió la temperatura desde +4°C hasta +22°C. Las partículas de AAV8 contenidas en el material de partida se mueven en el gradiente de sacarosa hasta alcanzar un punto en el que su densidad coincide con la densidad del gradiente circundante. Dado que las cápsides llenas y vacías difieren en cuanto a su densidad, se usa esta característica para la separación de cápsides de virus llenas a partir de las vacías. Una hora antes de finalizar la etapa de centrifugación, se cambió manualmente la temperatura desde +22°C hasta +4°C. La detención de la UC desde 35.000 hasta 0 rpm se realizó en 2 etapas: desde 35.000 hasta 4.000 rpm mediante deceleración y desde 4.000 rpm hasta 0 rpm dejando detenerse el rotor lentamente.

El producto se recuperó con una velocidad de flujo de 6 l/h recogiendo fracciones de 25 ml así como una fracción de residuo al final de la elución.

La recogida de las fracciones, cada una de 25 ml, empieza con la fracción 7 y finaliza al comienzo del pico de residuo. El primer pico en la figura 12 a una mayor densidad de sacarosa representa las "cápsides llenas". El segundo pico representa las "cápsides principalmente vacías".

Se agruparon las fracciones F10 a F14 y se purificaron adicionalmente sobre Fractogel® EMD TMAE (M) como "cápsides llenas" de AAV8 convencionales del mismo modo que las demás fracciones que contienen AAV8. La tabla 15 proporciona los detalles de la etapa de cromatografía sobre TMAE y la tabla 16 detalla los tampones usados.

TABLA 15

Etapa	Tampón	Cantidad	Velocidad de flujo
1	Equilibrado 1	TWA (NaCl 2 M)	5
2	Equilibrado 2	T50EQ	10
3	Carga de producto	Agrupación de UC diluida sometida a tratamiento con	100-300 ml
			Cond.: 2,5-4,5 mS/cm
			pH 8,3-8,7
			Sin filtración
4	Lavado 1		20
5	Lavado 2		10
6	Elución	Gradiente 0-100% Chat_EL en Chat_A	12
	Recogida de agrupaciones		Inicio: UV280 > 0,02 UA Fin al 17% de disminución del máx. de pico (UV280)
7	Regeneración		x

TABLA 16

Tampón	Contenido de tampón	pH	Conductividad
Equilibrado 1	NaCl 2 M	n.d.	140-172 mS/cm / 25°C
Equilibrado 2 y lavado 1	Tris-HCl 50 mM	8,5 ± 0,2	1-2 mS/cm / 25°C
Lavado 2	Na ₂ HPO ₄ 8,09 mM; KH ₂ PO ₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5%	7,4 ± 0,2	1-2 mS/cm / 25°C
Elución	Na ₂ HPO ₄ 8,09 mM; KH ₂ PO ₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5% + NaCl 600 mM	7,4 ± 0,2	51-55 mS/cm / 25°C

Se aplicaron por separado aproximadamente 25 ml de una fracción de ultracentrifugación individual a una columna de TMAE de 4 ml mediante una dilución de 1:2,5 con el tampón de equilibrado Tris 50 mM, pH 8,5 ± 0,2. Después del tratamiento con detergente disolvente en presencia de tri-n-butilfosfato al 0,3%, Triton X-100 al 1% y polisorbato 80 al 0,3%, se ajustó la conductividad a 3,6 ± 0,2 mS/cm con una dilución 1:2 adicional y se aplicó la disolución que contenía AAV8 a una columna de cromatografía que contenía Fractogel® EMD TMAE (M) (Merck-Millipore, n.º de cat. 116881), d.i. de 10 mm, altura de lecho de 50 mm ± 5 mm (Merck-Millipore Vantage VL 10 x 250 o similar) seguido de una primera etapa de lavado con tampón de equilibrado Tris 50 mM, pH 8,5 ± 0,2 y una segunda etapa de lavado con Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5%, pH 7,4. La elución se lleva a cabo mediante un gradiente de 12 volúmenes de columna desde Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5%, pH 7,4 hasta Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5% + NaCl 600 mM, pH 7,4. La cantidad principal del AAV8 eluye como un pico agudo distinto y se recogió como E2 (eluato 2) que representa el producto de AAV8 purificado. Se diluyó 1:2 el eluato E2 que contenía AAV8 obtenido (eluato 2) con Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5% + NaCl 600 mM pH 7,4 para ajustarse a la matriz del tampón de formulación (Na₂HPO₄ 8,09 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; sorbitol al 5% + NaCl 350 mM, pH 7,4). Finalmente se limpió la columna con cloruro de sodio 2 M seguido de un procedimiento de regeneración. El sistema de cromatografía se colocó a una temperatura ambiental de +18°C a +25°C.

Se analizaron las fracciones 10 a 21 con ultracentrifugación analítica (AUC) y se realizó un análisis de ADN de vectores de AAV8 (que contienen factor IX Padua bicatenario (4,8 kb)) mediante electroforesis en gel de agarosa nativa y electroforesis en gel de agarosa alcalina. Las figuras 13-16 muestran los datos analíticos de fracciones individuales obtenidas mediante UC después del pulido sobre TMAE. La figura 14 es una fotografía de una agarosa al 1% nativa y la figura 15 es una fotografía de una agarosa al 0,8% alcalina. Tal como se muestra en la figura 15, las fracciones X10 a X14 agrupadas del pico de UV obtenido a mayor densidad de sacarosa en la ultracentrifugación contenían una única banda de ADN individual muy pura sin ningún rastro adicional de variantes de ADN más pequeñas del ADN de vector.

Los datos de la UC analítica se proporcionan en la tabla 17.

TABLA 17

Número de fracción	vacías (50S)	parcialmente llenas	llenas (80S)
F10-14	4%	0%	96%
F15	6%	1%	93%
F16	16%	0%	85%
F17	21%	0%	79%
F18	29%	23%	48%
F19	41%	35%	24%
F20	52%	43%	5%
F21	60%	38%	3%
F25	82%	17%	1%
F26	81%	18%	2%

Las fracciones n.ºs 22, 23 y 24 no se analizaron

Tal como se muestra en la tabla 17, las fracciones 10-15 contenían las cantidades más altas de cápsides de AAV llenas. Aunque se encontraron cantidades sustanciales de cápsides llenas en las fracciones 16 y 17, las cantidades eran ligeramente menores y la cantidad de cápsides vacías aumenta, en relación con las fracciones 10-15. En las fracciones 19 y 20 se observaron una disminución adicional en la cantidad de cápsides llenas y un aumento adicional en las cápsides vacías.

La figura 16 muestra datos para BDS individual a partir de las fracciones de UC indicadas. Estos resultados muestran un producto de AAV8 homogéneo a partir de las fracciones 10 a 15 de UC sin detección de contenido de ADN de vector incompleto en AUC y electroforesis en gel de agarosa. El ADN de vector incompleto aparece a partir de la fracción 17 y se detectó en las fracciones posteriores de la zona de "cápsides principalmente vacías". La detección de vectores incompletos fue sorprendente porque no se esperaba tener un intervalo de resolución tan

amplio. Por tanto, el método de separación desarrollado no se limita a resolver cápsides que están completamente vacías (es decir, sin ADN) a partir de las que comprenden “llenas”, sino que, sorprendentemente, también permite la separación de ADN de vector de longitudes variables que no pueden resolverse unas de otras. También es una indicación de que hay una importante separación de “cápsides llenas” a partir de “cápsides vacías” independientemente de la longitud del ADN en la población de “cápsides vacías”. Dicho de otro modo, este método permite el agotamiento de vectores vacíos (incluyendo ADN truncado e incompleto) para obtener AAV con un alto contenido de cápsides de AAV llenas.

EJEMPLO 10

Este método describe un ejemplo de método de nanofiltración para la retirada de virus más grandes que AAV y más grandes que el tamaño de poro del nanofiltro aplicado.

Se somete a ensayo un filtro PLANOVA de 35 nm de Asahi, que contiene haces de fibras huecas microporosas construidas de celulosa hidrófila natural regenerada con cobre-amonio con un estrecho intervalo de tamaño de poro de 35 nm +/- 2 nm, con un ensayo de integridad frente a fugas para confirmar que el filtro está libre agujeros pequeños o defectos grandes y se lava previamente con tampón de formulación. Luego se toma el eluato de intercambio aniónico y se filtra a presión constante no superando los 0,1 Mpa en un modo de punto muerto a través del nanofiltro. Alternativamente, el filtro también puede ejecutarse en un método de flujo tangencial. El eluato de intercambio aniónico puede diluirse previamente con tampón de elución (PBS + NaCl 600 mM) para ajustar la concentración de las partículas de virus. Con el fin de recuperar todas las partículas de virus, el nanofiltro se lava posteriormente con tampón (por ejemplo, tampón de formulación). Los ensayos de integridad posterior del nanofiltro se realizan con el ensayo de fugas y un ensayo de partículas de oro para determinar que la distribución de tamaño de poro del nanofiltro no ha cambiado y que el nanofiltro conservaba su integridad durante la filtración. Una mayor carga de muestra da como resultado un mayor rendimiento. Por tanto, normalmente se aplican más de 50 l de disolución por m² de área de filtro.

EJEMPLO 11

Este método describe un ejemplo de método de nanofiltración para la retirada de virus más grandes que AAV y más grandes que el tamaño de poro del nanofiltro aplicado.

Se sometió a ensayo un filtro PLANOVA de 35 nm de Asahi, que contiene haces de fibras huecas microporosas construidas de celulosa hidrófila natural regenerada con cobre-amonio con un estrecho intervalo de tamaño de poro de 35 nm +/- 2 nm, con un ensayo de integridad frente a fugas para confirmar que el filtro está libre agujeros pequeños o defectos grandes y se lavó previamente con tampón de formulación. Luego, se diluyeron en primer lugar 4,05 ml de las fracciones agrupadas que comprendían 2870,98 µg/ml de AAV8 (concentración determinada mediante ELISA) en 4,05 de un tampón de KH₂PO₄ 1,47 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,09 mM, NaCl 600 mM y sorbitol al 5%, a pH 7,4. El factor de dilución fue de 1:2. Luego, se diluyeron 8,10 gramos de la primera dilución en 61,57 gramos de un tampón de KH₂PO₄ 1,47 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,09 mM, NaCl 350 mM y sorbitol al 5%, a pH 7,4, para producir un tampón de carga. El factor de dilución del tampón de carga fue de 1:8,6 en comparación con la primera dilución y de 1:17,2 en comparación con las fracciones agrupadas.

Se acondicionó el nanofiltro con 25 ml de un tampón que comprendía KH₂PO₄ 1,47 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,09 mM, NaCl 350 mM y sorbitol al 5%, a pH 7,4. Durante el acondicionamiento, se usaron 10 ml del tampón para purgar el filtro sin presión aplicada y con la salida de fracción retenida abierta. Luego, se filtraron aproximadamente 15 ml del tampón a través de las fibras huecas, con 0,9 bar de presión constante aplicada y la salida de fracción retenida cerrada.

Luego, se aplicaron 9 ml de un tampón de lavado al tanque de depósito a 0,9 bar de presión constante. El tampón de lavado comprendía KH₂PO₄ 1,47 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,09 mM, NaCl 350 mM y sorbitol al 5%, a pH 7,4. Luego se tomaron muestras después del lavado. Después de tomar muestras, luego se filtraron 60 gramos del tampón de carga anterior a presión constante de 0,9 bar en un modo de punto muerto a través del nanofiltro.

Los datos a partir de la filtración se presentan en la tabla 18 a continuación. El rendimiento de AAV a partir de la filtración es de al menos el 77%.

TABLA 18

Código de muestra:	Volumen [g] o [ml]	ELISA de AAV Gatterning total (µg)	Rendimiento de ELISA de AAV Gatterning (%)	ELISA de AAV Weber (partículas/ml)	ELISA de AAV Weber (partículas)	Rendimiento de ELISA de AAV Weber (%)	AAV de carga [mg] bzw. [g/m ²]
--------------------	--------------------	------------------------------------	--	------------------------------------	---------------------------------	---------------------------------------	--

AV_meC_NFA_04A_AGRUPACIÓN	4,05	10955,747	---	9,19E+14	3,72E+15	---	---
AV_meC_NFA_04A_CARGA	60,00	10111,686	100,00	5,35E+13	3,21E+15	100,00	10,112
AV_meC_NFA_04A_NF	60,25	7659,631	75,75	4,13E+13	2,49E+15	77,52	---
AV_meC_NFA_04A_LAVADO	9,34	601,920	5,95	2,09E+11	1,95E+12	0,06	---
AV_meC_NFA_04A_PRODUCTO A GRANEL	66,63	8392,144	82,995	3,73E+13	2,49E+15	77,424	---

EJEMPLO 12

El siguiente ejemplo describe un ejemplo de método de ensayo de la biopotencia de un producto de AAV8.

