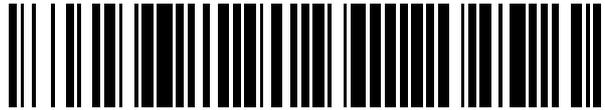


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 317 517**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2006 E 06724513 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **14.10.2015 EP 1869171**

54 Título: **Purificación de virus usando ultrafiltración**

30 Prioridad:

11.04.2005 EP 05102842
11.04.2005 US 670064 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
21.01.2016

73 Titular/es:

CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)
ARCHIMEDESWEG 4
2333 CN LEIDEN, NL

72 Inventor/es:

WEGGEMAN, MIRANDA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 317 517 T5

DESCRIPCIÓN

Purificación de virus usando ultrafiltración

5 Campo de la invención

La invención pertenece al campo de la producción de virus, más en particular a la purificación de virus con el fin de hacer vacunas o productos de terapia génica, y las vacunas y productos de terapia génica así obtenidos.

10 Antecedentes de la invención

Los virus, bien los que se dan en la naturaleza, o las versiones recombinantes de los mismos, se usan para la vacunación en el campo de la terapia génica. Es posible para muchos virus o partículas similares a virus propagar estas de forma segura y eficaz en células (véase por ejemplo el documento WO 01/38362, que describe la propagación de varios virus en células de retina inmortalizadas con E1). Los adenovirus recombinantes son una clase preferida de vectores virales para su uso en terapia génica y para fines de vacunación. Tales adenovirus recombinantes son normalmente deficientes en al menos la región E1, y se propagan en células de complementación que proporcionan la región E1, tal como células 293, o células de retina inmortalizadas con E1 tal como las células PER.C6® (véase por ejemplo la patente de EE UU 5.994.128).

Tras la propagación de los virus en las células, es necesario para prácticamente todas las aplicaciones purificar los virus de las células, antes de su uso adicional.

La solicitud internacional de patente WO 98/22588 describe métodos para la producción y purificación de vectores adenovirales. Los métodos comprenden hacer crecer células, infectar las células con adenovirus, recoger y lisar las células, concentrar el lisado crudo, intercambiar el tampón del lisado crudo, tratar el lisado con nucleasa, y purificar adicionalmente el virus usando cromatografía.

Algunas otras publicaciones describen la purificación de virus a partir de células, la mayor parte discutiendo el uso de matrices cromatográficas específicas para la purificación del virus a partir de un lisado celular, véanse por ejemplo las patentes de EE UU 6.008.036, 6.586.226, 5.837.520, 6.261.823, 6.537.793, y las solicitudes internacionales de patente WO 00/50573, WO 02/44348 y WO 03/078592.

En varios procesos industriales para la purificación de virus, particularmente de adenovirus, se usa un paso de ultrafiltración, principalmente para concentrar el virus y/o para intercambiar el tampón en el que se mantiene el virus.

A pesar de la descripción de varios procesos principalmente relacionados con diferentes matrices cromatográficas, permanece una necesidad para métodos alternativos y preferiblemente mejorados para la purificación de adenovirus. La presente invención proporciona tales métodos.

40 Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del método conocido de recoger las células (T/B) frente al método según la invención (B/T), véase el ejemplo 1. T: Triton, B: Benzona. p.i.: post infección.

Figura 2. Eliminación de proteínas de la célula huésped en la clarificación después de proceso T/B frente a B/T (véase la figura 1 para el esquema). Se muestra un análisis de SDS-PAGE (4-12% bis-tris NuPAGE, Invitrogen) teñido con plata de muestras en proceso de 5 purificaciones separadas (véanse el ejemplo 1 y la tabla 1 para las muestras). El panel 2 es de un producto T/B, en donde la lisis precedió a la adición de nucleasa; los paneles 3-7 son de productos B/T, en donde la nucleasa se añadió antes de la lisis. El producto recogido (carriles 1) se clarificó mediante un filtro Clarigard de 0,5 µm (carriles 2), seguido por un filtro Sartapore 2 de 0,8/0,45 µm (carriles 3). M: marcadores, el peso molecular en kD se muestra en el costado.

Figura 3. Esquema de un proceso para la purificación de un virus (véase el ejemplo 1; véase también el documento PCT/EP2005/050739).

Figura 4. Perfiles de RP-HPLC de una muestra del retenido de FFT de baja pureza (A) y una muestra de retenido de FFT de alta pureza (B). Véase el ejemplo 2 para los detalles.

Figura 5. Perfil de elución de intercambio aniónico para una muestra del retenido de FFT de baja pureza (A, sin presión inversa durante la FFT) y muestra del retenido de FFT de alta pureza (B, presión inversa durante la FFT). Véase el ejemplo 2 para los detalles.

Figura 6. Análisis estadístico del efecto de la presión transmembrana (PTM, panel A) y la cantidad alimentada por área de filtro (B) sobre la pureza. Véase el ejemplo 2 para los detalles.

5 Figura 7. Análisis estadístico de aplicar presión inversa al permeado sobre la recuperación de adenovirus. Véase el ejemplo 2 para los detalles.

Figura 8. Representación esquemática del experimento de FFT. A. sin presión inversa en el lado del permeado (FFT para purificación de virus según el estado de la técnica). B: presión inversa en el lado del permeado (FFT para purificación de virus según la invención). P_o : P_{salida} , P_i : $P_{entrada}$, P_p : P_{perm} . Véase el ejemplo 3.

10 Figura 9. Flujo durante la FFT de la carrera control sin presión inversa (A) y carrera según la invención con presión inversa (B). Véase el ejemplo 3 para los detalles.

Figura 10. SDS-PAGE de los retenidos de FFT. 1: marcador, 2: carrera A (sin presión inversa (control)), 3: carrera B (con presión inversa (según la invención)), 4: Ad35 purificado con CsCl. Véase el ejemplo 3 para los detalles.

15 Figura 11. Análisis por RP-HPLC de los retenidos de FFT. A, carrera sin presión inversa (control). B, carrera con presión inversa (según la invención). Véase el ejemplo 3 para los detalles.

Figura 12. Análisis por SDS-PAGE de muestras de un proceso de 20 litros con presión inversa en el retenido durante la FFT. Todos los carriles excepto el carril 2 contienen $5E9$ partículas virales. 1: virus clarificado. 2: permeado tras concentración 5x. 3: virus diafiltrado. 4: virus capturado (después de filtración aniónica en Mustang Q). 5: producto preformulado (después de la separación de grupo y esterilización por filtración). 6: marcador. Véase el ejemplo 4 para los detalles.

25 Figura 13. Análisis por RP-HPLC de muestras de un proceso de 20 litros con presión inversa en el retenido durante la FFT (las muestras como en la figura 12). 3: virus diafiltrado. 4: virus capturado (después de filtración aniónica en Mustang Q). 5: producto preformulado (después de la separación de grupo y esterilización por filtración). Véase el ejemplo 4 para los detalles.

Figura 14. Esquema de un proceso para la purificación de adenovirus según la invención.

Figura 15. Análisis por RP-HPLC de Ad5 purificado mediante un gradiente de CsCl (A), o del retenido diafiltrado de la carrera B1 (B, véase el ejemplo 5 para los detalles).

35 Figura 16. Análisis por SDS-PAGE de Ad5 purificado mediante FFT. 1: marcador. 2: virus B1 diafiltrado (véase el ejemplo 5 para los detalles). 3: virus Ad5 purificado por CsCl.

Figura 17. Análisis por SDS-PAGE de Ad35 purificado mediante FFT. Cada carril contiene 5×10^8 partículas virales Ad35-TB-S. 1: producto clarificado. 2: retenido tras concentración 5x. 3: retenido tras FFT (16 VDF). 4: virus purificado sólo por filtración. 5: virus purificado por gradiente de CsCl.

40 Figura 18. Análisis por RP-HPLC de Ad35 purificado mediante FFT (véase ejemplo 7 para los detalles). A: Retenido tras 6 VDF. B: retenido tras 10 VDF. C: retenido tras 14 VDF. D: retenido tras 16 VDF. pVI: proteína precursora VI.

45 Descripción de la invención

Se divulga un método para la purificación de un adenovirus recombinante ("virus") que comprende un paso de ultrafiltración en donde el retenido contiene el virus, caracterizado en que se aplica presión inversa en el lado del permeado. La invención se define en las reivindicaciones. En una forma de realización preferida, dicho método comprende antes de dicho paso de filtración los pasos de: a) cultivar células que están infectadas con dicho virus, b) añadir nucleasa al medio de cultivo. En una forma de realización preferida adicional, tras el paso b) dichas células se lisan para proporcionar un lisado que comprende el virus. En una forma de realización preferida adicional, dicho método comprende además tras el paso de lisar c) un paso de: d) clarificación del lisado, preferiblemente mediante filtración en profundidad seguido por una filtración en membrana, en donde dicho paso d) es anterior al paso de ultrafiltración. En formas de realización preferidas, el paso de ultrafiltración se realiza mediante filtración de flujo tangencial, preferiblemente usando un módulo de fibra hueca. En ciertas formas de realización, la presión inversa se aplica mediante una bomba que proporciona presión inversa al permeado. En ciertas formas de realización, la presión inversa sobre el lado del permeado está entre 3-80 kPa (6,89 kPa = 1 psi). En formas de realización preferidas, la presión transmembrana es menor de 4 psi, preferiblemente menor de 3 psi, menos de 2 psi, o menos de 1 psi. En ciertas formas de realización, dicha ultrafiltración comprende intercambio de tampón del retenido con un tampón que comprende entre 0,8 M y 2 M de cloruro de sodio u otra sal que de igual fuerza iónica, y preferiblemente

posterior intercambio de tampón con un tampón que tiene una fuerza iónica de un tampón que comprende al menos 0,5 M de NaCl.

En ciertas formas de realización, dicho método no comprende un paso de cromatografía de exclusión molecular y/o de cromatografía de intercambio aniónico o filtración de intercambio aniónico, y en ciertas formas de realización dicho método no comprende un paso de cromatografía. En otras formas de realización, el método comprende además un paso de purificar adicionalmente el adenovirus recombinante con al menos un paso de cromatografía, tal como un paso de cromatografía de intercambio aniónico o filtración de intercambio aniónico y/o cromatografía de exclusión molecular.

La invención también proporciona un método para la purificación de un adenovirus recombinante, dicho método consiste esencialmente en: a) cultivar células que están infectadas con dicho adenovirus recombinante, b) lisar dichas células y eliminar y/o fragmentar el ácido nucleico libre, para proporcionar un lisado que comprende el adenovirus recombinante, c) clarificar el lisado para obtener una preparación de adenovirus, d) someter la preparación de adenovirus a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, para concentrar la preparación de adenovirus, e) someter la preparación de adenovirus del paso d) a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, e intercambiar con ella al menos 5 volúmenes de diafiltración (VDF) de tampón, en donde un VDF es el volumen del retenido tras la concentración en el paso d), f) preferiblemente esterilización por filtración de la preparación de adenovirus, estando caracterizado el método en que en los pasos d) y e) se aplica presión inversa en el lado permeado. En una forma de realización alternativa, la invención proporciona un método para la purificación de un adenovirus recombinante, dicho método consiste esencialmente en: a) cultivar células que están infectadas con dicho adenovirus recombinante, b) lisar dichas células y eliminar y/o fragmentar el ácido nucleico libre, para proporcionar un lisado que comprende el adenovirus recombinante, c) clarificar el lisado para obtener una preparación de adenovirus, d) someter la preparación de adenovirus del paso c) a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, e intercambiar con ella al menos 5 volúmenes de diafiltración (VDF) de tampón, en donde un VDF es el volumen de la preparación de adenovirus tras c), e) preferiblemente esterilización por filtración de la preparación de adenovirus, estando caracterizado el método en que en el paso d) se aplica presión inversa en el lado permeado.

La invención también proporciona un método para aumentar la recuperación y/o el rendimiento de adenovirus recombinante durante un paso de ultrafiltración en donde el retenido contiene el adenovirus recombinante, caracterizado dicho método en que se aplica presión inversa en el lado permeado.