5 En el ensayo de biopotencia *in vitro*, el vector viral AAV8-FIX transfecta una línea de células diana hepáticas, que posteriormente secreta proteína FIX funcional medible al medio.

10 En una primera etapa, se transducen células diana HepG2 mediante AAV8-FIX. Durante el tiempo de incubación, se libera FIX al sobrenadante celular. En una segunda etapa, se mide directamente la actividad de factor IX del sobrenadante de cultivo celular mediante un ensayo cromogénico de FIX. La medición de una muestra de AAV8-FIX se proporciona como porcentaje en relación con un material de referencia. El método permite una evaluación cuantitativa de la función biológica del vector de terapia génica AAV8-FIX.

EJEMPLO 13

Este ejemplo demuestra un ELISA específico de AAV.

20 En los ejemplos anteriores, se llevó a cabo un ELISA específico de AAV después de las etapas del procedimiento de la presente divulgación para identificar que fracciones contienen AAV y calcular la razón de ADN/AAV o "actividad específica" del AAV que está representada por la razón de qPCR con respecto a μg de AAV8. La razón de ADN/AAV refleja el ADN de vector encapsulado en las partículas de AAV.

25 Se llevó a cabo un ELISA de AAV8 con un kit de ELISA de titulación de AAV-8 (n.º de art. PAAVR8; Progen (Heidelberg, Alemania) en un sistema TECAN Robot. Brevemente, con un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo conformacional en cápsides de AAV8 ensambladas (ADK8) se recubrieron tiras de microtitulación, y se usó para capturar partículas de AAV8 a partir de la fracción de AAV. Las partículas de AAV8 capturadas se detectaron mediante dos etapas. En una primera etapa, un anticuerpo monoclonal conjugado con biotina específico para el anticuerpo contra ADK8 se unió al inmunocomplejo (de ADK8 y anticuerpo contra ADK8). Se añadieron conjugados de estreptavidina-peroxidasa a los inmunocomplejos unidos al anticuerpo monoclonal conjugado con biotina, y los conjugados de estreptavidina-peroxidasa reaccionaron con la biotina. Se añadió una disolución de sustrato de peroxidasa y se produce una reacción de color que es proporcional a la cantidad de partículas de AAV unidas. La reacción de color se mide fotométricamente a 450 nm.

35 El ELISA determina la cantidad de partículas de AAV8 presentes en la fracción sometida a ensayo.

EJEMPLO 14

40 Este ejemplo demuestra un ejemplo de método de separación de partículas de AAV vacías a partir de llenas a través de ultracentrifugación usando una disolución de carga tamponada de etilenglicol al 50% y gradiente de sacarosa al 50% (es decir, razón 1:1). Mediante esta etapa también se eliminan las impurezas relacionadas con el producto como "cápsides vacías" y proteínas de células huésped tales como HSP70 y LDH.

45 Se cargó en la ultracentrífuga (UC) la disolución tamponada de etilenglicol (50% (p/p) en Tris-HCl/NaCl) que comprendía AAV8, con factor de coagulación humano VIII (longitud completa ~4,8 kb), seguido de un gradiente de sacarosa formado por dos disoluciones de sacarosa diferentes que varían en cuanto a concentración de sacarosa. La razón de muestra cargada con respecto a gradiente de sacarosa es de 1:1. La disolución de sacarosa cargada en primer lugar en la UC tenía una concentración de sacarosa del 55%. La disolución de sacarosa cargada en la UC inmediatamente después de la primera disolución de sacarosa tenía una concentración de sacarosa del 60%.

50 Se preparó un kilogramo de la disolución de sacarosa tamponada con una concentración de sacarosa del 55% mezclando 2,42 g de tris(hidroximetil)aminometano (trometamol) con 8,00 g de cloruro de sodio y 550,00 g de sacarosa. Se añadió API hasta casi 1 kg, usándose NaOH 1 M y HCl al 25% para ajustar el pH según fuese necesario. Luego se añadió API hasta 1 kg.

Se preparó un kilogramo de la disolución de sacarosa tamponada con una concentración de sacarosa del 60% mezclando 2,42 g de tris(hidroximetil)aminometano (trometamol) con 8,00 g de cloruro de sodio y 600,00 g de sacarosa. Se añadió API hasta casi 1 kg, usándose NaOH 1 M y HCl al 25% para ajustar el pH según fuese necesario. Luego se añadió API hasta 1 kg.

En este ejemplo, se usó un núcleo de 3.200 ml, en el que la disolución tamponada de etilenglicol al 50% que contenía AAV8 eran 1.600 ml, la disolución de sacarosa al 55% (p/p) eran 800 ml y la disolución de sacarosa al 60% (p/p) eran 800 ml.

Se formó un gradiente de densidad durante la primera fase de UC en el que la velocidad de rotación se ajustó a 4.000 rpm y la temperatura se mantuvo a 2-10°C. Después de la primera fase, se aumentó la velocidad de rotación hasta 35.000 rpm y se aumentó la temperatura hasta 22°C. Durante esta segunda fase a velocidad y temperatura mayores, se separaron las partículas de AAV llenas a partir de las cápsides vacías. Después de 20 horas, se detuvo la ultracentrifuga y se recogieron las fracciones que contenían la mayor parte de las partículas de AAV llenas.

Los resultados se muestran en la figura 19, en la que las cápsides llenas (fracciones 1-6) se resuelven a partir de las cápsides vacías (fracciones 8-17).

La figura 20 es una superposición de gráficos de coeficiente de sedimentación a partir de las fracciones 8-10 que demuestra la separación de subespecies (es decir, ADN de vector incompleto). La flecha indica un desplazamiento hacia AAV8 con menor peso desde fracciones con mayor densidad hasta fracciones con menor densidad en el gradiente de UC (es decir, densidad: fracción 8 > fracción 9 > fracción 10). Esta es una demostración adicional de que, con este protocolo, el ADN de vector puede separarse basándose en el tamaño con una resolución apropiada. Véase también la tabla 19.

TABLA 19

	WAX [%] llenas	WAX [%] vacías	Área AUC [%] vacías (50S)	Área AUC [%] producto intermedio 1 (60S)	Área AUC [%] llenar (70-80S)
Fracciones 01 a 06 agrupadas	95	5	5,6	4,3	79,2
Fracción 08	80	20	1,5	7,4	87,5
Fracción 09	65	35	16,7	2,2	81,1
Fracción 10	40	60	57,6	1,8	40,6

EJEMPLO 15

Este ejemplo demuestra la ultracentrifugación usando un gradiente de sacarosa, usando el método de disoluciones de sacarosa del 50-55-60%. El método es el mismo tal como se indica en el ejemplo 7, excepto que las partículas de AAV8 contenían ADN de vector monocatenario de factor de coagulación humano IX Padua (2,6 kB). Tal como se indica en la figura 21, la separación entre cápsides llenas frente a vacías no se resuelve tanto como indica la superposición de qPCR de ITR y ELISA de AAV.

EJEMPLO 16

Este ejemplo demuestra la ultracentrifugación usando un gradiente de sacarosa, usando el método de disoluciones de sacarosa del 55-60 tal como se describe en el ejemplo 6, excepto que se usó un total de 7.700 ml de volumen de núcleo. Por tanto, el volumen de carga fue de 6.100 ml en disolución tamponada con Tris-HCl de etilenglicol al 50%, el volumen de disolución de sacarosa al 55% fue de 800 ml y el de la disolución de sacarosa al 60% también fue de 800 ml. El perfil de elución por ultracentrifugación se representa en la figura 22. En este caso, no hay "picos de residuo" porque el AAV está muy purificado. El AAV8 lleno se recoge a partir de las fracciones 1-8 (50 ml cada una). El AAV "vacío" se recoge a partir de las fracciones 9-15 (50 ml cada una). También se recogen fracciones adicionales 15-21 (100 ml cada una). El primer pico en la figura 22 a una mayor densidad de sacarosa representa las "cápsides llenas". El segundo pico representa las "cápsides vacías".

Debe interpretarse que el uso de los términos "un" y "uno/a" y "el/la" y referentes similares en el contexto de describir la divulgación (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Debe interpretarse que los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" son términos abiertos (es decir, significan "que incluye, pero sin limitarse a") a menos que se indique lo contrario.

Se pretende que la recitación de intervalos de valores en el presente documento sirva simplemente como método

abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente que se encuentre dentro del intervalo y a cada punto de extremo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor independiente y punto de extremo se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento.

5

Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. Se pretende que el uso de cualquiera y la totalidad de los ejemplos, o el lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en el presente documento simplemente ilustre mejor la divulgación y no suponga una limitación del alcance de la divulgación a menos que se reivindique lo contrario. No debe interpretarse que el lenguaje en la memoria descriptiva indique que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la divulgación.

10

En el presente documento se describen realizaciones preferidas de esta divulgación, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la divulgación. Variaciones de esas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los expertos habituales en la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la divulgación se ponga en práctica de manera distinta a la descrita específicamente en el presente documento.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Método de purificación de cápsides de virus adenoasociado (AAV) llenas a partir de una fracción de AAV concentrada que comprende cápsides de AAV vacías y cápsides de AAV llenas, que comprende:

(i) cargar en un rotor zonal a) la fracción de AAV concentrada y b) al menos dos disoluciones de azúcar, cada una de las cuales tiene una concentración de azúcar diferente y cada una de las cuales comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde el 45% (p/p) hasta el 65% (p/p) de sacarosa,

(ii) hacer funcionar una ultracentrífuga que comprende el rotor zonal en modo discontinuo, mediante lo cual se forma un gradiente de azúcar,

(iii) obtener una fracción del gradiente de azúcar para obtener una fracción de AAV en la que al menos el 60% de las partículas de AAV en la fracción de AAV son cápsides de AAV llenas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que (A) el volumen de las disoluciones de azúcar es mayor de o igual a aproximadamente el 50% del volumen del rotor zonal, (B) el volumen total de las disoluciones de azúcar y la fracción de AAV es menor de o igual al volumen del rotor zonal, (C) la razón del volumen de las disoluciones de azúcar con respecto al volumen de la fracción de AAV es menor de o igual a uno, o (D) una combinación de los mismos.
3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que cada disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 50% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa.
4. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que cada disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 55% (p/p) hasta aproximadamente el 60% (p/p) de sacarosa.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que una disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, en el que una segunda disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa, y opcionalmente en el que una tercera disolución de azúcar comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que se cargan dos disoluciones de azúcar en el rotor zonal.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que se cargan al menos tres disoluciones de azúcar en el rotor zonal.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 ó 7, en el que se cargan tres disoluciones de azúcar en el rotor zonal.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que, en la etapa (i), la fracción de AAV concentrada se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, y en el que la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5, 7 u 8, en el que, en la etapa (i), la fracción de AAV concentrada se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa, en el que la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 47% (p/p) hasta aproximadamente el 53% (p/p) de sacarosa se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa, y en el que la disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a

una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 52% (p/p) hasta aproximadamente el 58% (p/p) de sacarosa se carga antes de una disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa que oscila desde aproximadamente el 57% (p/p) hasta aproximadamente el 63% (p/p) de sacarosa.

- 5 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que cada disolución de azúcar se carga:
 - (i) en el rotor zonal en volúmenes iguales;
 - 10 (ii) con la concentración de azúcar más pequeña cargada en el rotor zonal a un volumen que es el doble del volumen de al menos una de las otras disoluciones de azúcar en el rotor zonal;
 - 15 (iii) con la concentración de azúcar más pequeña cargada en el rotor zonal a un volumen que es al menos el volumen de las otras disoluciones de azúcar combinadas en el rotor zonal;
 - 20 (iv) con la concentración de azúcar más pequeña cargada en el rotor zonal a un volumen que es al menos el doble del volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande, opcionalmente, en el que el volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar más grande es igual al volumen de la disolución de azúcar con la concentración de azúcar intermedia;
 - 25 (v) con la concentración de azúcar más pequeña cargada en el rotor zonal a un volumen que es al menos el doble del volumen de al menos otra disolución de azúcar en el rotor zonal;
 - (vi) con la concentración de azúcar más pequeña a un volumen que es el mismo volumen de al menos otra disolución de azúcar en el rotor zonal; y/o
 - (vii) con la concentración de azúcar más pequeña cargada en el rotor zonal a un volumen que es la mitad del volumen de la fracción de AAV concentrada.
- 30 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la razón del volumen del gradiente de azúcar total con respecto al volumen de la fracción de AAV cargada en el rotor zonal es de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1:5.
- 35 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la fracción de AAV comprende una disolución tamponada.
- 40 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada disolución de azúcar comprende:
 - (i) un disacárido o trisacárido;
 - (ii) sacarosa, maltosa, lactosa, o combinaciones de las mismas; y/o
 - 45 (iii) sacarosa.
- 50 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada una de las disoluciones de azúcar y/o la fracción de AAV:
 - (i) comprende Tris-HCl a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mM y NaCl a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 1 M; y/o
 - (ii) tiene un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0.
- 55 16. Método según la reivindicación 15, en el que el Tris-HCl está a una concentración de 20 mM a 50 mM.
- 60 17. Método según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que el NaCl está a una concentración de 150 mM a 750 mM o de 150 mM a 500 mM.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 15-17, en el que el pH es de 7,4 a 8,5.
- 60 19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 15-17, en el que la fracción de AAV comprende el 45-55% (p/p) de etilenglicol.
- 65 20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 15-17, en el que la fracción de AAV comprende el 40%, el 41%, el 42%, el 43%, el 44%, el 45%, el 46%, el 47%, el 48%, el 49%, el 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59% o el 60% (p/p) de etilenglicol.

21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 15-17, en el que la disolución tamponada comprende el 45-55% (p/p) de etilenglicol.
- 5 22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 15-17, en el que la disolución tamponada comprende el 40%, el 41%, el 42%, el 43%, el 44%, el 45%, el 46%, el 47%, el 48%, el 49%, el 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59% o el 60% (p/p) de etilenglicol.
- 10 23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
(i) hacer funcionar la ultracentrífuga a una primera velocidad de rotación de menos de 10.000 rpm durante menos de 60 minutos, y a una segunda velocidad de rotación dentro del intervalo de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 40.000 rpm durante al menos 4 horas; o
15 (ii) hacer funcionar la ultracentrífuga a una primera velocidad de rotación de menos de 10.000 rpm durante menos de 60 minutos, y a una segunda velocidad de rotación dentro del intervalo de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 40.000 rpm durante al menos 12 horas.
- 20 24. Método según la reivindicación 23, en el que la primera velocidad de rotación es de aproximadamente 3.000 rpm a aproximadamente 6.000 rpm, opcionalmente, de aproximadamente 4.000 rpm.
- 25 25. Método según la reivindicación 23 o la reivindicación 24, en el que la segunda velocidad de rotación es:
(i) de aproximadamente 35.000 rpm y opcionalmente se mantiene durante de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas; o
(ii) de aproximadamente 35.000 rpm y opcionalmente se mantiene durante de aproximadamente 16 a aproximadamente 20 horas.
- 30 26. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 23-25, en el que la segunda velocidad de rotación se mantiene durante al menos aproximadamente 16 horas o al menos 20 horas.
- 35 27. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fracción de AAV concentrada cargada en el rotor zonal comprende al menos 1×10^{12} cápsides de AAV por ml.
- 40 28. Método de producción de un producto de AAV que comprende (i) transfectar células huésped con un gen o ADNc de interés, (ii) recoger un sobrenadante de un cultivo celular que comprende las células huésped transfectadas, y (iii) llevar a cabo un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-25.
- 45 29. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende una primera disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 55%, una segunda disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 60%, y opcionalmente una tercera disolución de azúcar que comprende un azúcar a una concentración equivalente a una concentración de sacarosa de aproximadamente el 50%.
- 50 30. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el AAV es AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10.