La diferencia más importante con los métodos para la purificación de un virus que comprende un paso de ultrafiltración en donde el retenido contiene el virus, divulgados hasta ahora, es que en esos métodos no se aplica presión inversa en el lado permeado, y el permeado se deja fluir fuera libremente, normalmente en un recipiente de basura. Según la presente invención, la presión inversa (también llamada contrapresión) se aplica en el lado del permeado, algunas veces denominada aquí como presión de permeado. Como se divulga en el presente documento, se ha encontrado de forma inesperada que esto produce una mejora sobre los procesos en los que no se aplica presión inversa sobre el lado del permeado. En el método según la presente invención, se alcanzan mayor recuperación del virus y/o purificación aumentada, comparado con el método en donde no se aplica presión inversa en el lado del permeado.

Descripción detallada de la invención

Células

Los virus se pueden propagar de forma adecuada en células (a las que algunas veces se denomina 'células huésped'). Una célula según la presente invención puede ser cualquier célula en donde se puede propagar un adenovirus deseado. Por ejemplo, la propagación de vectores de adenovirus recombinantes se hace en células que complementan deficiencias en el adenovirus. Tales células preferiblemente tienen en sus genomas al menos una secuencia de adenovirus E1, y por lo tanto son capaces de complementar adenovirus recombinantes con una delección en la región E1. Además el adenovirus puede tener una delección en la región E3, que es dispensable del genoma Ad, y por lo tanto tal delección no se tiene que complementar. Se puede usar cualquier célula que complemente a E1, tal como células de retina humanas inmortalizadas por E1, por ejemplo 911 (véase la patente de EE UU 5.994.128), amniocitos transformados con E1 (véase la patente EP 1230354), células A549 transformadas con E1 (véase, por ejemplo, el documento WO 98/39411, patente de EE UU 5.891.690), GH329:HeLa (Gao et al, 2000, Human Gene Therapy 11: 213-219), 293, y similares. Preferiblemente como células se usan células PER.C6™ (patente de EE UU 5.994.128), o células derivadas de las mismas, ya que son adecuadas para la propagación de adenovirus recombinantes.

Líneas celulares y métodos adicionales para la propagación de vectores adenovirales recombinantes se han divulgado por ejemplo en la patente de EE UU 6.492.169 y en el documento WO 03/104467.

Los ejemplos de otras líneas celulares de mamífero útiles que se pueden usar directamente como células para propagar virus o convertidas en células de complementación para la replicación de virus deficientes son células Vero y HeLa y líneas celulares de ovario de hámster chino, células W138, BHK, COS-7, HepG2, 3T3, RIN y MDCK, conocidas para el experto en la materia.

Las células se cultivan para aumentar los números de células y virus y/o títulos de virus. El cultivo una célula se hace para permitir que metabolice, y/o crezca y/o se divida y/o produzca virus de interés según la invención. Esto se puede realizar por métodos como tales bien conocidos para los expertos en la materia, e incluye pero no está limitado a suministrar nutrientes para la célula, por ejemplo en el medio de cultivo apropiado. Los métodos pueden comprender el crecimiento adherido a superficies, crecimiento en suspensión, o combinaciones de los mismos. El cultivo se puede hacer por ejemplo en placas, botellas rodantes o en biorreactores, usando sistemas por lotes, semicontinuos o continuos, fibra hueca, y similares. Para alcanzar producción a gran escala (continua) de virus por medio de cultivo celular se prefiere en la técnica tener células capaces de crecer en suspensión, y se prefiere tener células capaces de ser cultivadas en ausencia de suero de procedencia animal o humana o componentes de suero de origen animal o humano. Las condiciones adecuadas para cultivar células son conocidas (véase por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973), y R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, cuarta edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

En ciertas formas de realización, la invención comprende someter las células cultivadas que están infectadas con los virus a lisis. El cultivo de células y su infección con un virus es bien conocido para el experto en la materia. La infección de células se puede realizar por ejemplo simplemente exponiendo la célula apropiada en condiciones fisiológicas, permitiendo la absorción del virus. Para ciertos virus no es ni siquiera necesario empezar con virus por sí, ya que se pueden usar secuencias de ácido nucleico para reconstituir el virus en las células cultivadas.

También se pueden encontrar varios aspectos de y sistemas adecuados para el cultivo de células para la producción de adenovirus en el documento WO 98/22588, p. 11-28. Los métodos para el cultivo de células y la propagación de virus en células también se han divulgado en, por ejemplo, las patentes de EE UU 6.168.944, 5.994.134, 6.342.384, 6.168.941, 5.948.410, 5.840.565, 5.789.390, 6.309.650, 6.146.873 y las solicitudes internacionales de patente WO 01/38362, WO 01/77304 y WO 03/084479.

Virus

En ciertas formas de realización, la presente invención se usa para purificar adenovirus recombinantes, que llevan un transgén heterólogo para su uso en terapia génica o para fines de vacunación.

Adenovirus

Preferiblemente, el vector adenoviral es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1, por ejemplo, la región E1a y/o la región E1b, del genoma adenoviral que se requiere para la replicación del virus. En ciertas formas de realización, el vector es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1 y al menos parte de la región no esencial E3 (por ejemplo, una delección Xba I de la región E3). El vector adenoviral puede ser "múltiplemente deficiente", lo que significa que el vector adenoviral es deficiente en una o más funciones génicas esenciales en cada una de dos o más regiones del genoma del adenovirus. Por ejemplo los anteriormente mencionados vectores adenovirales deficientes en E1 o en E1 y E3 pueden ser además deficientes en al menos un gen esencial de la región E4 y/o al menos un gen esencial de la región E2 (por ejemplo, la región E2A y/o la región E2B). Los vectores adenovirales con la región E4 entera delecionada pueden producir respuestas inmunitarias menores en el huésped. Los ejemplos de vectores adenovirales adecuados incluyen vectores adenovirales que carecen de (a) toda o parte de la región E1 y toda o parte de la región E2, (b) toda o parte de la región E1, toda o parte de la región E2, y toda o parte de la región E3, (c) toda o parte de la región E1, toda o parte de la región E2, toda o parte de la región E3, y toda o parte de la región E4, (d) al menos parte de la región E1a, al menos parte de la región E1b, al menos parte de la región E2a, y al menos parte de la región E3, (e) al menos parte de la región E1, al menos parte de la región E3, y al menos parte de la región E4, y (f) todos los productos génicos esenciales del adenovirus (por ejemplo amplicones adenovirales que comprenden sólo las ITR y la señal de empaquetamiento). En caso de delecciones de regiones esenciales del genoma del adenovirus, las funciones codificadas por estas regiones se tienen que suministrar en trans, preferiblemente por la célula, es decir, cuando se delecionan del adenovirus partes o las regiones E1, E2 y/o E4 completas, estas tienen que estar presentes en la célula, por ejemplo integradas en el genoma, o en forma de los denominados adenovirus auxiliares o plásmidos auxiliares.

El vector adenoviral deficiente para replicación se puede generar usando cualquier especie, cepa, subtipo o mezcla de especies, cepas, o subtipos, de un adenovirus o un adenovirus quimérico como fuente de ADN del vector (véase por ejemplo los documentos WO 96/26281, WO 00/03029), que por ejemplo puede proporcionar al vector adenoviral

con la capacidad de infectar ciertos tipos de células deseadas. El vector adenoviral puede ser cualquier vector adenoviral capaz de crecer en una célula, que en parte significativa (aunque no necesariamente sustancialmente) deriva de o se basa en el genoma de un adenovirus. El vector adenoviral puede comprender un genoma adenoviral de un adenovirus salvaje de tipo C, especialmente de un serotipo 5 (es decir, Ad5) o Ad2. El vector adenoviral también puede comprender un genoma adenoviral o al menos una proteína de fibra derivada de un adenovirus del grupo B, por ejemplo Ad11, Ad35, Ad51, etc. (véase por ejemplo, el documento WO 00/70071), cuyas formas de realización tienen la ventaja de que se encuentran menos anticuerpos neutralizantes contra estos serotipos en la población, y confieren la posibilidad de tener como diana otros tipos celulares, ya que el tropismo de estos vectores adenovirales es diferente de los derivados de Ad5. Por supuesto, el experto en la materia sabrá también se puede aplicar cualquier otro serotipo. El experto en la materia será consciente de las posibilidades de propagar vectores adenovirales de diferentes serotipos en células específicas, usando métodos tales como por ejemplo los divulgados en la patente de EE UU 6.492.169 o en el documento WO 03/104467, y las referencias en las mismas. Los vectores adenovirales, métodos para la construcción de los mismos y métodos para la propagación de los mismos, son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE UU No. 5.559.099, 5.837.511, 5.846.782, 5.851.806, 5.994.106, 5.994.128, 5.965.541, 5.981.225, 6.040.174, 6.020.191, y 6.113.913, y Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Capítulos 67 y 68, respectivamente, en *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3ª ed., Raven Press, Ltd., Nueva York (1996), y otras referencias mencionadas aquí.

La construcción de vectores adenovirales está bien comprendida en la técnica e implica el uso de técnicas estándar de biología molecular, tal como aquellas descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2ª ed., Scientific American Books (1992), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), y otras referencias mencionadas aquí.

Transgenes

En una forma de realización preferida, el virus es un adenovirus recombinante que comprende información heteróloga, que se puede usar en un marco terapéutico para fines de terapia génica, o como un antígeno para fines de vacunación. A la información heteróloga se hace referencia como "transgén". Los métodos según la presente invención son aplicables con un adenovirus, que comprende cualquier transgén, y por lo tanto la naturaleza del transgén no es en sí misma material de la presente invención.

Se han descrito varios posibles transgenes por ejemplo en el documento WO 98/22588, p.42-49. Los transgenes que pueden estar presentes en un virus según la invención pueden ser por ejemplo genes terapéuticos, tal como genes supresores de tumores, incluyendo pero no limitados a p53, p16, APC, DCC, NF-1, WT-1, p21, BRCA1, BRCA2, y similares; enzimas, tal como citosina desaminasa, HGPRT, glucocerobrosidasa, timidina quinasa de HSV o timidina quinasa humana, etc.; hormonas, tal como hormona del crecimiento, prolactina, eritropoyetina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del tiroides, leptina, ACTH, angiotensina, insulina, glucagón, somatostatina, calcitonina, vasopresina, y similares; interleuquinas y citoquinas, tal como IL-1, IL-3, IL-12, G-CSF, GM-CSF, TNF, y similares; genes de recambio que faltan o están mutados en trastornos específicos, tal como ADA, factor IX, CFTR, etc.; otros genes terapéuticos tal como inhibidores de angiogénesis, inhibidores del ciclo celular y similares; construcciones antisentido para inhibir la expresión de por ejemplo oncogenes, tal como ras, myc, jun, bcl, abl, y similares; así como antígenos para vacunas tal como antígenos víricos, por ejemplo derivados de un picornavirus, coronavirus, togavirus, flavivirus, rhabdovirus, paramixovirus, ortomixovirus, poxvirus, hepadnavirus, reovirus, retrovirus, herpesvirus, y similares, por ejemplo más específicamente antígenos del virus de la gripe (con como antígenos potenciales por ejemplo HA y/o NA), hepatitis B (con como antígeno potencial el antígeno de superficie de la hepatitis B), virus del Nilo Occidental, rabia, SARS-CoV, virus del herpes simple 1 y 2, sarampión, viruela, polio, VIH (con antígenos por ejemplo gag, env, nef, derivadas de VIH-1 o modificaciones de las mismas que incluyen versiones con codones optimizados, véase, por ejemplo, el documento WO 02/22080), Ébola, Marburgo, virus de Lassa; o antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos parasíticos (incluyendo tripanosomas, tenias, nematodos, helmintos, malaria, etc.), y similares. Claramente, el experto en la materia elegirá el gen de interés que sea útil en el marco terapéutico previsto, sea en terapia génica y/o en vacunación, y no está limitado a la lista anterior. También está claro que las regiones de control para los transgenes están preferiblemente presentes en los vectores virales recombinante cuyo fin es la expresión del transgén, por ejemplo incluyendo un promotor y una señal de poliadenilación. Todos estos son aspectos bien conocidos para el experto en la materia. Se discuten varias regiones de control en el documento WO 98/22588, p.49-55.

Lisado de las células

Después de la infección de un adenovirus, el virus se replica dentro de la célula y de esta manera se amplifica. La infección de adenovirus produce finalmente la lisis de las células que se infectan. Las características líticas del adenovirus permiten por lo tanto dos modos diferentes de producción del virus. El primer modo es recoger el virus

antes de la lisis de las células, empleando factores externos para lisar las células. El segundo modo es recoger el sobrenadante del virus después de la lisis celular (casi) completa por el virus producido (véase, por ejemplo, la patente de EE UU 6.485.958, que describe la recogida de adenovirus sin lisis de las células mediante un factor externo). Para el último modo, se requieren tiempos de incubación más largos para alcanzar lisis celular completa, y por lo tanto mayores rendimientos de virus. Además, el vertido gradual del contenido de la célula en el medio puede ser perjudicial para la integridad y rendimiento de los virus obtenidos. Por lo tanto, se prefiere emplear factores externos para lisar las células de forma activa.

Los métodos que se pueden usar para la lisis activa de las células son conocidos para el experto en la materia, y se han discutido por ejemplo en el documento WO 98/22588, p. 28-35. Los métodos útiles a este respecto son por ejemplo, congelación-descongelación, cizallamiento sólido, lisis hipertónica y/o hipotónica, cizallamiento líquido, sonicación, extrusión a alta presión, lisis con detergente, combinaciones de los anteriores, y similares. En una forma de realización de la invención, las células se lisan usando al menos un detergente. El uso de un detergente para la lisis tiene la ventaja de que es un método fácil, y es fácilmente escalable.

Detergentes

Los detergentes que se pueden usar y la manera en que se emplean son en general conocidos para el experto en la materia. Se discuten varios ejemplos por ejemplo en el documento WO 98/22588, p. 29-33. Detergentes, como se usa aquí, pueden incluir detergentes, aniónicos, catiónicos, dipolares y no iónicos. Los detergentes de ejemplo incluyen, pero no están limitados a taurocolato, desoxicolato, taurodesoxicolato, cetilpiridio, cloruro de benzalconio, ZWITTERGENT-3-14[®], CHAPS (3-[3-colamidopropil] dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidrato, Aldrich), Big CHAP, Deoxy Big CHAP, Triton X-100[®], Triton X-114[®], C12E8, Octil-B-D-Glucopiranosido, PLURONIC-F68[®], TWEEN-20[®], TWEEN-80[®] (CALBIOCHEM[®] Biochemicals), Thesit[®], NP-40[®], Brij-58[®], glucósido de octilo, y similares. Está claro para el experto en la materia que la concentración del detergente puede variar, por ejemplo dentro del intervalo de aproximadamente el 0,1%-5% (peso/peso). En ciertas formas de realización el detergente está presente en la solución de lisis a una concentración de aproximadamente el 1% (peso/peso). En algunos experimentos piloto de los inventores, el uso de Triton produjo soluciones menos viscosas que algunos de los otros detergentes probados (Tween 20, Tween 80, desoxicolato). En una forma de realización de la presente invención, el detergente usado es Triton X-100.

Nucleasa

La presente invención en formas de realización preferidas emplea nucleasa para eliminar o fragmentar ácidos nucleicos contaminantes, libres, es decir, mayoritariamente de células. Nucleasas de ejemplo adecuadas para su uso en la presente invención incluyen Benzonase[®], Pulmozyme[®], o cualquier otra DNasa y/o RNasa normalmente usada en la técnica. En formas de realización preferidas, la nucleasa es Benzonase[®], que hidroliza los ácidos nucleicos rápidamente hidrolizando los enlaces fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos, reduciendo de esta manera la viscosidad del lisado celular. Benzonase[®] se puede obtener comercialmente de Merck KGaA (código W214950).

La concentración a la que la nucleasa se emplea está preferiblemente dentro del intervalo de 1-100 unidades/ml.

Según ciertas formas de realización preferidas de la invención, la nucleasa se emplea antes de que las células se lisen (véase también el documento WO 2005/0805565). Se puede añadir tan sólo segundos antes de (o virtualmente concomitante a) el paso de lisis, pero preferiblemente la nucleasa se añade al cultivo al menos un minuto antes del paso de lisis. El cultivo celular con la nucleasa añadida se puede entonces incubar por encima de la temperatura del proceso, por ejemplo alrededor de 40°C, o la temperatura de cultivo (por ejemplo entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 37°C), o a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) o menor (por ejemplo aproximadamente 0°C), en donde en general se requieren tiempos de incubación más largos a temperatura más baja para alcanzar el mismo resultado (véase el folleto de Benzonase[®] de Merck KGaA código W 214950). Como ejemplo no limitante, la incubación se puede por ejemplo realizar a aproximadamente 37°C, durante aproximadamente 10 minutos, después de lo cual las células se lisan. Obviamente la nucleasa puede y preferiblemente aún degradará ácidos nucleicos de forma activa después del paso de lisis, y en ciertas formas de realización según la presente invención la incubación de las células con endonucleasa después de la lisis se prolonga durante aproximadamente 50 minutos (produciendo un tiempo total de tratamiento con nucleasa de aproximadamente 1 hora, aunque este tiempo puede ser efectivamente más largo, puesto que se anticipa que la nucleasa todavía será funcional hasta que se elimine en pasos de purificación posteriores). Esto es considerablemente más corto que la incubación de toda la noche divulgada en el documento WO 98/22588. Por supuesto, la incubación más larga, tal como por ejemplo incubación de 2 horas o de toda la noche o más larga (en el folleto de Benzonase[®] de Merck KGaA código W 214950, se proporcionan datos de hasta 30 horas de incubación) también es posible según métodos de la presente invención, pero no se requiere para obtener resultados aceptables.

El 'paso de lisis' (es decir, someter las células que contienen el virus producido en ellas a lisis) como se usa en estas formas de realización, significa que es un paso lisis empleando factores externos (véase en 'lisado de las células' anteriormente), tal como un detergente. Obviamente, durante el cultivo de las células en donde se propaga el adenovirus, algunas células se pueden haber lisado ya debido al virus en ausencia de factores externos. Por lo tanto, en formas de realización preferidas, tal lisis en ausencia de factores externos se ha producido en menos del 50%, preferiblemente menos del 40%, más preferiblemente menos del 30%, aún más preferido menos del 20% de las células, cuando se inicia el tratamiento con nucleasa, es decir preferiblemente la nucleasa se añade cuando las células tienen una viabilidad de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, respectivamente.

Aunque no preferidos (véase anteriormente), también se podrían usar métodos que son dependientes de la lisis de las células en ausencia de factores externos. Se han descrito procesos que implican lisis 'espontánea', en donde se desaprueba el uso de benzonasa (véase la patente de EE UU 6.485.958). Sin embargo, según los inventores presentes será beneficioso también en tales sistemas añadir nucleasa durante las fases tardías del cultivo, es decir, preferiblemente cuando las células en donde se propaga el virus aún tienen una viabilidad del al menos el 5%, más preferiblemente de al menos el 10%, aún más preferiblemente de al menos el 20% (es decir, cuando menos del 95%, el 90%, el 80% de las células se han lisado, respectivamente). Se anticipa que esto mejoraría el proceso en la calidad de los virus obtenidos cuando se empleara este paso. El descubrimiento del momento óptimo (es decir, correspondiente al porcentaje óptimo de células que se han lisado) para añadir la nucleasa en estos aspectos de la invención dependerá de la cantidad de nucleasa añadida y el descenso de la actividad específica de la nucleasa durante la incubación, y se puede determinar de forma empírica por el experto en la materia, ahora que la ventaja de la adición de nucleasa al cultivo por sí se ha divulgado aquí (véase también el documento WO 2005/080556). El lisado obtenido según estas formas de realización se puede purificar adicionalmente empleando métodos y pasos como se discute en el presente documento, tal como ultrafiltración y opcionalmente cromatografía.

La solicitud internacional de patente WO 03/097797 describe métodos alternativos para purificar partículas de adenovirus a partir de lisados celulares, que comprenden la adición de un agente de precipitación selectivo para precipitar impurezas de ADN. Tal método también se puede combinar con métodos de purificación según la presente invención, incluyendo el paso de ultrafiltración en el que se aplica presión inversa en el lado del permeado. Este es un método alternativo para eliminar ácido nucleico libre, en lugar de fragmentarlo mediante tratamiento con nucleasa. Aunque se especifica en el documento WO 03/097797 que no se requiere un paso de nucleasa cuando se usa ese método, se usa tal paso en una fase posterior del procedimiento por eficacia. La forma de realización descrita antes, incluyendo el paso de añadir un nucleasa antes de la lisis celular, se podría combinar de forma adecuada con la adición de un agente de precipitación selectivo tras la lisis, haciendo de esta manera un paso de adición de nucleasa más adelante en el proceso (como se prefiere en el documento WO 03/097797) potencialmente superfluo.

Clarificación

En formas de realización preferidas de la invención, el lisado celular que comprende el virus se clarifica. La clarificación se puede hacer mediante un paso de filtración, eliminando los restos celulares y otras impurezas. Los filtros adecuados pueden utilizar filtros de celulosa, fibras de celulosa regenerada, fibras de celulosa combinadas con auxiliares de filtrado inorgánicos (por ejemplo, tierra de diatomeas, perlita, sílice ahumada), filtros de celulosa combinados con auxiliares de filtrado inorgánicos y resinas orgánicas, o cualquier combinación de los mismos, y filtros poliméricos (los ejemplos incluyen pero no están limitados a nailon, polipropileno, polietersulfona) para alcanzar la eliminación eficaz y recuperaciones aceptables. En general, un proceso con múltiples fases es preferible pero no requerido. Un proceso de dos o tres fases de ejemplo consistiría en filtro(s) grueso(s) para eliminar precipitados grandes y restos celulares seguido por filtro(s) de segunda fase de limpieza con tamaños de poros nominales mayores de 0,2 micrómetros pero menores de 1 micrómetro. La combinación óptima puede ser una función de la distribución del tamaño del precipitado así como otras variables. Además, también se pueden usar operaciones de fase única que emplean un filtro relativamente impermeable o centrifugación para la clarificación. Más generalmente, cualquier aproximación de clarificación incluyendo pero no limitado a filtración convencional, micofiltración, centrifugación, o alimentación de auxiliares de filtrado (por ejemplo, tierra de diatomeas) en combinación con filtración convencional o de profundidad, que proporciona un filtrado de claridad adecuada para no ensuciar la membrana y/o resinas en los pasos posteriores, será aceptable para usar en el paso de clarificación de la presente invención.

En una forma de realización, se usa la filtración en profundidad y filtración en membrana. Los productos comercialmente disponibles útiles en este respecto se mencionan por ejemplo en el documento WO 03/097797, p.20-21. Las membranas que se pueden usar pueden estar compuestas de diferentes materiales, se pueden diferenciar el tamaño de poro, y se pueden usar en combinaciones. Se pueden obtener comercialmente de varios vendedores.

En ciertas formas de realización de la invención, se usa una combinación de filtros de 0,8 μm y 0,45 μm , por ejemplo filtros Sartopore-2, para la clarificación.