FIGURA 1

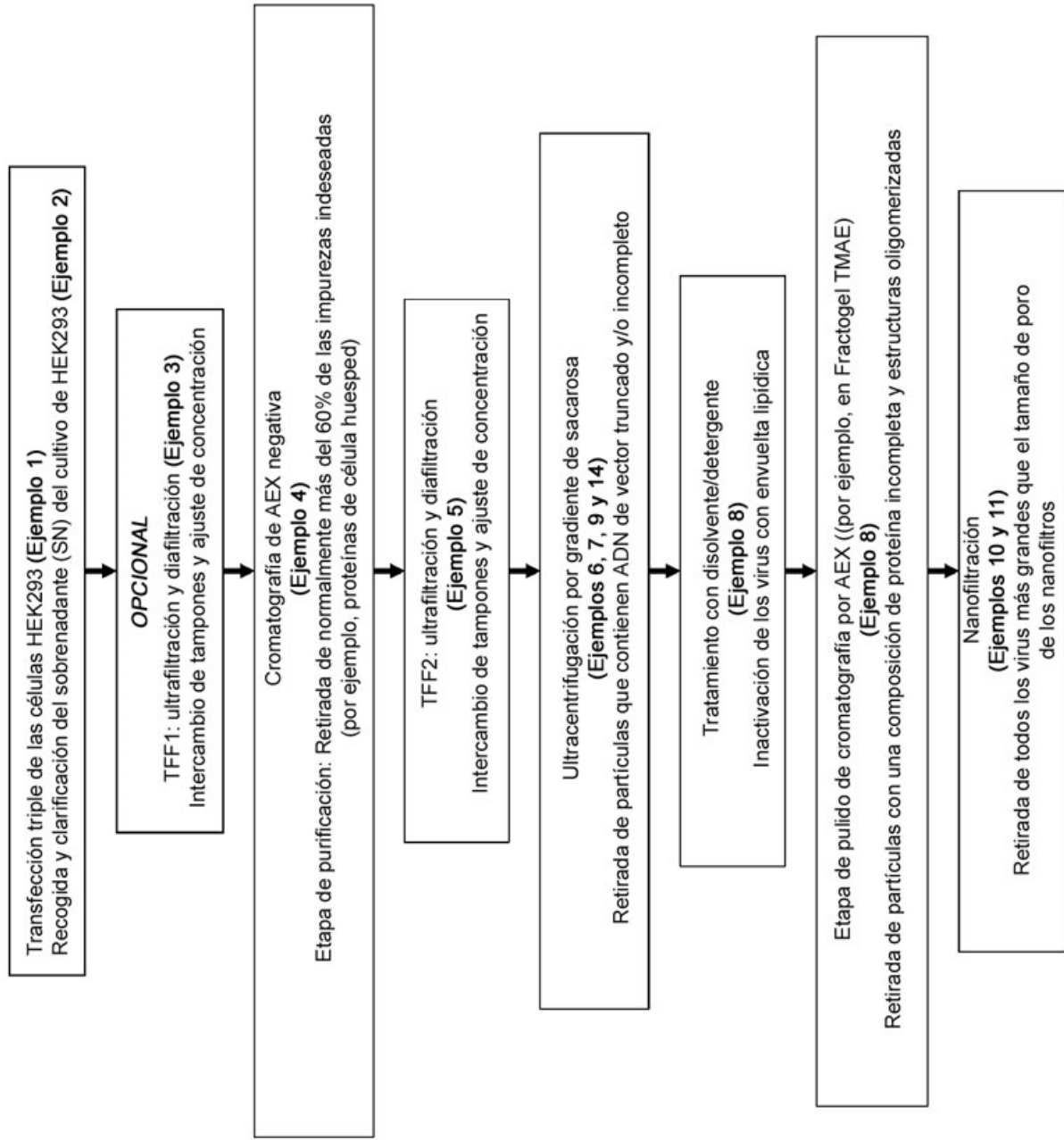


FIGURA 2

Genomas de vector (sobrenadante): qPCR de FIX

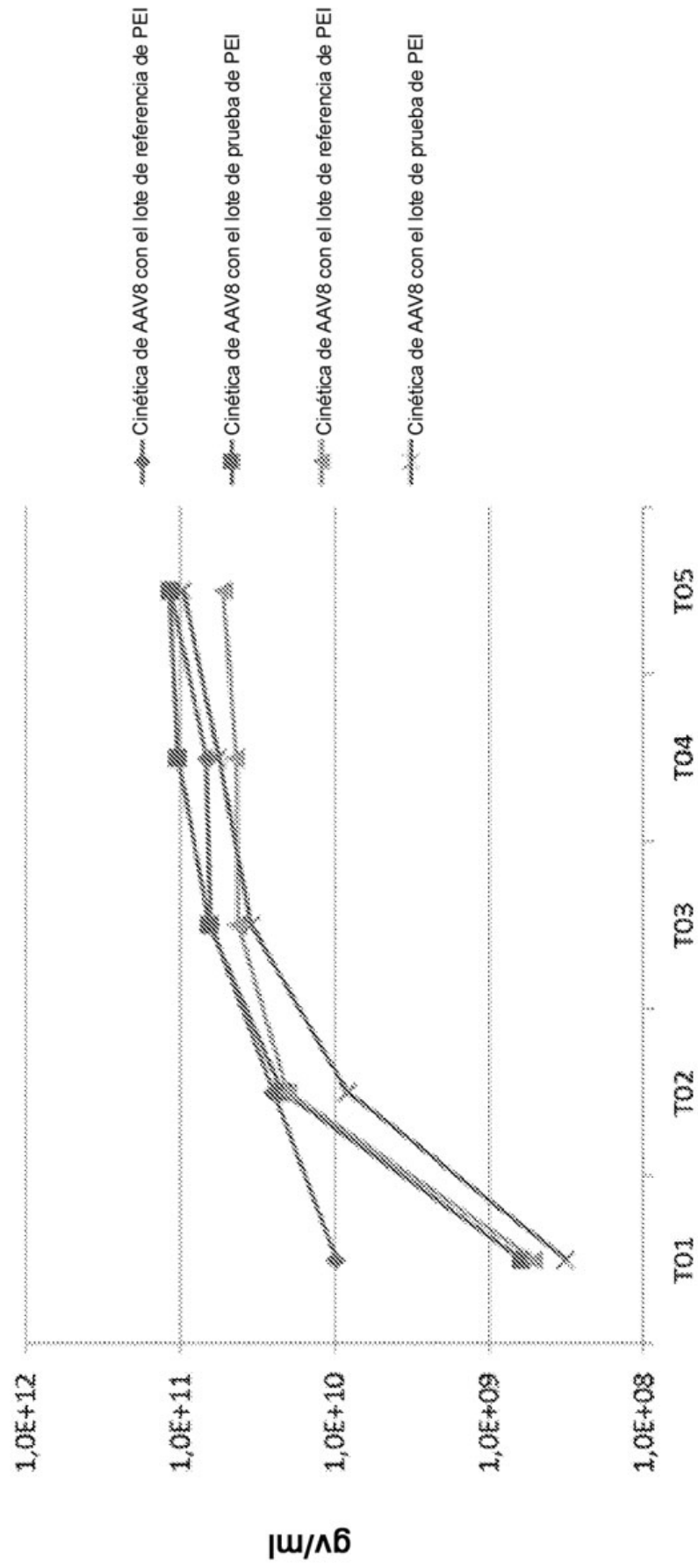


FIGURA 3

Partículas de AAV8r (sobrenadante): ELISA de AAV

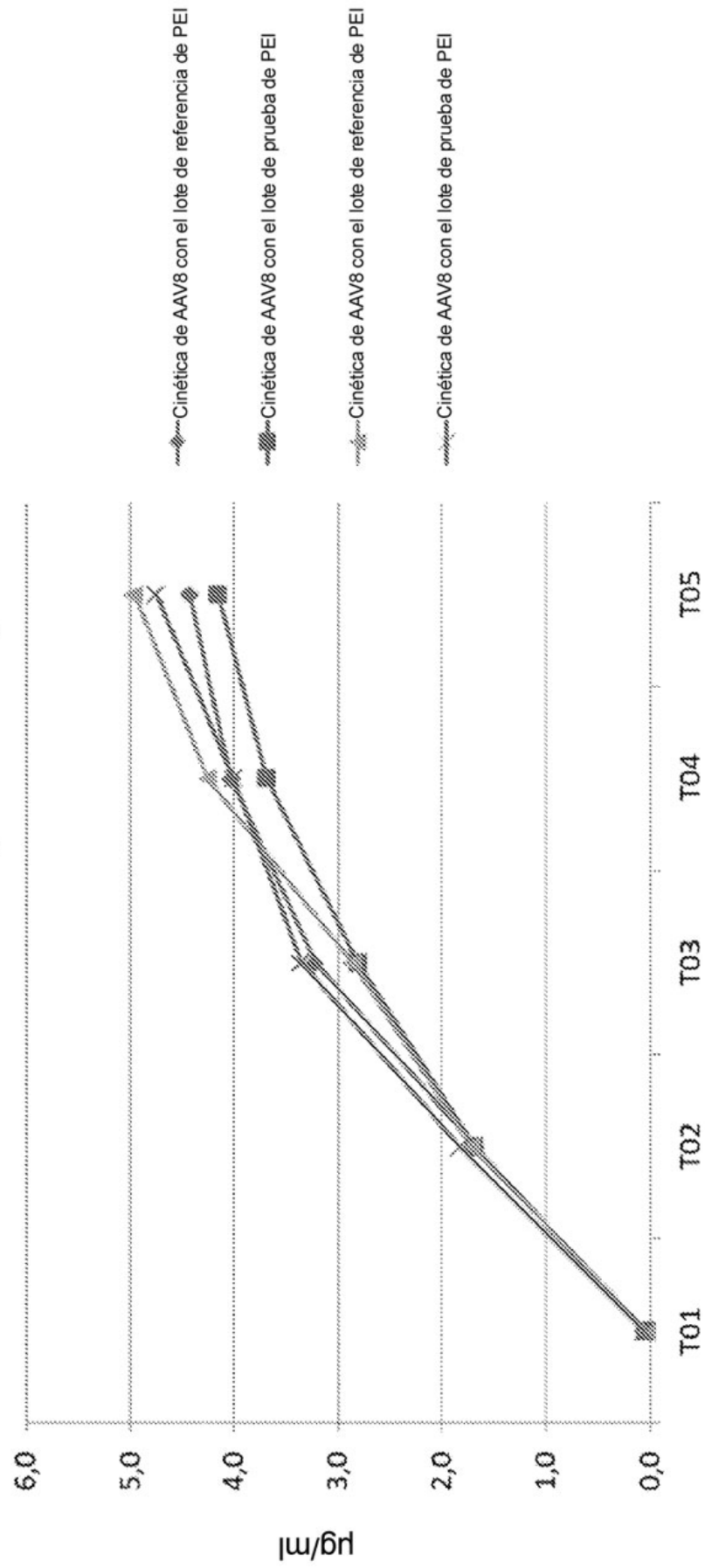


FIGURA 4

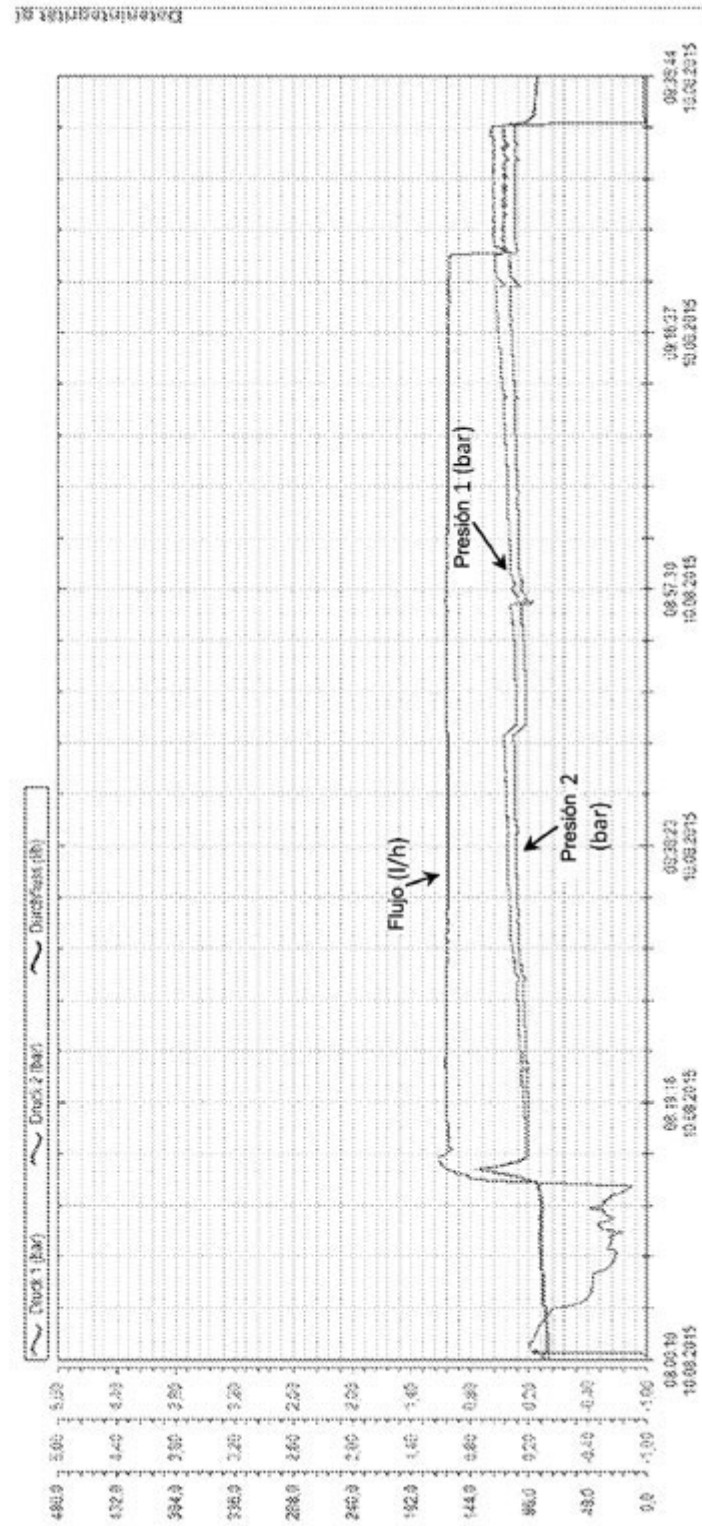


FIGURA 5

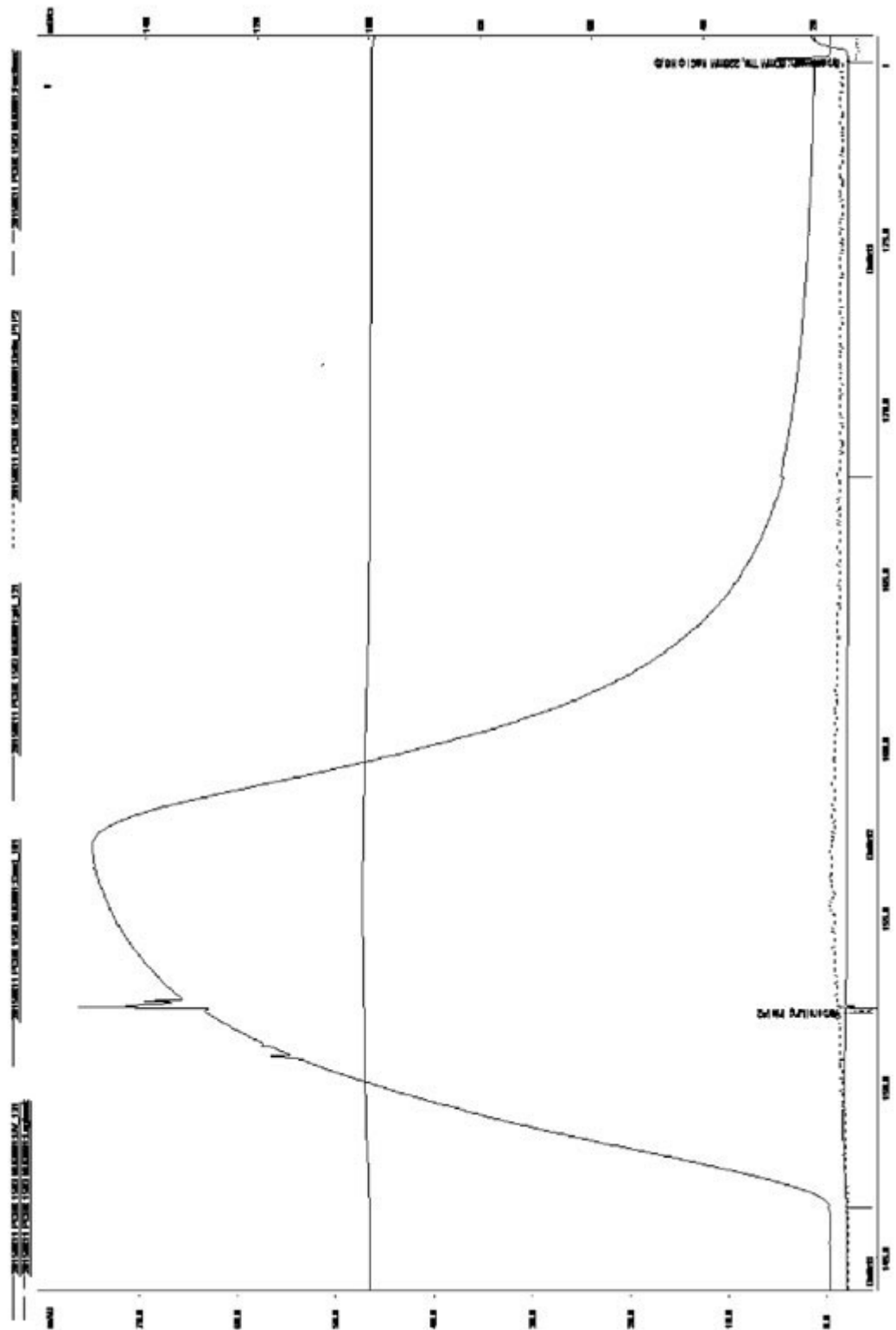
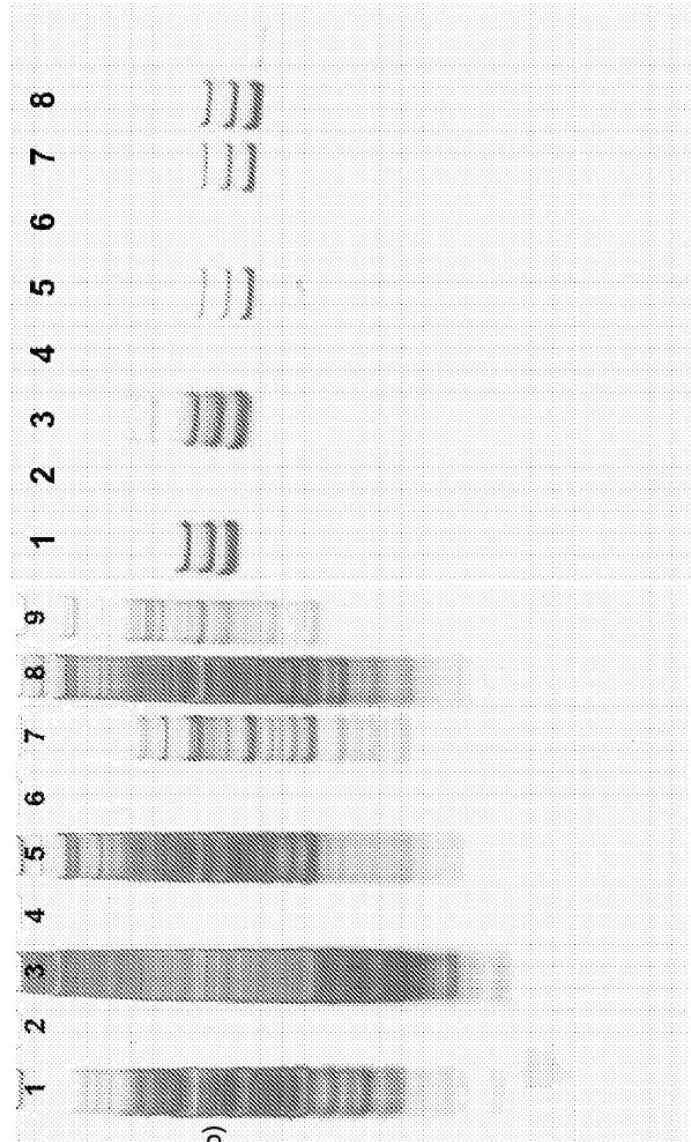
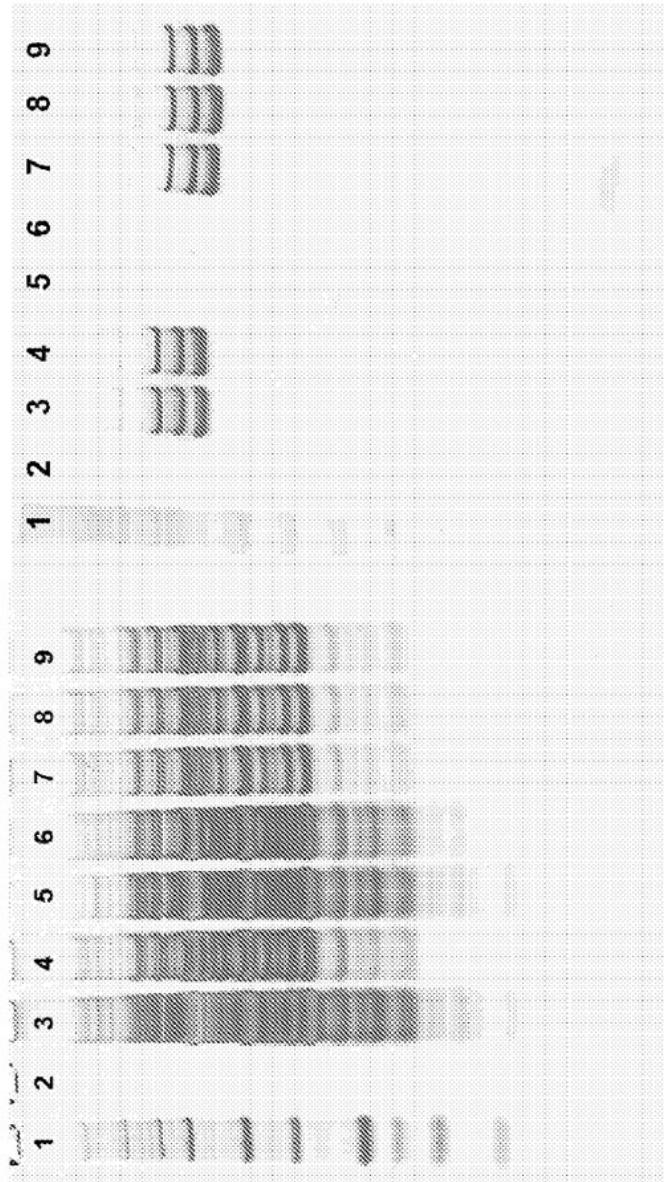