Ultrafiltración/diafiltración

5 Según la presente invención, la suspensión de virus se somete a ultrafiltración (algunas veces denominada diafiltración cuando se usa para intercambio de tampón, ver más adelante) al menos una vez durante el proceso, por ejemplo para concentrar el virus y/o intercambio de tampón, y/o para la concentración y diafiltración del producto clarificado, y en particular para la eliminación de contaminantes, tal como proteínas de la célula huésped, ADN (fragmentado) de la célula huésped, componentes del medio de cultivo, detergentes y benzonasas. El proceso usado para concentrar el virus según el método de la presente invención puede incluir cualquier proceso de filtración (por ejemplo, ultrafiltración (UF)) donde la concentración del virus aumenta forzando a que el diluyente pase a través de un filtro de tal manera que el diluyente se elimina de la preparación del virus mientras que el virus es incapaz de pasar a través del filtro y por lo tanto permanece, en forma concentrada, en la preparación de virus. La UF se describe en detalle en, por ejemplo *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*, L. Zeman y A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1996); y en: *Ultrafiltration Handbook*, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9). Un proceso de filtración preferido es la filtración de flujo tangencial ("FFT") como se describe en, por ejemplo el catálogo de MILLIPORE titulado "Pharmaceutical Process Filtration Catalogue" pp. 177-202 (Bedford, Massachusetts, 1995/96). La FFT se usa ampliamente en la industria de bioprocesamiento para la recogida de células, clarificación, purificación y concentración de productos incluyendo virus. El sistema se compone de tres corrientes distintas del proceso: la solución de alimentación, el permeado y el retenido. Dependiendo de la aplicación, se pueden usar filtros con diferentes tamaños de poro. En la presente invención el retenido contiene el producto (virus), y se puede usar para pasos adicionales de purificación si se desea. Para esto, la membrana de ultrafiltración particular seleccionada tendrá un tamaño de poro lo suficientemente pequeño para retener al virus pero lo suficientemente grande para limpiar las impurezas de forma eficaz. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, para valores de corte de peso molecular nominal de adenovirus (NMWC) entre 100 y 1000 kDa puede ser apropiado, por ejemplo membranas con un NMWC de 300 kDa o 500 kDa. La composición de la membrana puede ser, pero no está limitada a, celulosa regenerada, polietersulfona, polisulfona, o derivados de las mismas. Las membranas pueden ser hojas planas (también llamadas pantallas planas) o fibras huecas. UF normalmente se refiere a filtración usando filtros con un tamaño de poro menor de 0,1 μm . Los productos (aquí: adenovirus) generalmente se retienen, mientras que se puede reducir el volumen a través de permeación (o mantenerse constante durante la diafiltración añadiendo tampón a la misma velocidad con la que el permeado, que contiene tampón e impurezas, se elimina en el lado del permeado). Las dos geometrías más ampliamente utilizadas para FFT en la industria biofarmacéutica son módulos de placa & marco (pantalla plana) y de fibra hueca. Las unidades de fibra hueca para la ultrafiltración y microfiltración fueron desarrolladas por Amicon y Ramicon a principios de la década de 1970 (Cheryan, M. *Ultrafiltration Handbook*), incluso aunque ahora hay muchos vendedores incluyendo Spectrum y GE Healthcare. Los módulos de fibra hueca consisten en una serie de fibras que se autoportan con una capa externa densa que da a las membranas su permselectividad. Los diámetros de las fibras varían desde 0,5 mm – 0,3 mm. Una ventaja de los módulos de fibra hueca es la disponibilidad de filtros de áreas de membrana pequeñas (ca. 16 cm^2) a áreas de membrana muy grandes (ca. 20 m^2) permitiendo el aumento progresivo lineal y simple. En ciertas formas de realización preferidas según la invención, se usan las fibras huecas para FFT. Se ha descrito que estas dan menos cizalla y una proporción partícula viral/unidad de infección (VP/UI) mejor que las membranas de pantalla plana. Además, la presión transmembrana es generalmente menor en fibras huecas que con pantallas planas. En ciertas formas de realización, se usan fibras huecas de 0,05 μm de tamaño de poro según la invención.

La ultrafiltración puede comprender diafiltración (DF), usando ultrafiltros y es una manera ideal para eliminar e intercambiar sales, azúcares, solventes no acuosos, la separación de especies libres de las unidas, eliminación de material de bajo peso molecular, o cambio rápido de entornos iónicos y/o de pH. Los microsolutos se eliminan más eficazmente añadiendo solvente a la solución que se está ultrafiltrando a una velocidad igual a la velocidad de UF. Esto lava microespecies de la solución a un volumen constante, purificando el virus retenido. La presente invención utiliza un paso de DF para intercambiar el tampón del lisado, opcionalmente antes de cromatografía adicional u otros pasos de purificación, pero particularmente para eliminar impurezas de las preparaciones de virus. Según una forma de realización de la invención se realiza la DF mediante FFT para el intercambio de tampón, en donde la adición de tampón iguala la eliminación del permeado.

Se puede usar UF/DF para concentrar y/o intercambiar tampón de las suspensiones de virus según la presente invención en diferentes estadios del proceso de purificación, por ejemplo el lisado y/o las suspensiones de virus adicionalmente purificadas tal como las que se han sometido a cromatografía. Sin embargo, usando los métodos según la presente invención, en donde se aplica una presión inversa en el lado del permeado, se encontró de forma inesperada que es posible purificar adenovirus suficientemente sin uso adicional de columnas de cromatografía o filtros de intercambio iónico. Esto tiene varias ventajas: a) el proceso se hace más sencillo, y no requiere material de columna caro, material de columna que a su vez no necesita ser validado, limpiado, etc.; b) el proceso se hace más

rápido, porque no se requiere ningún paso de cromatografía y fraccionamiento que exige mucho tiempo; c) el rendimiento total aumentará porque cada paso extra de purificación tras la ultrafiltración producirá inevitablemente pérdida de producto de virus.

5 La invención por lo tanto proporciona un método nuevo y conveniente para la purificación de un adenovirus recombinante, dicho método comprende: a) cultivar células que están infectadas con dicho adenovirus recombinante, b) lisar dichas células y eliminar y/o fragmentar el ácido nucleico libre (es decir impurezas de ácido nucleico, tal como ADN de la célula huésped), para proporcionar un lisado que comprende el adenovirus recombinante, c) clarificar el lisado para obtener una preparación de adenovirus, d) someter la preparación de adenovirus a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, para concentrar la preparación de adenovirus, e) someter la preparación de adenovirus del paso d) a ultrafiltración (diafiltración), en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, e intercambiar con ella al menos 5, preferiblemente al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 volúmenes de diafiltración (VDF) de tampón, en donde un VDF es el volumen del retenido tras la concentración en el paso d), y f) preferiblemente esterilización por filtración de la preparación de adenovirus, el método está caracterizado en que en los pasos d) y e) se aplica presión inversa en el lado del permeado, y en que el método no comprende un paso de intercambio aniónico ni un paso de cromatografía de exclusión molecular. En una forma de realización preferida, la invención por lo tanto proporciona un método para la purificación de un adenovirus recombinante, dicho método consiste esencialmente en: a) cultivar células que están infectadas con dicho adenovirus recombinante, b) lisar dichas células y eliminar y/o fragmentar el ácido nucleico libre, para proporcionar un lisado que comprende el adenovirus recombinante, c) clarificar el lisado para obtener una preparación de adenovirus, d) someter la preparación de adenovirus a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, para concentrar la preparación de adenovirus, e) someter la preparación de adenovirus del paso d) a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, e intercambiar con ella al menos 5, preferiblemente al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 volúmenes de diafiltración (VDF) de tampón, en donde un VDF es el volumen del retenido tras la concentración en el paso d), el método está caracterizado en que en los pasos d) y e) se aplica presión inversa en el lado del permeado. Este proceso por lo tanto no comprende un paso de cromatografía de exclusión molecular, y además está desprovisto de un paso de cromatografía de intercambio aniónico o filtración de intercambio aniónico. Tales pasos se pueden añadir si se desea, pero una de las ventajas del método presente es que el número de pasos cromatográficos se reduce a cero, produciendo las ventajas descritas anteriormente. Los presentes inventores encontraron inesperadamente que el adenovirus recombinante que se obtiene usando este proceso, probablemente cumple las especificaciones explicadas para que un lote de virus recombinante se use en clínica (cantidad residual de ADNch <10 ng/dosis, asumiendo una dosis de 1E11 pv/ml, proporción PV/IU<30). El paso d) de este método podría no ser estrictamente requerido, pero es conveniente disminuir el volumen de la suspensión de virus antes de la diafiltración para el intercambio de tampón en el paso e), y por lo tanto la invención también proporciona este método sin el paso d), aunque el método que incluye el paso d) es preferido. En una forma de realización preferida de estos métodos, el paso b) comprende: b, i) añadir nucleasa al cultivo de células, y posteriormente b, ii) lisar dichas células para proporcionar un lisado que comprende el virus recombinante. Aplicando este orden de primero añadir la nucleasa y posteriormente lisar las células, la cantidad de ADN de la célula huésped se puede reducir comparado con el orden en donde las células primero se lisan y posteriormente se tratan con nucleasa (véase anteriormente, y el documento WO 2005/080556). Al final del proceso, es decir tras el paso de diafiltración por FFT, la preparación de adenovirus preferiblemente se somete a esterilización por filtración, como es normal en procesos para materiales de grado farmacéutico, y como sabe el experto en la materia. Tal esterilización por filtración se puede por ejemplo realizar adecuadamente filtrando la preparación a través de un filtro de 0,22 µm. Opcionalmente, antes de este filtro de 0,22 µm, se realiza un paso de filtración a través de un filtro de 0,45 µm, y se entenderá que tal paso está dentro del ámbito del proceso como esencialmente se divulga en el presente documento (es decir, no concede un paso que desviaría el proceso del proceso que consiste esencialmente en los pasos a)-e) o a)-f), descrito anteriormente). Después del paso de esterilización por filtración, la preparación de adenovirus está lista para uso clínico.

50 En lugar de o además del tratamiento con una nucleasa tal como benzonasa para fragmentar el ácido nucleico libre (principalmente ADN de la célula huésped), se puede aplicar la precipitación selectiva (eliminación) de impurezas de ADN en el medio de cultivo celular de después de la lisis, por ejemplo, mediante precipitación con una cantidad adecuada de un agente de precipitación selectivo tal como bromuro de domifeno (DB), CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de benzetonio (BTC), cloruro de tetradecil-trimetil-amonio (TTA), polietilenimina (PEI), etc., como se divulga en detalle en el documento WO 03/097797.

El método preferido de ultrafiltración/diafiltración empleado comprende FFT.

60 Según la invención, se aplica presión inversa en el lado del permeado. Esto produce la mejora divulgada en el presente documento por primera vez permitiendo un proceso para obtener un adenovirus recombinante lo suficientemente puro que cumple las especificaciones para ensayos clínicos, sin el uso de pasos de cromatografía en columna, o centrifugación en densidad en cloruro de cesio molesto y no económico. La presión inversa en el lado

del permeado distingue la presente invención de los métodos de ultrafiltración descritos en la técnica para la purificación de adenovirus, en donde no se aplica presión inversa, es decir, donde el lado del permeado está abierto a la atmósfera (la presión inversa es cero en esos casos [las presiones aquí se dan todas comparadas con la presión atmosférica, que se ajusta a cero]). Los medios para suministrar la presión inversa en el lado del permeado no son críticos para la presente invención, en tanto que produzcan una presión inversa (contrapresión) en el lado del permeado, y puede ser cualquier medio adecuado para alcanzar tal presión inversa. Tal presión inversa en el lado del permeado se puede aplicar por ejemplo de forma adecuada mediante una bomba, que proporciona presión inversa al permeado. Un método sencillo de aplicar presión inversa es cerrando parcialmente la salida del permeado, por ejemplo sujetando parcialmente con una pinza el tubo en el lado del permeado, o mediante una bomba de permeado tal como una bomba de manguera, bomba centrífuga, bomba rotatoria, bomba recíproca, y similares, aplicando cualquier medio que prevenga que el lado permeado esté completamente abierto a la atmósfera, y similares, y los medios adecuados serán aparentes para el experto en la materia después de tener el conocimiento de las ventajas divulgadas en la presente solicitud. El uso de una bomba en el lado del permeado puede producir alguna pulsación (fluctuación) de la presión inversa, que no parece que tenga efecto negativo en los métodos divulgados aquí, y puede incluso ser beneficioso. La ventaja de usar una bomba para aplicar la presión inversa es que la presión inversa se puede regular fácilmente.

La presión inversa (presión de permeado) que se va a aplicar según la invención es al menos de 3 kPa, preferiblemente al menos aproximadamente 5 kPa. En ciertas formas de realización, la presión inversa es al menos 10 kPa, o al menos 15 kPa, o al menos 20 kPa, o al menos 25 kPa, o al menos 30 kPa, o al menos 40 kPa, o al menos 50 kPa, o al menos 100 kPa, o al menos 150 kPa, o al menos 200 kPa, o al menos 250 kPa. En ciertas formas de realización, la presión inversa está por ejemplo entre aproximadamente 3-80 kPa. Se puede determinar fácilmente una presión inversa adecuada de forma empírica por el experto en la materia, y dependerá por ejemplo de la configuración de la columna de membrana de diafiltración (por ejemplo, longitud). En general, se prefiere usar una presión inversa que esté cercana a la presión de salida del retenido, porque si la presión inversa es muy alta, el módulo de diafiltración se usa de forma menos eficaz. Una fibra hueca más larga por ejemplo producirá una presión de salida mayor, de modo que en tales casos la presión inversa también se aumenta. Típicamente, la presión inversa aplicada según la invención no es mayor de 400 kPa. En ciertas formas de realización, la presión inversa aplicada según la invención no es mayor de 300 kPa, o no es mayor de 200 kPa, o no es mayor de 100 kPa, o no es mayor de 80 kPa.

La presión de entrada mínima de una fibra hueca es aproximadamente 10 kPa. La presión de entrada de una fibra hueca es mayor que la presión de salida. La presión máxima que se puede aplicar a una fibra hueca es aproximadamente 500 kPa.

La aplicación de presión inversa en el lado del permeado reduce la presión transmembrana (PTM) durante el paso de ultrafiltración, reducción de la PTM que puede contribuir a los resultados mejorados descritos en el presente documento. La PTM se puede calcular como sigue: $PTM = \{(P_{in} + P_{out})/2\} - P_{perm}$ (en donde P_{in} es la presión de entrada, P_{out} es la presión de salida, y P_{perm} es la presión de permeado [siendo la última cero en los procesos descritos hasta ahora para purificación de virus, y siendo de al menos 3 kPa según la invención]). En ciertas formas de realización, la presión transmembrana se mantiene por debajo de aproximadamente 150 kPa, o por debajo de 100 kPa, o por debajo de 50 kPa, o por debajo de 27 kPa, o por debajo de aproximadamente 20 kPa, o por debajo de aproximadamente 13 kPa, o por debajo de aproximadamente 7 kPa. Estos valores son valores medios a lo largo de la longitud de la fibra hueca. Esto se puede establecer de forma adecuada por el experto en la materia mediante la variación de la presión de entrada y salida en el lado del retenido y la presión inversa en el lado del permeado. Estos valores son valores medios a lo largo de la duración del paso de FFT, y en formas de realización preferidas estos valores son los valores máximos para al menos el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, preferiblemente al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% de la duración del paso de FFT. De nuevo, la configuración de la columna de membrana, por ejemplo la longitud, puede tener efecto en el valor para la presión PTM: una fibra hueca más larga por ejemplo producirá generalmente una PTM mayor (debido a la mayor presión de salida), a menos que la presión inversa que se aplica según la invención aumente correspondientemente según la fórmula anterior.

La aplicación de presión inversa en el lado del permeado (y el descenso resultante en la presión transmembrana) mejora el rendimiento de los adenovirus obtenidos (véase el ejemplo 3), y la pureza de los mismos (de modo que puede que no se requieran ya los pasos posteriores de purificación).

En formas de realización preferidas, la ultrafiltración se usa primero para reducir el volumen de la suspensión de virus, por ejemplo por un factor de 5, simplemente aplicando ultrafiltración sin alimentar tampón al retenido (que comprende el virus). Ya en este paso se debe aplicar la presión inversa al permeado.

Posteriormente, la suspensión de virus se diafiltra (usando la misma membrana de ultrafiltración, preferiblemente un módulo de fibra hueca de FFT), en donde se pueden usar diferentes tampones para el intercambio de tampón. Se deben usar al menos 5 volúmenes de diafiltración (VDF), preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9, o 10 DFV durante el

paso de diafiltración, que de nuevo se debe llevar a cabo según la invención con la aplicación de presión inversa al permeado. Para mejorar más la pureza del virus si se desea, se pueden usar más VDF adecuadamente, por ejemplo, al menos 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50 o más VDF. Este paso de diafiltración normalmente se lleva a cabo como diafiltración a volumen constante, añadiendo tampón al retenido (suspensión de virus) a la misma velocidad a la que se elimina el permeado que contiene tampón e impurezas en el lado del permeado.

Al final del proceso de purificación, en una forma de realización preferida el virus se puede diafiltrar contra un tampón de formulación de (adeno)virus adecuado, tampones de formulación que como tales son conocidos para el experto en la materia. De forma alternativa, el virus se podría diafiltrar contra un tampón adecuado para pasos adicionales de proceso, si se desea, por ejemplo un tampón adecuado para aplicaciones posteriores de intercambio de aniones (por ejemplo NaCl 0,25 para cargar un filtro de intercambio de aniones Mustang Q para la purificación de Ad35).

La presente invención tiene como una característica distintiva que durante un paso de ultrafiltración en la purificación de virus en donde el retenido contiene el virus, se aplica una presión inversa (de al menos 3 kPa) en el lado del permeado. No se aplicó presión inversa en los procesos de purificación de virus descritos en el estado de la técnica, por ejemplo, los documentos US 2002/182723, WO 98/22588 o WO 03/097797. Además, la patente de EE UU 5.947.689 describe un sistema de filtración automatizado en el que la velocidad del flujo del retenido (flujo transversal) se controla basado en las presiones medidas. Cuando la presión aumenta, se baja el flujo transversal, produciendo presiones menores. No se describe allí presión en el filtrado (lado del permeado). Además, la patente de EE UU 4.579.662 describe un método de filtración mediante el cual se limpia una membrana manchada forzando un líquido de limpieza desde el lado del permeado (filtrado) al lado del retenido. Durante la limpieza la filtración se interrumpe temporalmente y el flujo se invierte (permeado a retenido). Esa divulgación no describe aplicar una presión en lado del permeado mientras que el filtrado continúa fluyendo desde el lado del retenido al del permeado.

Purificación adicional

Aunque es deseable proporcionar un proceso para la purificación de adenovirus que sea tan sencillo y económico como sea posible, como se alcanza mediante el método divulgado en el presente documento donde se aplica presión inversa al permeado durante la ultrafiltración/diafiltración, y preferiblemente no se requiere purificación adicional tras el paso de UF/DF, es sin embargo posible aplicar pasos adicionales de purificación tras el paso de UF/DF, si así se desea. Por lo tanto, según ciertas formas de realización de la invención, la suspensión de virus que se ha obtenido mediante un método según la invención se puede opcionalmente purificar más, por ejemplo, mediante métodos generalmente conocidos para el experto en la materia, tal como centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, documento WO 98/22588, p. 59-61), o preferiblemente cromatografía (por ejemplo discutida en el documento WO 98/22588, p. 61-70). Se han descrito muchos procesos para la purificación adicional de virus, en donde se incluyen pasos de cromatografía en el proceso. El experto en la materia será consciente de estos procesos, y puede variar el modo exacto de emplear los pasos cromatográficos para optimizar el proceso de la invención.

Es por ejemplo posible purificar ciertos virus mediante una combinación de pasos cromatográficos de intercambio aniónico e intercambio catiónico (véase la patente de EE UU 6.008.036). También es posible emplear un medio de hidroxapatita para purificar adenovirus (véase el documento WO 02/44348). También se podría usar un paso de adsorción en fase reversa (véase, por ejemplo, el documento WO 03/097797, p. 26).

Para la purificación de adenovirus, es normalmente preferido usar al menos un paso de cromatografía de intercambio aniónico. El uso de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de adenovirus se ha descrito de forma extensa, y este aspecto está por lo tanto al alcance del experto en la materia (véase, por ejemplo, patente de EE UU 5.837.520; Huyghe et al., 1995, Human Gene Therapy 6: 1403-1416); patente de EE UU 6.485.958; documento WO 00/50573; patente de EE UU 6.586.226; patente de EE UU 6.537.793. Además de las columnas de intercambio aniónico, son adecuados productos cromatográficos de membranas de intercambio aniónico ('filtros de intercambio aniónico'). Para el uso de estos filtros y sus ventajas en la purificación de adenovirus véase, por ejemplo, el documento WO 03/078592. Claramente, el empleo de tales filtros también está dentro del ámbito del término 'cromatografía de intercambio aniónico' como se usa en el presente documento. Los filtros de intercambio aniónico adecuados para su uso en estos métodos de la invención son conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles (véase, el documento WO 03/078592, párrafos [40]-[41]), por ejemplo de Pall (por ejemplo serie Mustang™) y de Sartorius (por ejemplo serie Sartobind).

Como se ha descrito anteriormente, el proceso puede emplear adecuadamente además un paso de cromatografía de exclusión molecular (véase, por ejemplo, el documento WO 97/08298; patente de EE UU 6.261.823). En el paso de exclusión molecular, se alcanza una separación de grupo de partículas virales de impurezas de bajo peso molecular. Es por ejemplo posible cargar aproximadamente el 5-30%, preferiblemente aproximadamente el 10% del

volumen de columna en la columna de exclusión molecular (modo de separación de grupo de la cromatografía de exclusión molecular).

5 Por lo tanto, en ciertas formas de realización de la invención, una suspensión de adenovirus que se ha preparado según el método de la invención se purifica adicionalmente usando un paso de cromatografía de intercambio iónico y un paso de cromatografía de exclusión molecular.

Tampones

10 Se pueden usar muchos tampones durante la purificación del virus según la presente invención. En varias formas de realización de la presente invención, los tampones usados para UF/DF y cromatografía de intercambio iónico en general contienen NaCl 0,1-1,0 M y tampón TRIS (por ejemplo 50 mM, pH 7,5). En ciertas formas de realización, se usa un tampón que contiene NaCl 0,25 mM/ PS80 al 0,05%, MgCl₂ 2 mM/ Tris 50 mM pH 8,0 para la purificación de Ad35.

15 En algunas formas de realización de la invención, se intercambia el tampón de la preparación de adenovirus a un tampón que comprende aproximadamente NaCl 1 M durante la diafiltración, y posteriormente a tampones con menor fuerza iónica. Se ha mostrado en la solicitud internacional de patente WO 2005/080556 que tal paso puede mejorar la eliminación de proteínas y ADN de la preparación. Sin embargo, tal paso no es estrictamente requerido, y debido al riesgo posiblemente aumentado de agregación a estas fuerzas iónicas altas, los presentes inventores probaron si un proceso sin tal paso de alta sal produce un virus (Ad35) suficientemente puro. Aunque la diafiltración contra un tampón que comprende NaCl 1 M parece que mejora ligeramente la eliminación de ADN y proteína, se encontró que no se requiere la diafiltración frente a un tampón con alta sal (que comprende NaCl 1 M) para un buen proceso de purificación de adenovirus según la invención. Por lo tanto, la fuerza iónica durante la diafiltración se puede mantener por debajo de la de una solución que comprende NaCl 1 M. Sin embargo, si esto no proporcionara preparaciones de virus suficientemente puras, se prefiere incluir un paso en donde dicho intercambio de tampón con el retenido comprende un paso de intercambio de tampón con un tampón que comprende cloruro de sodio entre 0,8 M y 2 M u otra sal que de igual fuerza iónica. Preferiblemente, tal proceso comprende el posterior intercambio de tampón con un tampón que tiene una fuerza iónica de un tampón que comprende menos de NaCl 0,5 M. La deseabilidad de tal paso de diafiltración con alta sal (es decir, contra un tampón que tiene una fuerza iónica de una solución que contiene NaCl al menos 0,8 M, y preferiblemente menos de 2 M, por ejemplo 1 M) puede depender de la concentración del virus y/o la concentración de células huésped en el material de partida, y el experto en la materia será capaz de decidir si incluir o no tal paso, basado en experimentos piloto en los que el material de virus obtenido se analiza para el contenido y pureza de ADN. En una forma de realización según la invención, se intercambia el tampón del adenovirus durante la separación de grupo por – y por último se almacena en- el tampón que también se usa para el Estándar Mundial de Adenovirus (Hoganson et al, Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing Marzo 2002, p. 43-48): Tris 20 mM pH 8, NaCl 25 mM, glicerol al 2,5%. En una forma de realización preferida sin embargo, no se requiere separación de grupo, pero se intercambia el tampón del adenovirus directamente durante la diafiltración al tampón de formulación.

40 Obviamente, se pueden usar muchos otros tampones, y se pueden encontrar varios ejemplos de formulaciones adecuadas para el almacenamiento y administración farmacéutica de preparaciones de (adeno)virus purificados, por ejemplo, en la patente europea no. 0853660, y en las solicitudes internacionales de patente WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763.

45 Las referencias citadas en esta especificación se incorporan junto a esta para la parte específica indicada, o en su totalidad si no se indica parte específica.

50 Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar adicionalmente la invención por medio de ciertas formas de realización de la invención, y no se debe considerar que limiten el ámbito de la presente invención en manera alguna.

Ejemplos

55 *Ejemplo 1. La adición de nucleasa al cultivo de células en lugar de al lisado de células mejora el proceso para la purificación de virus.*

En este ejemplo se muestra que la adición de nucleasa al cultivo de células antes de lisar las células reduce la cantidad de ADN residual de la célula huésped en el producto purificado final.