FIGURA 6



- Descripción de las muestras por los números de carril
- 1. Fracción no retenida de Mustang Q (fracción de producto)
 - 2. Blanco
 - 3. Carga de Mustang Q (concentrado de UF/DF)
 - 4. Blanco
 - 5. Eluato de Mustang Q
 - 6. Blanco
 - 7. Fracción no retenida de Mustang Q 1:10
 - 8. Material de partida (concentrado de UF/DF) 1:10
 - 9. Eluato de Mustang Q 1:10

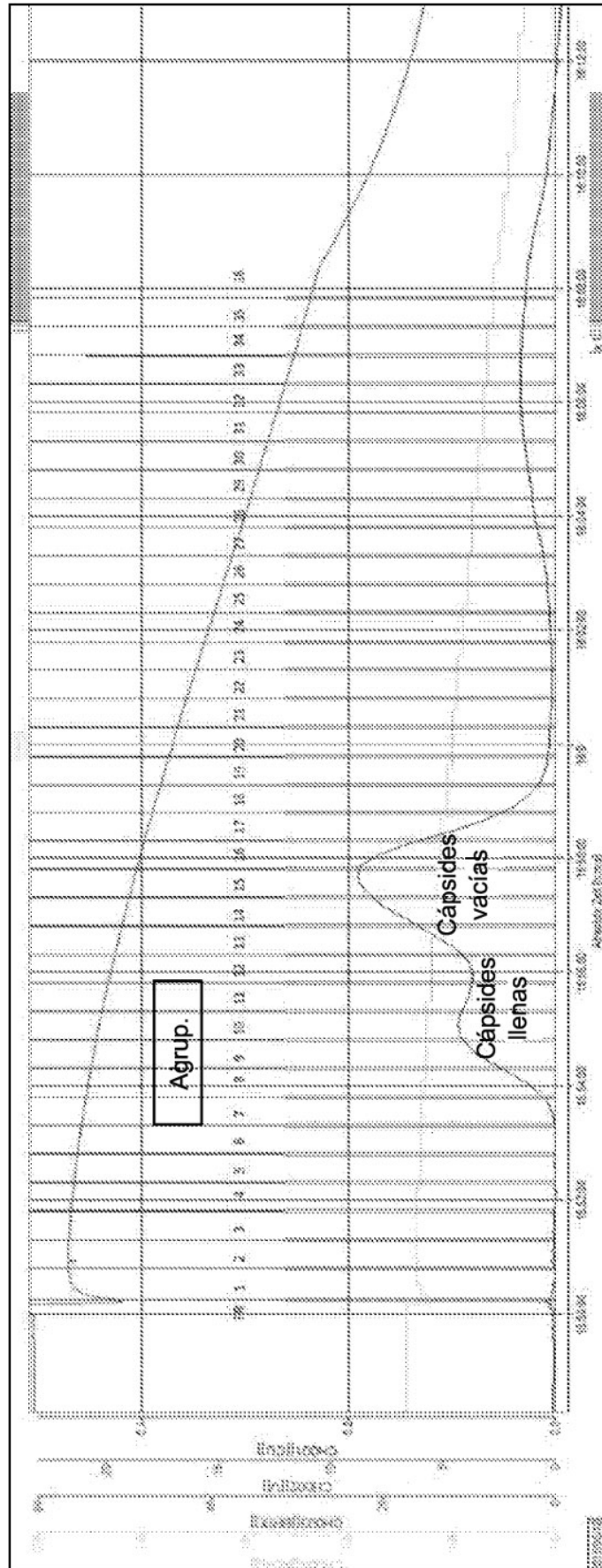
FIGURA 7



Descripción de las muestras por los números de carril

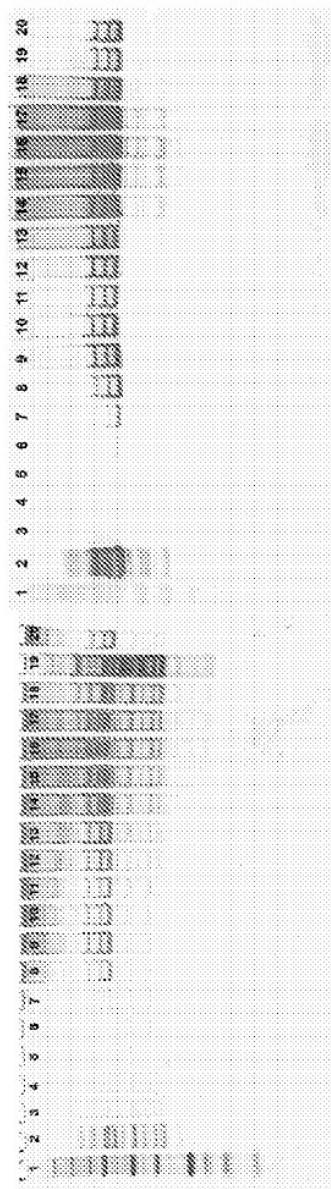
1. Marcador
2. Blanco
3. TFF_CARGA (fracción no retenida de Mustang Q)
4. TFF - fracción retenida diluida a 1:14
5. TFF - filtrado
6. TFF - diafiltrado
7. TFF - fracción retenida diafiltrada diluida a 1:14
8. TFF - fracción retenida diafiltrada diluida a 1:14 antes de una filtración de 0,2 µm
9. TFF - fracción retenida diafiltrada diluida a 1:14 después de una filtración de 0,2 µm

FIGURA 8



Perfil de elución de ultracentrifugación

FIGURA 9



1. Marcador
2. CARGA de ultracentrifugación diluida a 1:50
3. Ultracentrifugación FR
4. Ultracentrifugación F01
5. Ultracentrifugación F02
6. Ultracentrifugación F03
7. Ultracentrifugación F04
8. Ultracentrifugación F05
9. Ultracentrifugación F06
10. Ultracentrifugación F07
11. Ultracentrifugación F08
12. Ultracentrifugación F09
13. Ultracentrifugación F10
14. Ultracentrifugación F11
15. Ultracentrifugación F12
16. Ultracentrifugación F13
17. Ultracentrifugación F14
18. Ultracentrifugación F15
19. Ultracentrifugación F1
20. Ultracentrifugación, agrupaciones 04-F08