60 En las carreras 1 y 2 se lisó un cultivo de 10 litros de células PER.C6[®] con Triton X-100[®] (Sigma) en el día 2,5 tras la infección con un vector adenoviral. Treinta minutos después de la lisis, se añadieron Benzonase[®] (Merck KgaA, 50

unidades/ml) y $MgCl_2$ (2 mM). Después de otros 30 minutos el producto de Triton X-100[®]/Benzonase[®] (T/B) se clarificó mediante filtración. Esta por lo tanto fue una carrera según procesos conocidos en la técnica.

En las carreras 3-8, se añadieron Benzonase[®] (50 U/ml) y $MgCl_2$ (2 mM) a un cultivo de 10 litros de células PER.C6 (el día 2,5 tras la infección), y después de 10 minutos de incubación las células se lisaron con Triton X-100[®] al 1%. Después de una incubación adicional de 50 minutos el producto de Benzonase[®]/Triton X-100[®] (B/T) se clarificó mediante filtración.

La diferencia con el proceso conocido de la técnica por lo tanto es en el orden en el que se añadieron la nucleasa (Benzonase[®]) y el detergente (Triton X-100[®]): clásicamente primero se lisan las células, y posteriormente se añade la nucleasa (denominado en el presente documento producto T/B), mientras que en el proceso según la invención, primero se añade la nucleasa y posteriormente se lisan las células (denominado en el presente documento producto B/T). Esto se muestra de forma esquemática en la figura 1.

Las muestras se purificaron después adicionalmente. La clarificación se realizó mediante filtración de profundidad (filtro Clarigard de 0,5 μm , Millipore) seguida por clarificación adicional sobre un filtro Sartopore 2 de 0,8/0,45 μm (Sartorius). El material clarificado se concentró 5 veces a través de una fibra hueca de 0,05 μm (Spectrum), seguido mediante diafiltración con posteriormente 6 volúmenes de NaCl 1,0 M/TRIS 50 mM pH 7,5 y 4 volúmenes de NaCl 0,4 M/Tris 50 mM pH 7,5. El retenido diafiltrado se cargó en una columna de Sepharosa Q-XL (Amersham) y la fracción de virus se eluyó con NaCl 0,55 M/TRIS 50 mM pH 7,5. Esta fracción se purificó adicionalmente y el tampón se intercambió con una columna de Sepharosa 4 FF (Amersham). El producto purificado generado se concentró a la concentración deseada con una fibra hueca (tamaño de poro 0,05 μm , Spectrum), se filtró por 0,22 μm y se alícuoteó. Las muestras del producto purificado se analizaron para ADN residual de células huésped mediante Q-PCR.

El tratamiento T/B dio como resultado una reducción de ADN que tras el procesamiento adicional posterior pudo satisfacer justo la especificación requerida en el material terminado y relleno. Los requerimientos reguladores para ADN residual de células huésped para formulaciones de virus vivos son <10 ng por dosis (se asume que una dosis contiene $1E11$ partículas virales).

Como se muestra en la tabla 1, cambiar los pasos de Triton X-100[®] y Benzonase[®] redujo la cantidad de ADN residual de células huésped en el producto purificado significativamente: mediante la adición de la nucleasa antes de la lisis activa de las células la cantidad de ADN residual de células huésped se pudo reducir de 10 a 40 veces, a menos de 0,1 ng/ $1E11$ partículas virales.

Además, está claro del análisis por SDS-PAGE (Fig. 2) que tras la clarificación por filtración de profundidad y de membrana de un producto B/T un número de proteínas de la célula huésped, entre las cuales una cantidad significativa de proteínas histona (M_w aproximadamente 10-20 kDa en geles, identidad confirmada mediante espectrometría de masa), se eliminó durante la clarificación mientras que estas proteínas están claramente todavía presentes en el producto T/B clarificado.

Por lo tanto, la adición de nucleasa antes de lisar las células produce ventajas significativas sobre las conocidas del estado de la técnica (véase el documento PCT/EP2005/050739). Sin querer estar unido a ninguna teoría, las explicaciones posibles para las diferencias entre las carreras 1 y 2 (T/B) por una parte y las carreras 3-8 (B/T) por otra parte pueden incluir:

1. Tras la adición de Benzonase[®] el ADN liberado por las células lisadas debido a la producción de virus ya se puede digerir. Tan pronto como el ADN se libera de las células lisadas por Triton, la Benzonase[®] está presente para digerir inmediatamente el ADN, previniendo de esta manera la formación de grandes agregados de ADN. La digestión de ADN no agregado es probablemente más eficaz que la digestión de los agregados principales de ADN.
2. El tiempo total de incubación con Benzonase[®] aumenta con 30 minutos, produciendo una digestión más eficaz (ver el folleto de Benzonase[®] de Merck KGaA código W 214950).
3. Probablemente se forman complejos mayores de histonas cuando el ADN se digiere inmediatamente tras la liberación y estas partículas mayores son retenidas por los filtros de clarificación. La retención de los complejos histona-ADN durante la clarificación también podría haber contribuido a la reducción del ADN residual de células huésped.

Se han probado varias resinas de intercambio aniónico por ejemplo, QAE 550C y Super Q 650M (adquiridas de Tosoh), Q Sepharosa HP, ANX Sepharosa 4FF, DEAE Sepharosa, Q Sepharosa XL, Q Sepharosa Big Bead y Q Sepharosa FF (adquiridas de Amersham). Aunque todas estas resinas fueron adecuadas para la purificación de adenovirus recombinantes, se determinó que Q Sepharosa XL era la más adecuada para el propósito basado en la separación de virus de las proteínas de las células huésped y el ADN de células huésped, y las características de

flujo. Además, se obtuvieron muy buenos resultados usando un filtro Sartobind 75 (filtro cargado que contiene grupos aniónicos, Sartorius) en lugar de una columna de intercambio aniónico.

5 Se probaron varias resinas de exclusión molecular, por ejemplo Sephacryl S300, Sephacryl S500, Sepharosa 4FF y Sepharosa 6 FF (todas adquiridas de Amersham). Aunque todas estas resinas fueron adecuadas para la purificación de adenovirus recombinantes, se encontró la Sepharosa 4FF la más adecuada para el propósito basado en la capacidad de separar virus de las proteínas y ADN de las células huésped.

10 Basados en estos y otros resultados, se muestra de forma esquemática un posible proceso para la purificación de adenovirus en la figura 3 (véase también el documento WO 20005/080556).

Ejemplo 2: La aplicación de presión inversa en el lado del permeado durante UF/DF aumenta la pureza y recuperación de adenovirus.

15 Se hicieron crecer células PER.C6 en un tanque en agitación hasta una densidad celular que variaba de 0,9 a 2,6 millones de células/ml. Estas células se infectaron con un vector Ad35 que comprendía un transgén CS (gen circumsporozoite (CS) con codón optimizado de *Plasmodium falciparum*, clon 02-659, como se describe en el documento WO 2004/055187; adenovirus recombinante llamado Ad35.dE3.Ad5orf6/7.AdApt535, o brevemente Ad35.CS, véase también el documento WO 2005/080556) con una MDI de 40 pv/célula. Después de 3 a 4 días de producción de virus el cultivo de células infectadas se trató con Benzonasa y Triton (método B/T) como se describe en el ejemplo 1. El producto B/T (título: aproximadamente 2E11 pv/ml) se clarificó mediante filtración de profundidad seguida por filtración de membrana. El producto clarificado se usó como alimento para varios experimentos de FFT usando una fibra hueca de 0,05 µm.

25 Los experimentos de FFT se realizaron para reducir el ensuciamiento durante el paso de FFT. El ensuciamiento reducido mejorará la pureza del retenido final, mejorará la recuperación de partículas virales y aumentará el flujo.

Los parámetros probados son: la cantidad relativa de alimento (l/m² de área de filtro), la presión transmembrana (PTM) y la presión en el lado del permeado.

30 En todos los experimentos el alimento se concentró 5 veces, y posteriormente se diafiltró (usando FFT) contra 10 volúmenes de diafiltración de un tampón basado en TRIS (pH 7,5-8,0) que contenía cantidades variables de NaCl (entre 0,1-1,0 M). En algunos experimentos se añadieron PS80 al 0,05% y MgCl₂ 2 mM al tampón de diafiltración.

35 La recuperación de partículas virales Ad35 se midió mediante HPLC-AEX, la pureza se determinó bien mediante RP-HPLC, o mediante el perfil cromatográfico que se generó cuando el retenido final se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (intercambio iónico o separación de grupo). En la figura 4 se muestra un ejemplo de los perfiles de RP-HPLC de retenidos con alta o baja pureza. Se categorizó una muestra como de alta pureza cuando el pico que se daba a aproximadamente 60 minutos en el perfil de RP-HPLC era <0,01 UA, una muestra se categorizó como de baja pureza cuando el 'pico de 60 minutos' era >0,1 UA. Si no había datos de RP-HPLC disponibles, la pureza del retenido se evaluó mediante cromatografía de intercambio aniónico. El 'pico de 60 minutos de RP-HPLC' no se une a resinas de intercambio aniónico o filtros cargados y aparecerá en la fracción de material no retenido. Cuando el área del pico de material no retenido fue menor que el área del pico de elución, la muestra se categorizó como de alta pureza, de otra manera la muestra se categorizó como de baja pureza (Fig. 5).

45 Los retenidos resultantes de los experimentos se categorizaron como de alta o baja pureza y se representaron frente a la PTM, cantidad de alimento aplicado por m² de área de filtro y presión de permeado aplicada. El análisis estadístico muestra un efecto significativo tanto de la PTM como de la cantidad de alimento/ m² de área de filtro sobre la pureza (Fig. 6). La figura 7 muestra que aplicar presión de permeado tiene un efecto positivo y significativo sobre la recuperación: sin aplicar presión inversa de permeado la recuperación media fue del 46% (n=7), con aplicación de presión inversa la recuperación media fue del 81% (n=4). La recuperación mejorada puede ser un efecto de la presión de permeado por si misma o puede ser debida a la disminución de la TMP aplicando una presión de permeado: $PTM = \{(P_{in} + P_{out})/2\} - P_{perm}$.

55 *Ejemplo 3: Comparación entre carreras con y sin aplicación de presión inversa durante UF/DF.*

Se hicieron crecer células PER.C6 en un tanque en agitación hasta una densidad celular de 2,4 millones de células/ml. Las células se infectaron con el vector Ad35.CS con una MDI de 40 pv/célula. Después de 3 días de producción de virus el cultivo de células infectadas se trató con Benzonase (50 U/ml, 10 minutos 37°C), después de lo cual las células se lisaron mediante adición de Triton X-100 al 1%. El producto B/T se clarificó mediante filtración de profundidad seguida por filtración de membrana. El título del producto de esta carrera fue de 2E11 pv/ml, tanto en producto crudo como en B/T tras la clarificación. El producto clarificado se usó como alimento para los dos experimentos de FFT. Ambos experimentos se realizaron usando fibra hueca con un tamaño de poro de 0,05 µm (longitud de la fibra 20 cm, área 0,105 m²). En ambos experimentos se procesó un alimento de 6,7 L/m² con una

tasa de cizalla de 2000 s^{-1} . En el experimento A la salida del permeado estaba completamente abierta (P_{in} aproximadamente 25-35 kPa, P_{out} aproximadamente 12-20 kPa, P_{perm} 0 kPa), produciendo una presión transmembrana de 24 kPa (y ninguna presión inversa en el lado del permeado ($P_{perm}=0$)); en el experimento B la salida del permeado estaba parcialmente cerrada mediante una bomba de permeado, generando de esta manera una presión en el lado del permeado (P_{in} aproximadamente 45-48 kPa, P_{out} aproximadamente 10 kPa, P_{perm} aproximadamente 10 kPa), la presión transmembrana fue de aproximadamente 17 kPa.

En ambos experimentos el alimento se concentró 5 veces y posteriormente se diafiltró contra 10 volúmenes de un tampón basado en TRIS. Se da una representación esquemática de la TFF en la figura 8. La figura 9 muestra un flujo inicial alto (28 l/h/m^2) en el experimento A flujo que disminuye (15 l/h/m^2) durante la concentración, el flujo en el experimento B es menor ($10,5 \text{ l/h/m}^2$) pero constante durante la concentración y diafiltración.

Se determinaron la pureza y recuperación de los retenidos A y B. El ADN de células huésped en ambos retenidos estaba muy por debajo de la especificación de 10 ng/dosis, esto es 1,0 ng de ADN ch/1E11 pv (véase la tabla 3). El análisis por SDS-PAGE no mostró diferencias entre los retenidos A y B (Fig. 10), en ambos retenidos las bandas principales se identificaron como proteínas del virus Ad35. Sin embargo el HPLC de fase reversa muestra un pico mayoritario a aproximadamente 60 minutos (altura 0,4 UA) en el retenido A, mientras que este pico se reduce al menos 10 veces (altura 0,03 UA) en el retenido B (Fig. 11). Se mostró que este pico contenía Triton X-100. La recuperación aumentó desde el 75% hasta el 90% cuando se aplicó la presión inversa en el lado del permeado (algunas veces también llamada 'presión de permeado' en el presente documento) (véase la tabla 4).

Estos datos indican que usar el proceso aplicando presión inversa en el lado del permeado produce una mayor pureza y recuperación.

Los datos adicionales creados con el proceso de UF/DF realizado con presión inversa en el lado del permeado se muestran en el tabla 2.

El proceso de la invención, aplicando presión inversa en el lado del permeado, también se ha usado con resultados similares para un vector de adenovirus recombinante del grupo C, verbigracia un vector basado en Ad5 (véase el ejemplo 5). Por lo tanto, el proceso de la invención es adecuado para vectores de adenovirus recombinantes de diferentes serotipos.

Ejemplo 4: Proceso según la invención a escala de 20 litros.

Se hicieron crecer células PER.C6 en 2 biorreactores de escala de 10 L hasta una densidad celular de 2,3 millones de células /ml. Las células se infectaron con vector Ad35.CS con una MDI de 40 pv/célula. Después de 3 días de producción de virus el cultivo de células infectadas se trató con Benzonase (50 U/ml, 10 minutos 37°C), después de lo cual las células se lisaron mediante adición de Triton X-100 al 1%. El producto B/T se clarificó mediante filtración de profundidad seguida mediante filtración de membrana. El producto B/T clarificado (21 L) se aplicó como alimentación a una fibra hueca de $3,3 \text{ m}^2$ (longitud de la fibra 40 cm, tamaño de poro $0,05 \mu\text{m}$). La bomba del retenido se inició con un permeado cerrado. Después de 5 minutos de recirculación la bomba del permeado se inició lentamente hasta que se alcanzó el ajuste de presión deseado. Durante todo el paso de FFT se midieron los siguientes ajustes de presión: P_{in} 6 psi, P_{out} 4-5 psi y P_{perm} 2-3 psi, dando una PTM media de 2,6 psi. Inicialmente la alimentación se concentró 5 veces, seguido por diafiltración con 10 VDF de un tampón que contenía NaCl 0,25 M, Tris 50 mM, MgCl_2 2 mM, Tween 80 al 0,05%, pH 8,0. El virus diafiltrado resultante se filtró por $0,45 \mu\text{m}$ y se purificó adicionalmente al día siguiente con un filtro de intercambio aniónico Mustang Q (la muestra resultante se denomina virus capturado) y un paso de separación de grupo (purificación en columna de Sepharosa 4FF). Por último se realizó una filtración por $0,45 \mu\text{m}$ seguida por una esterilización por filtración produciendo el producto preformulado.

Se realizó el análisis por SD-PAGE y RP-HPLC para seguir la pureza después de cada paso del proceso. El SDS-PAGE (Fig. 12) claramente muestra la eliminación de una cantidad mayoritaria de proteínas de las células huésped en el permeado (carril 2). No se obtuvo pureza adicional mediante purificación adicional del virus diafiltrado (carril 3) mediante separación con Mustang Q (carril 4) y de grupo (carril 5). El análisis de RP-HPLC muestra un resultado similar (Fig. 13). El virus diafiltrado (3) está muy purificado con una pequeña impureza residual detectada a un tiempo de retención de 60 minutos. Esta impureza lo más probable es que sea Triton X-100 restante. Basado en la altura del pico se estima que la cantidad de Triton X-100 es al menos 100 veces menor que en el producto B/T original produciendo una concentración restante de menos del 0,01%. Si se desea, se pueden usar rondas de diafiltración adicionales contra el mismo tampón para disminuir más la cantidad de Triton X-100 residual.

Aparte de la eliminación del Triton residual, no se produce purificación adicional mediante el paso de separación en Mustang Q (4) o de grupo (5), basado en análisis por RP-HPLC. La cantidad de ADN residual de células huésped en el virus diafiltrado fue de 1,4 ng/1E11 pv.

Este ejemplo muestra que un proceso según la invención, aplicando presión inversa en el lado del permeado durante la FFT, basta para obtener preparaciones adenovirales suficientemente puras sin necesidad de pasos de cromatografía. Tal proceso según la invención se muestra esquemáticamente en la figura 14.

5 *Ejemplo 5: Ad5 con presión inversa, efecto de diafiltración con alta sal.*

Se hicieron crecer células PER.C6 en un biorreactor de 10 L (carrera A) o 2 L (carrera B) hasta una densidad celular de 1 millón de células/ml. Las células se infectaron con el vector Ad5.EBO.GP(S/G).mt (carrera A) o Ad5.EBO.GP(Z).mt (carrera B) con una MDI de 60 pv/célula. Después de 4 días de producción de virus los cultivos de células infectadas se trataron con Benzonase (50 U/ml, 10 minutos 37°C), después de lo cual las células se lisaron mediante adición de Triton X-100 al 1%. Los productos B/T se clarificaron mediante filtración de profundidad seguida mediante filtración de membrana. Los títulos de los virus en los productos clarificados (determinados mediante HPLC-AEX) fueron de 3,8E10 pv/ml para la carrera A y de 1,7E10 pv/ml para la carrera B. Los productos clarificados se usaron como alimentación para experimentos de FFT. Como módulo de fibra hueca se usó un módulo de tamaño de poro de 0,05 µm (obtenido de Spectrum). Los experimentos de FFT se realizaron aplicando una presión en el lado del permeado como se describe en los ejemplos 2 y 3. Ambos productos clarificados se dividieron en dos partes. Inicialmente todas las partes se concentraron 5 veces. Una parte (A1 y B1) se diafiltró contra 6 volúmenes de un tampón con alta sal que contenía NaCl 1 M, seguido por 4 VDF con tampón de baja sal (0,4 M carrera A, 0,3 M carrera B); la segunda parte (A2 y B2) se diafiltró con 10 VDF de un tampón con baja sal (0,4 M carrera A, 0,3 M carrera B). En todos los experimentos la PTM media fue o estuvo por debajo de 1 psi. Las muestras de virus diafiltrados resultantes se analizaron para determinar la cantidad de ADN residual de células huésped y la pureza mediante RP-HPLC, los datos se muestran en la tabla 5.

La pureza basada en RP-HPLC es muy alta (Fig. 15), y comparable a los resultados de Ad35 generados con el 'protocolo de presión inversa' como se muestra en la tabla 2. A partir de datos previos se sabe que sin aplicar presión inversa este grado de pureza no se había obtenido. La cantidad residual de ADNch obtenido después de la diafiltración con un tampón con baja sal es mayor que los datos de Ad35 mostrados en la tabla 2. Esto está lo más probablemente relacionado con el menor título de virus en el producto (24E10 pv/ml para Ad5 frente a 2E11 pv/ml para Ad35). Sin embargo, si se usa diafiltración con alta sal la cantidad de ADNch que queda está bien por debajo del límite de 10 ng/ml, asumiendo una dosis de 1E11 pv/ml. Las recuperaciones obtenidas están por encima del 80%, que es consistente con los datos de Ad35 mostrados en la tabla 2. Se muestra un análisis por SDS-PAGE de una de las muestras en la Figura 16.

35 *Ejemplo 7: Purificación de adenovirus mediante un proceso de filtración solo.*

Se hicieron crecer células PER.C6 en 2 biorreactores de escala de 10 L hasta una densidad celular de 2-3 millones de células/ml. Las células se infectaron con el vector Ad35.TB-S (un vector derivado de un adenovirus de serotipo 35 que contiene antígenos de tuberculosis (fusión directa de Ag85A, Ag85B, y TB10.4; también descrito en PCT/EP2005/055984)) con una MDI de 10 pv/célula. Después de 3 días de producción de virus el cultivo celular infectado se trató con Benzonasa (50 U/ml, 10 minutos 37°C), tras lo cual las células se lisaron mediante la adición de Triton X-100 al 1%. El producto B/T se clarificó mediante filtración de profundidad seguida por filtración de membrana.

El título del producto B/T clarificado de esta carrera fue de 2E11 pv/ml. Parte del producto clarificado se usó como alimentación para un experimento de FFT. El experimento se realizó usando una fibra hueca con un tamaño de poro de 0,05 µm (longitud de la fibra 20 cm, área 0,105 m²). Se proceso una alimentación de 6,7 L/ m² con una velocidad de cizalla de 2000 s⁻¹. La salida del permeado se cerró parcialmente mediante una bomba de permeado, generando de esta manera un presión en el lado del permeado (P_{in} aproximadamente 38 kPa, P_{out} aproximadamente 31 kPa, P_{perm} aproximadamente 17 kPa), la presión transmembrana fue aproximadamente 17 kPa. La alimentación se concentró 5 veces y posteriormente se diafiltró contra 10 volúmenes de un tampón basado en TRIS, seguido por 6 volúmenes adicionales de tampón de formulación. Se da una representación esquemática de la FFT en la figura 8B. El virus diafiltrado se filtró secuencialmente sobre 0,8-0,45 µm y un filtro de membrana de 0,22 µm.

Se determinaron la pureza y la recuperación del virus purificado. La recuperación global de virus tras la purificación fue del 69%. El ADN de células huésped estuvo bien por debajo de la especificación de 10 ng/dosis, esto es 0,8 ng de ADN de ch/1E11 pv. Las bandas principales mostradas en SDS-PAGE se identifican como proteínas del virus Ad35 (Fig. 17). Todos los picos principales mostrados en el perfil de fase reversa del retenido tras 16 VDF se identifican como proteínas de Ad35 (Fig. 18). El HPLC de fase reversa muestra la reducción de un pico a aproximadamente 60 minutos durante la diafiltración. Se mostró que este pico contenía Triton X-100. Se hizo una estimación de la cantidad de Triton X-100 residual tras diferentes volúmenes de FFT, basado en el área del pico del pico de 60 minutos, y los datos se muestran en la tabla 6. A partir de estos datos parece que, después de aproximadamente 10 volúmenes de diafiltración (VDF), los niveles residuales de Triton X-100 (estimado en el 0,0135%) están probablemente a niveles reguladores aceptables. Por ejemplo, FLUARIX™, una vacuna contra la

gripe derivada de huevo aprobada por la FDA, contiene Triton® X-100 (octoxinol-10) ≤0,085 mg por dosis de 0,5 ml (información en la etiqueta: www.fda.gov/cber/label/inflgla083105LB.pdf), que corresponde a una concentración residual de Triton X-100 de ≤ 0,017%.

- 5 Estos datos indican que los adenovirus se pueden purificar con gran recuperación a casi homogeneidad mediante técnicas de filtración sólo.

Tablas

- 10 **Tabla 1:** Reducción de la cantidad de ADN residual de células huésped en muestras a granel purificadas cambiando el método de recogida T/B a B/T. El producto se purificó en una escala de 2-20 L. Véase el ejemplo 1 para los detalles.

Carrera	Vector	Método de recogida	ADN de célula huésped ng/ml	PV/ml HPLC-AEX	ng de ADN de CH/1E11 PV
1	Ad5.MV-H	T/B	0,41	5,40E+10	0,78
2	Ad5dE3x.Adapt.Ebo.GP dTM (Z)	T/B	4,31	5,25E+11	0,82
3	Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP	B/T	0,46	7,80E+11	0,06
4	Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP	B/T	0,44	6,80E+11	0,07
5	Ad5dE3x.Adapt.vacío	B/T	0,40	8,90E+11	0,04
6	Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP	B/T	0,25	4,66E+11	0,05
7	Ad5dE3x.Adapt.Ebo.GP dTM (S)	B/T	0,55	6,60E+11	0,08
8	Ad5dE3x.Adapt.Ebo.GP dTM (Z)	B/T	0,15	6,60E+11	0,02
9	Ad353.CS	B/T	0,62	5,15E+11	0,12

Tabla 2: Se realizaron seis experimentos con presión inversa aplicada en el lado del permeado.