FIGURA 11

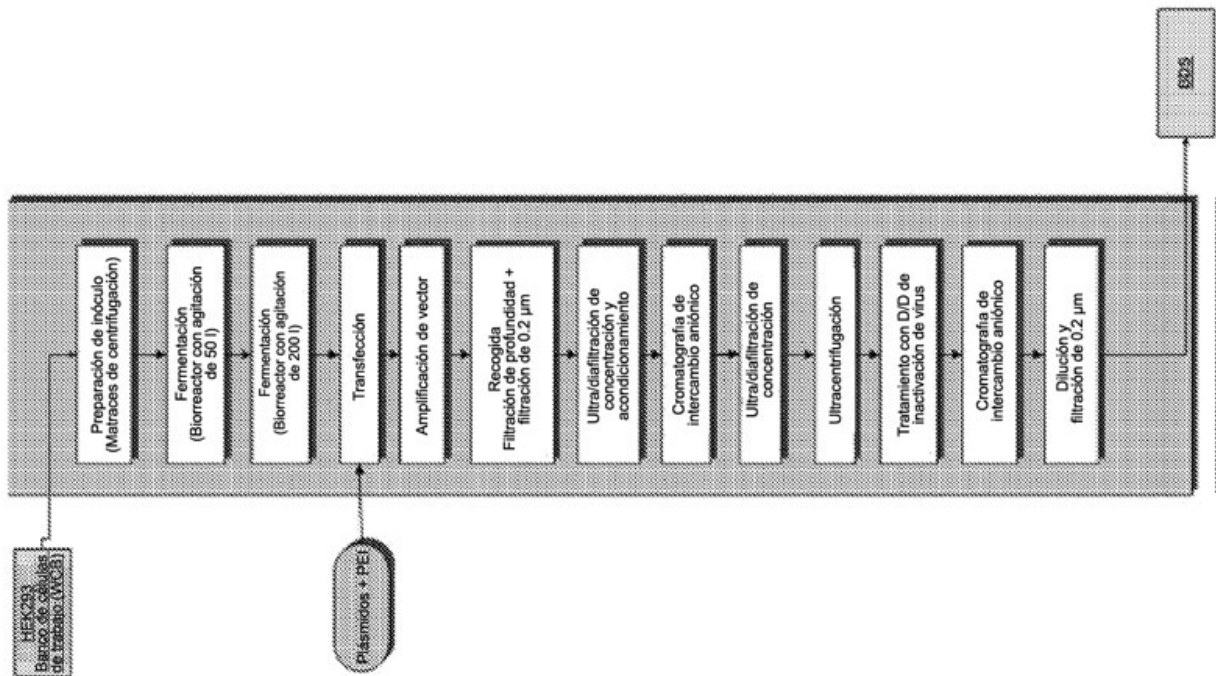


FIGURA 12

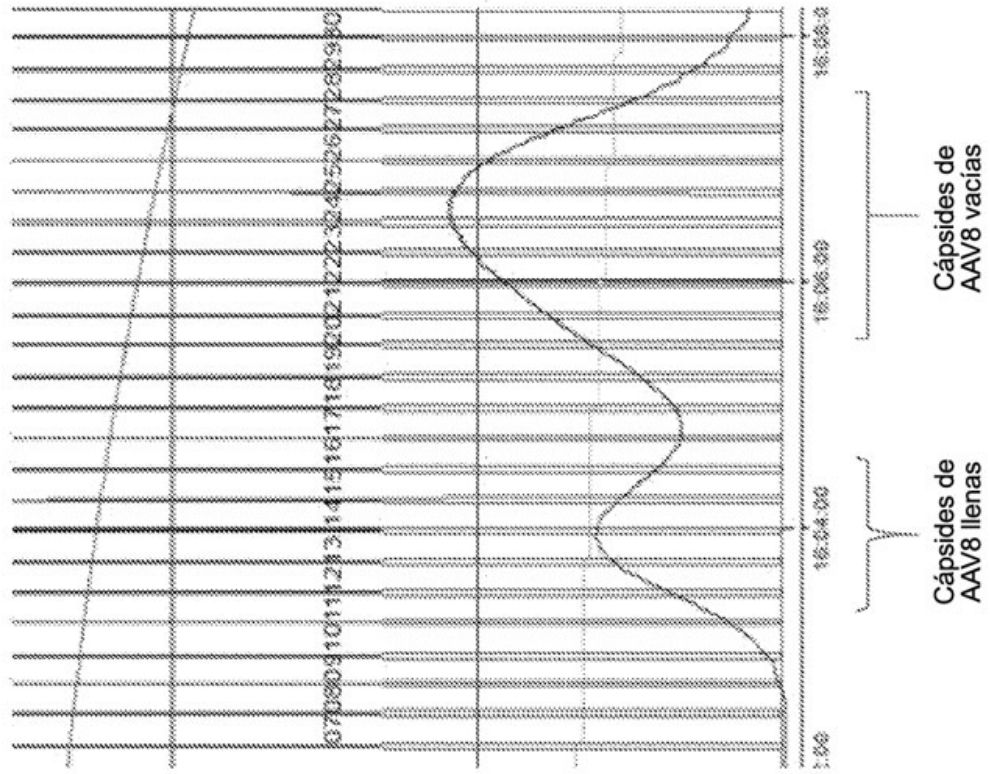
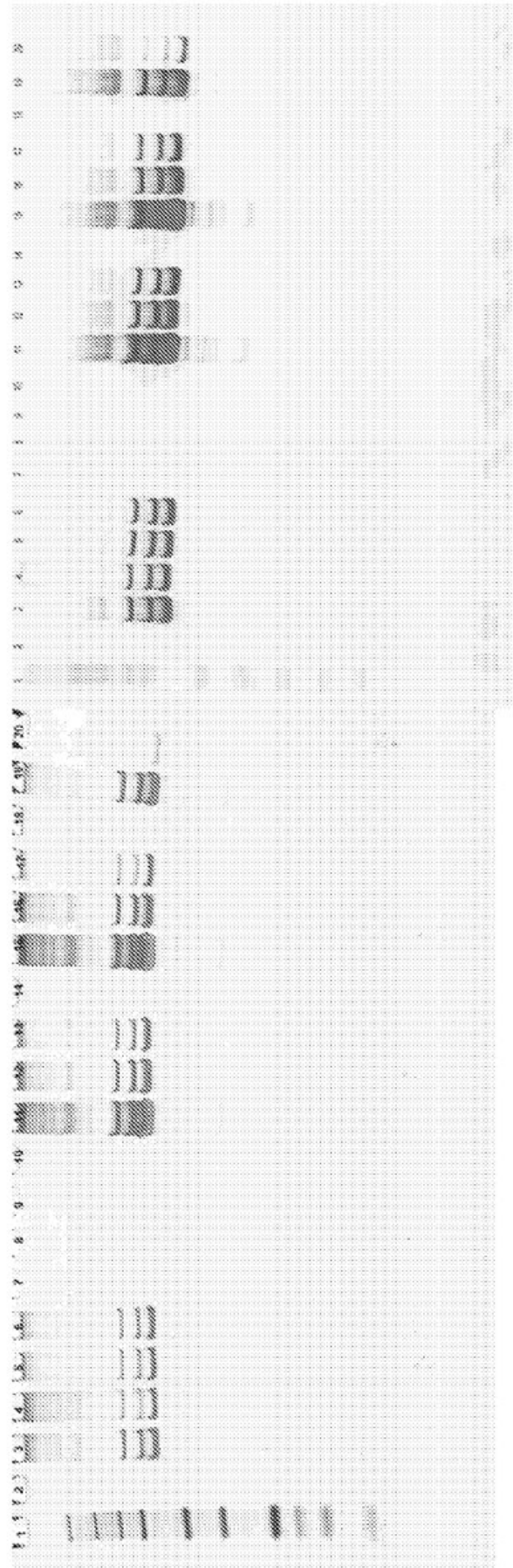


FIGURE 13



Descripción de las muestras por el número de carril

1. Marcador de peso molecular
2. Blanco
3. Material de partida (agrup. de ultracentrifugación)
4. Material de partida (agrup. de ultracentrifugación) filtrado
5. Material de partida diluido antes de tratamiento con DD
6. TMAE_CARGA después de tratamiento con DD
7. TMAE_Fracción no retenida
8. TMAE_Lavado
9. TMAE_Lavado2
10. Blanco
11. TMAE_BDS_A granel conc. (eluato principal de TMAE diluido a 1:2)
12. TMAE_BDS_A granel diluido a 1:4
13. TMAE_BDS_A granel diluido a 1:8
14. Blanco
15. TMAE_FDP_FC conc. (eluato principal de TMAE diluido hasta el volumen final)
16. TMAE_FDP_FC diluido a 1:4
17. TMAE_FDP_FC diluido a 1:8
18. Blanco
19. TMAE_NE1 (eluato 2)
20. TMAE_NE1 (eluato 3)

FIGURA 14

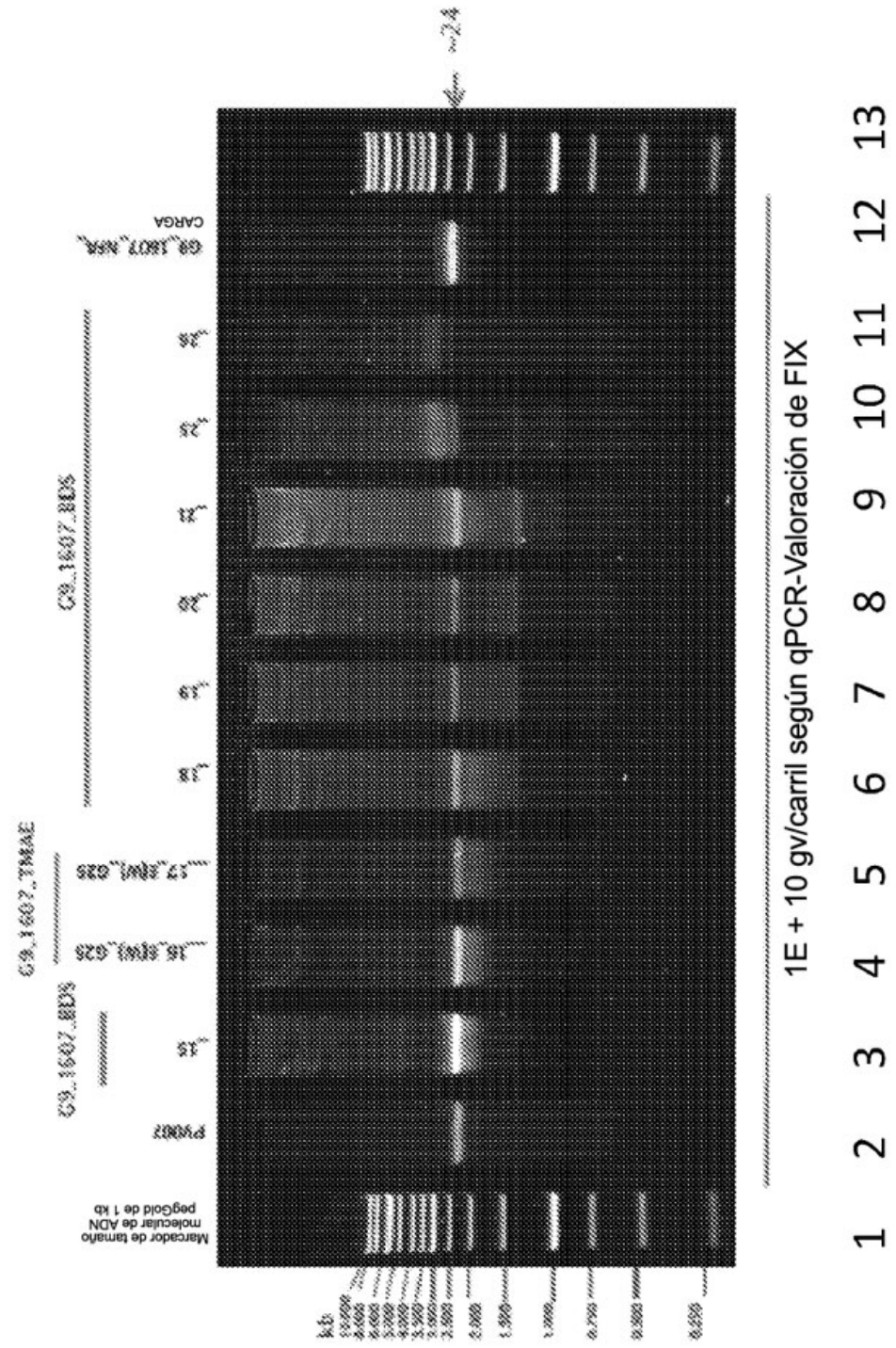


FIGURA 15

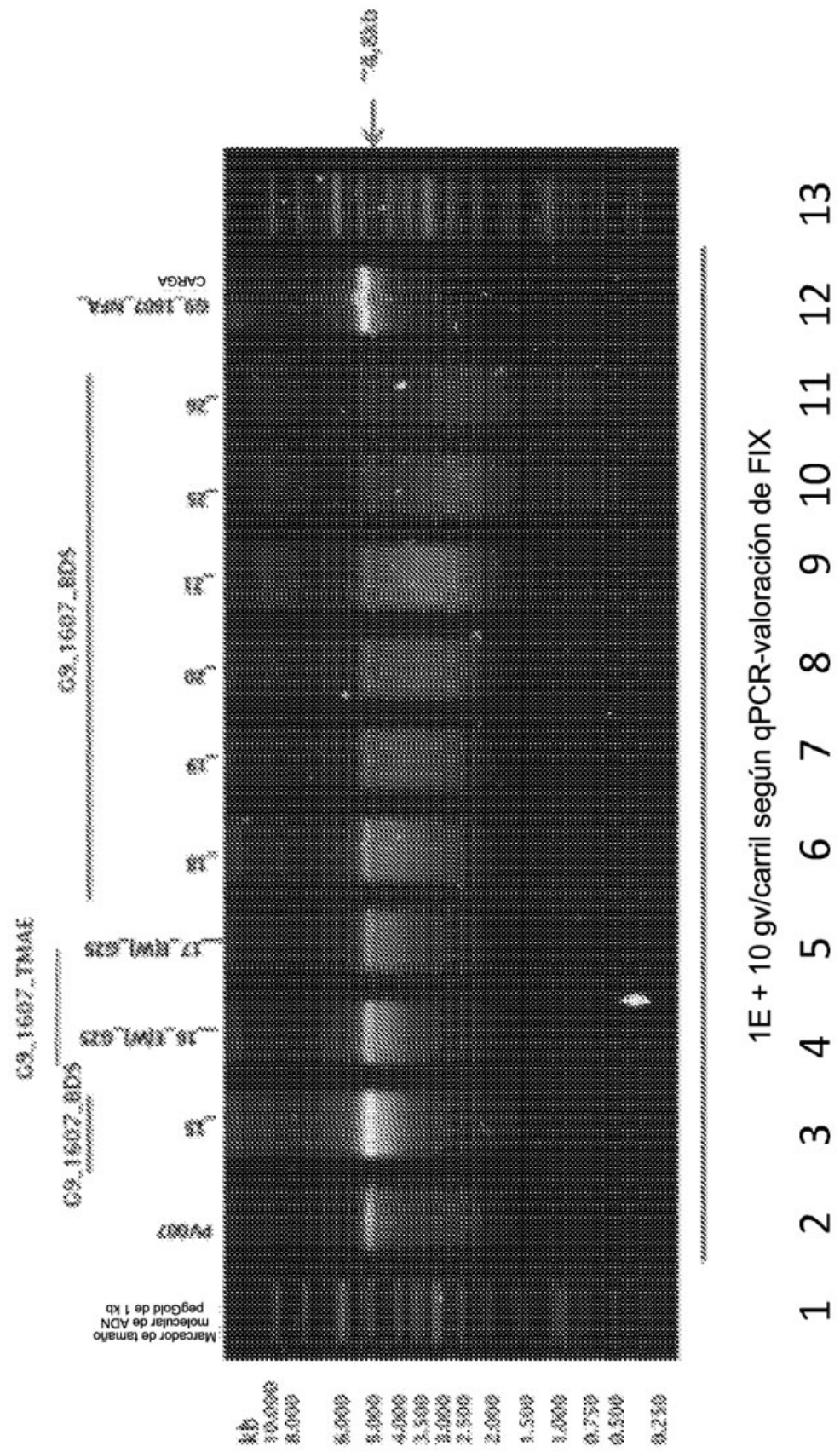


FIGURA 16

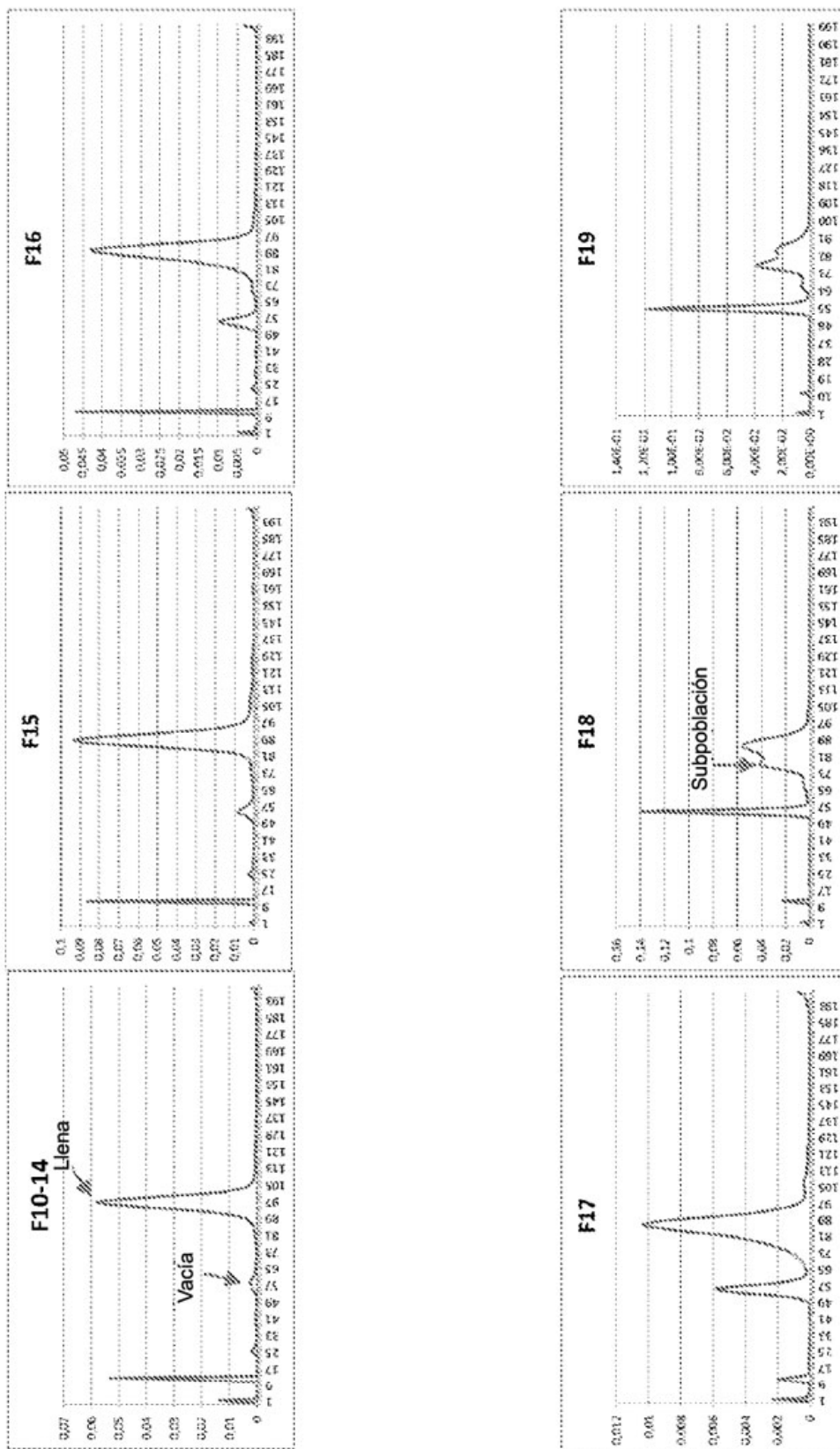


FIGURA 16B

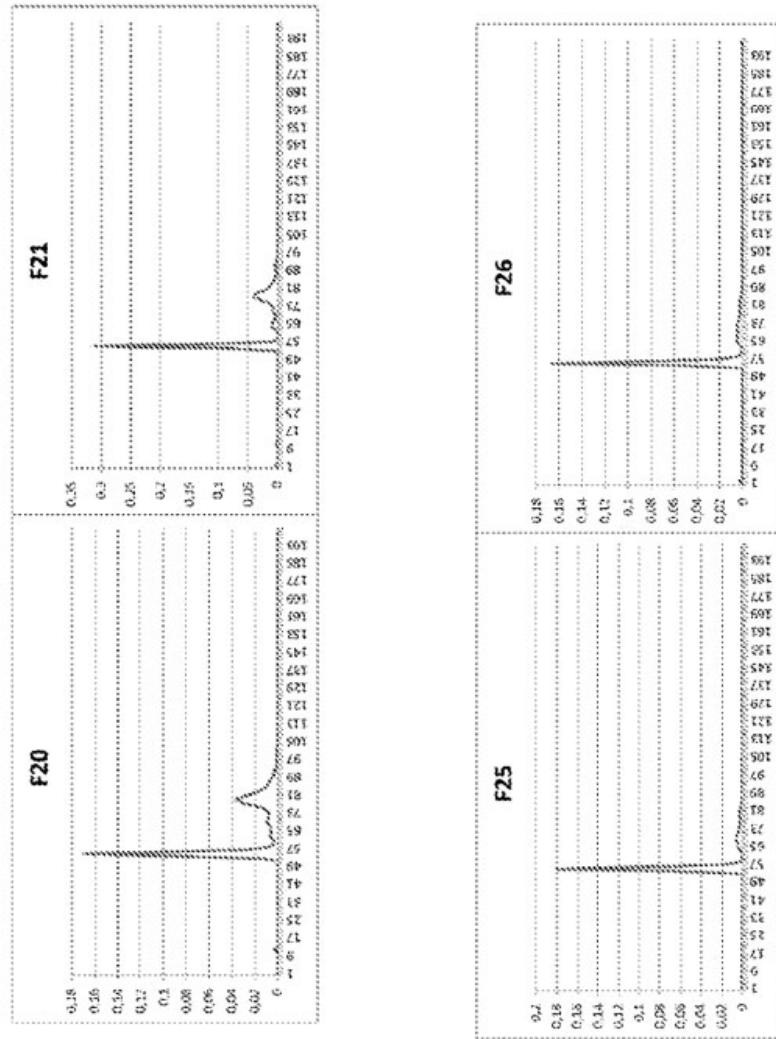


FIGURA 17

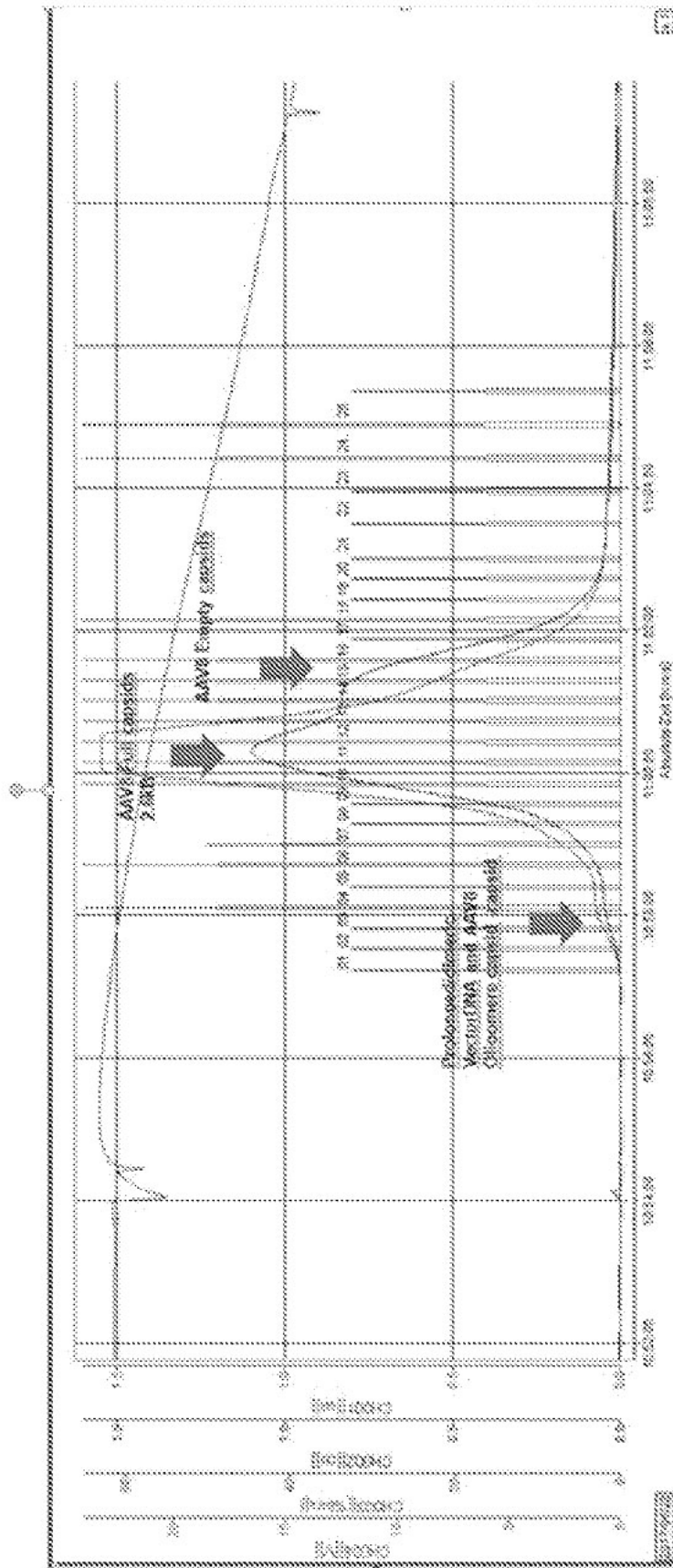


Figura 18

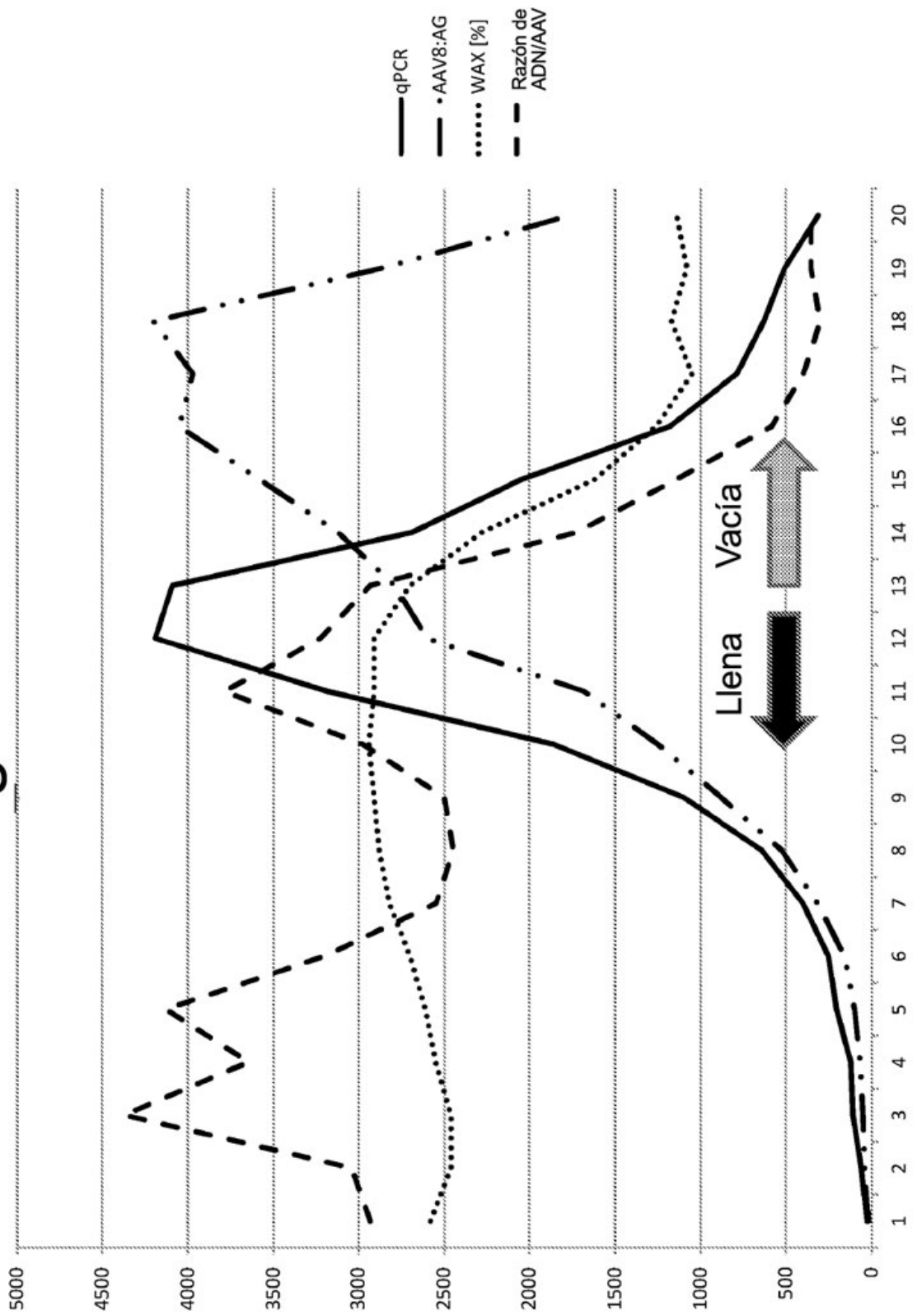


Figura 19

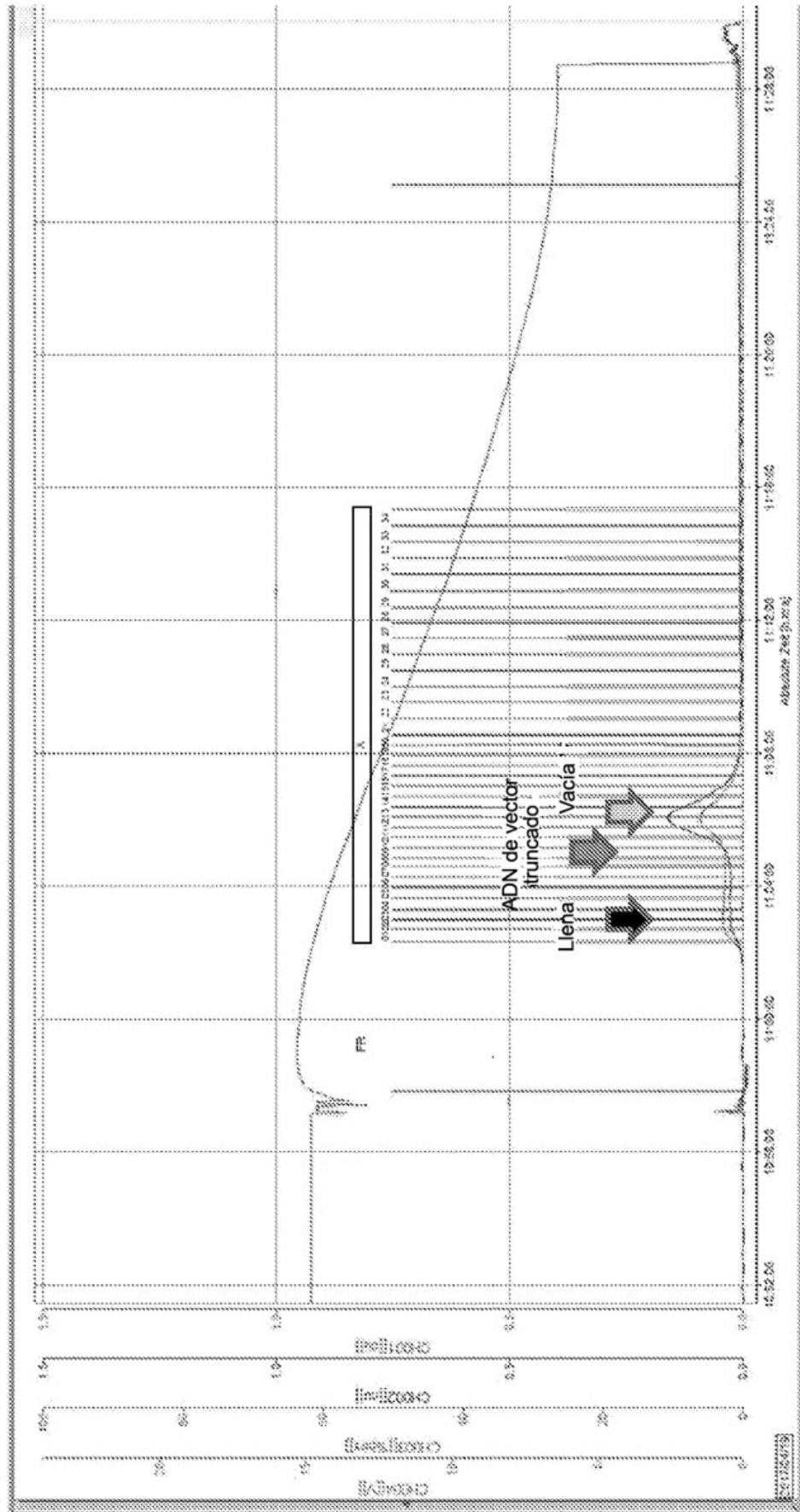


Figura 20

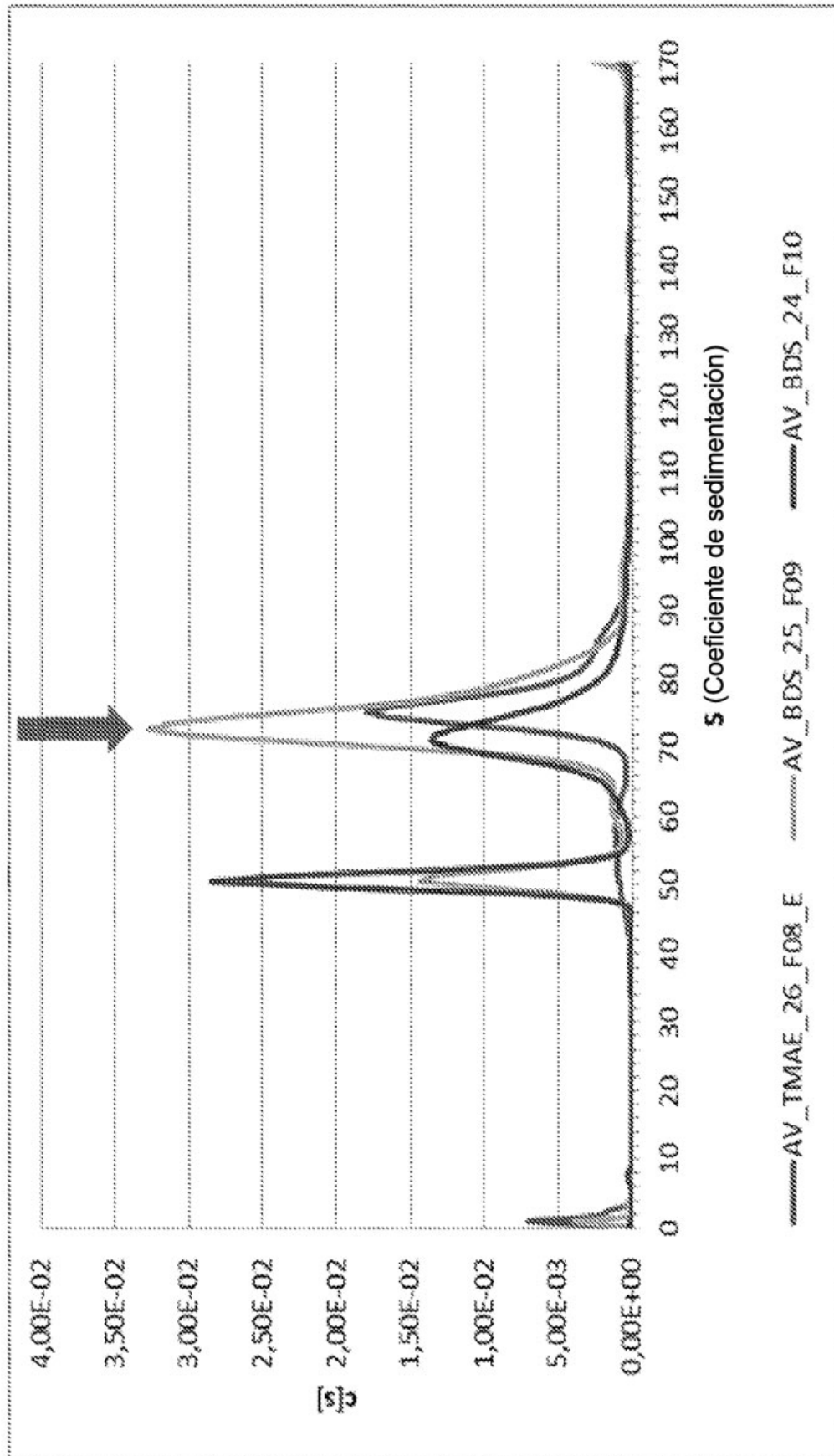


Figura 21

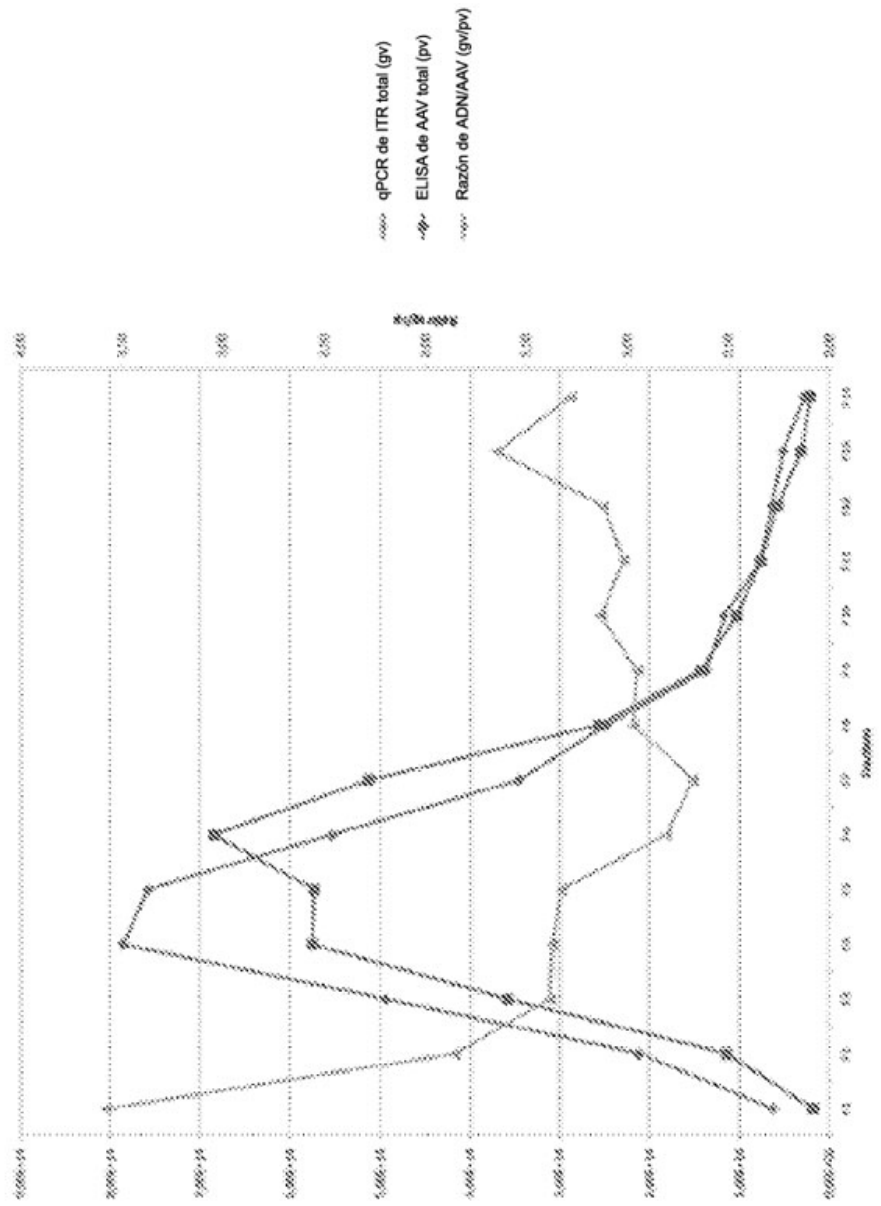


Figura 22