Exp #	Altura del 'pico de 60 min' de RP-HPLC	ADN de ch (ng/1E11 pv)	Recuperación
11D	0,001	0,4	87%
16/17C	0,002	0,7	89%
16/17D	0,002	0,05	88%
18A	0,008	1,1	84%
18B	0,008	1,0	82%
TT carrera#1	0,004	1,4	85%

- 15 Se muestran los resultados de la cantidad residual de Triton X-100 indicados por la altura del pico a un tiempo de retención de 60 minutos (análisis por RP-HPLC), la cantidad residual de ADN de células huésped (medida por Q-PCR) y la recuperación del virus (tras clarificación y UF/DF). Véase el ejemplo 3 para los detalles.

- 20 **Tabla 3:** ADN de células huésped en las preparaciones A y B. Véase el ejemplo 3 para los detalles.

	pv/ml	ADN de células huésped (ng/ml)	ADN de células huésped (ng/1E11 pv)
Experimento A	5,2E11	5,2	1,0
Experimento B	6,45E11	6,4	1,0

Tabla 4: Datos de los experimentos A y B. Véase el ejemplo 3 para los detalles.

	Cizalla (s ⁻¹)	Presión inversa	Flujo (LHM)	Recuperación	Título (pv/ml)
Exp A	2000	No	19	75%	5,5E11
Exp A	2000	Si	10	90%	6,5E11

5 **Tabla 5:** Se realizaron cuatro experimentos de FFT con presión inversa aplicada en el lado del permeado. Se usaron dos lotes de producto clarificado (A y B) y se diafiltraron con tampón con alta sal seguido por un tampón con baja sal (A1 y B1) o sólo con baja sal (A2 y B2). Se muestran los resultados de la cantidad residual de Triton X-100 indicada por la altura del pico a un tiempo de retención de 60 minutos (análisis por RP-HPLC), la cantidad residual de ADN de células huésped (medida mediante Q-PCR) y la recuperación del virus (después de la clarificación y UF/DF).

Exp#	Conc de sal en el tampón de DF	Altura del 'pico de 60 min' de RP-HPLC	ADNch ng/1E11 pv	recuperación
A1	6x1 M, 4x0,4 M	0,015	1,8	90%
A2	10x0,4 M	0,009	12	92%
B1	6x1 M, 4x0,3 M	0,002	≤1,5	81%
B2	10x0,3 M	0,013	≤28,2	86%

Tabla 6: % estimado de Triton X-100 residual. Véase el ejemplo 7 para los detalles.

Retenido después de 6 VDF	0,0674
Retenido después de 10 VDF	0,0135
Retenido después de 14 VDF	0,0043
Retenido después de 16 VDF	0,0007

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la purificación de un adenovirus recombinante que comprende un paso de ultrafiltración en donde el retenido contiene el virus, **caracterizado en que** se aplica presión inversa de al menos 5 kPa en el lado del permeado.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en donde el método comprende antes de dicho paso de ultrafiltración los pasos de:
- 15 a) cultivar células que se infectan con dicho virus,
 b) añadir nucleasa al cultivo celular, y después de ello
 c) opcionalmente lisar dichas células para proporcionar un lisado que comprende el virus, y
 d) opcionalmente clarificación del lisado, preferiblemente mediante filtración de profundidad seguida por filtración de membrana.
- 20 3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha ultrafiltración comprende filtración de flujo tangencial, preferiblemente usando un módulo de fibra hueca.
- 25 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la presión inversa de al menos 5 kPa se aplica mediante una bomba que proporciona presión inversa al permeado.
- 30 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la presión transmembrana se mantiene por debajo de 20 kPa.
- 35 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha ultrafiltración comprende el intercambio de tampón del retenido con un tampón que comprende cloruro de sodio entre 0,8 M y 2 M u otra sal que da una fuerza iónica igual, y preferiblemente intercambio posterior de tampón con un tampón que tiene una fuerza iónica de un tampón que comprende NaCl menos de 0,5 M.
- 40 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dicho método no comprende un paso de cromatografía de exclusión molecular.
- 45 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dicho método no comprende un paso de cromatografía de intercambio aniónico o filtración de intercambio aniónico.
- 50 9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dicho método está **caracterizado en que** no comprende un paso de cromatografía o un paso de filtración de intercambio iónico.
- 55 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dicho método comprende además un paso de purificar adicionalmente el adenovirus recombinante con al menos un paso de cromatografía.
- 60 11. Un método según la reivindicación 10, en donde el método comprende un paso de cromatografía de intercambio aniónico, opcionalmente realizado aplicando la solución que contiene el virus a un filtro cargado que contiene grupos cargados positivamente.
12. Un método según la reivindicación 10 u 11, en donde el método comprende un paso de cromatografía de exclusión molecular.
13. Un método para la purificación de un adenovirus recombinante, dicho método consiste esencialmente en:
- a) cultivar células que se infectan con dicho adenovirus recombinante,
 b) lisar dichas células y eliminar y/o fragmentar el ácido nucleico libre, para proporcionar un lisado que comprende el adenovirus recombinante,
 c) clarificar el lisado para obtener una preparación de adenovirus,
 d) someter la preparación de adenovirus a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, para concentrar la preparación de adenovirus,
 e) someter la preparación de adenovirus del paso d) a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, e intercambiar con ella al menos 5 volúmenes de diafiltración (VDF) de tampón, en donde un VDF es el volumen del retenido tras la concentración en el paso d),
 f) preferiblemente esterilizar por filtración la preparación de adenovirus,
- el método está **caracterizado en que** en los pasos d) y e) se aplica presión inversa de al menos 5 kPa en el lado del permeado.

14. Un método para la purificación de un adenovirus recombinante, dicho método consiste esencialmente en:
- a) cultivar células que se infectan con dicho adenovirus recombinante,
 - 5 b) lisar dichas células y eliminar y/o fragmentar el ácido nucleico libre, para proporcionar un lisado que comprende el adenovirus recombinante,
 - c) clarificar el lisado para obtener una preparación de adenovirus,
 - 10 d) someter la preparación de adenovirus del paso c) a ultrafiltración, en donde la preparación de adenovirus está en el retenido, e intercambiar con ella al menos 5 volúmenes de diafiltración (VDF) de tampón, en donde un VDF es el volumen de la preparación de virus tras c),
 - e) preferiblemente esterilizar por filtración la preparación de adenovirus,
- dicho método está **caracterizado en que** en el paso d) se aplica presión inversa de al menos 5 kPa en el lado del permeado.
- 15
15. Un método según la reivindicación 13 o 14, en donde el paso b) comprende:
- b, i) añadir nucleasa al cultivo de células, y después de ello
 - 20 b, ii) lisar dichas células para proporcionar un lisado que comprende el adenovirus recombinante.
16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde dicha ultrafiltración comprende filtración de flujo tangencial, preferiblemente usando un módulo de fibra hueca.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en donde la presión inversa se aplica mediante una bomba que proporciona presión inversa al permeado.
- 25
18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en donde la presión transmembrana durante al ultrafiltración se mantiene por debajo de 20 kPa.
19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en donde dicho intercambio de tampón con el retenido comprende intercambio de tampón con tampones de diferente fuerza iónica, incluyendo intercambio de tampón con un tampón que comprende cloruro de sodio entre 0,8 M y 2 M u otra sal que da igual fuerza iónica, y preferiblemente posterior intercambio de tampón con un tampón que tiene una fuerza iónica de un tampón que comprende NaCl menos de 0,5 M.
- 30
20. Un método para aumentar la recuperación y/o el rendimiento de adenovirus recombinante durante un paso de ultrafiltración en donde el retenido contiene el adenovirus recombinante, dicho método está caracterizado en que se aplica presión inversa de al menos 5 kPa en el lado del permeado.
- 35

Fig. 1

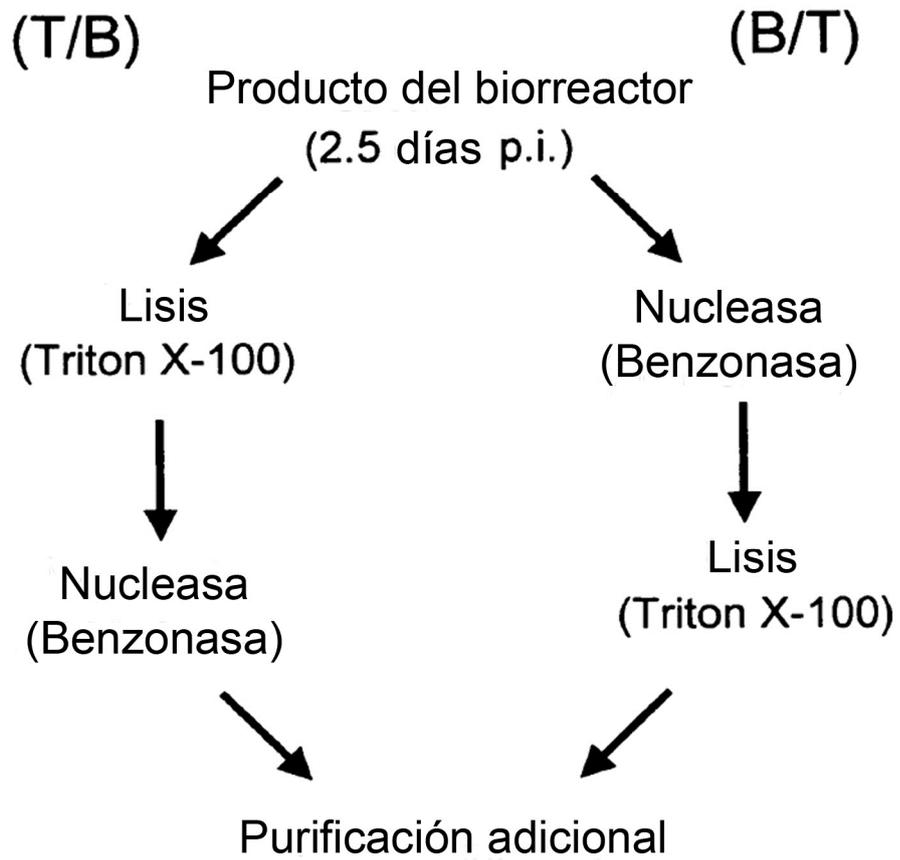


Fig. 2

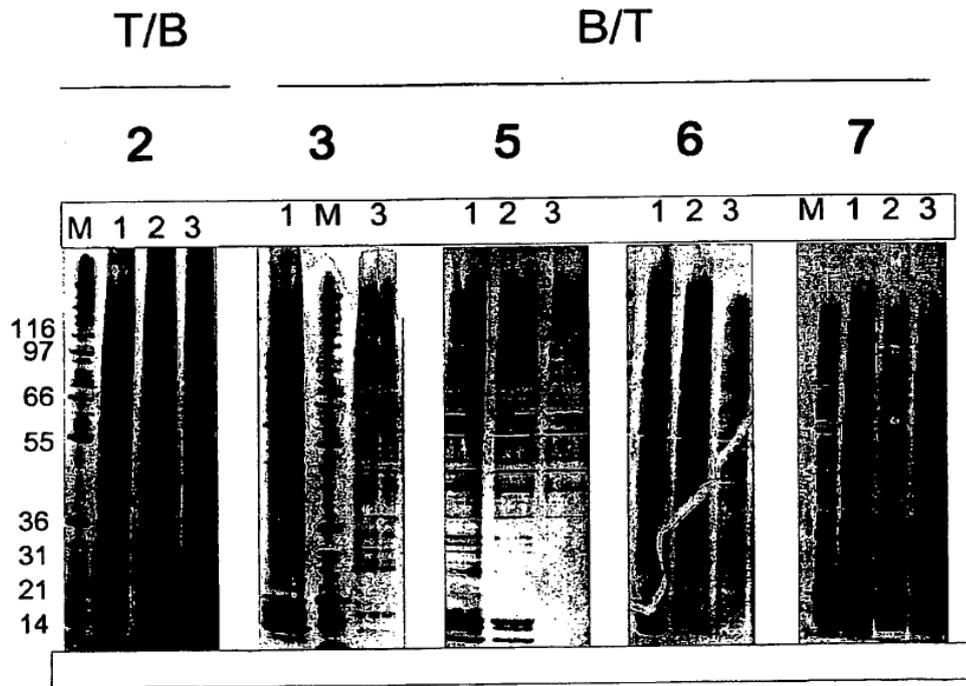


Fig. 3

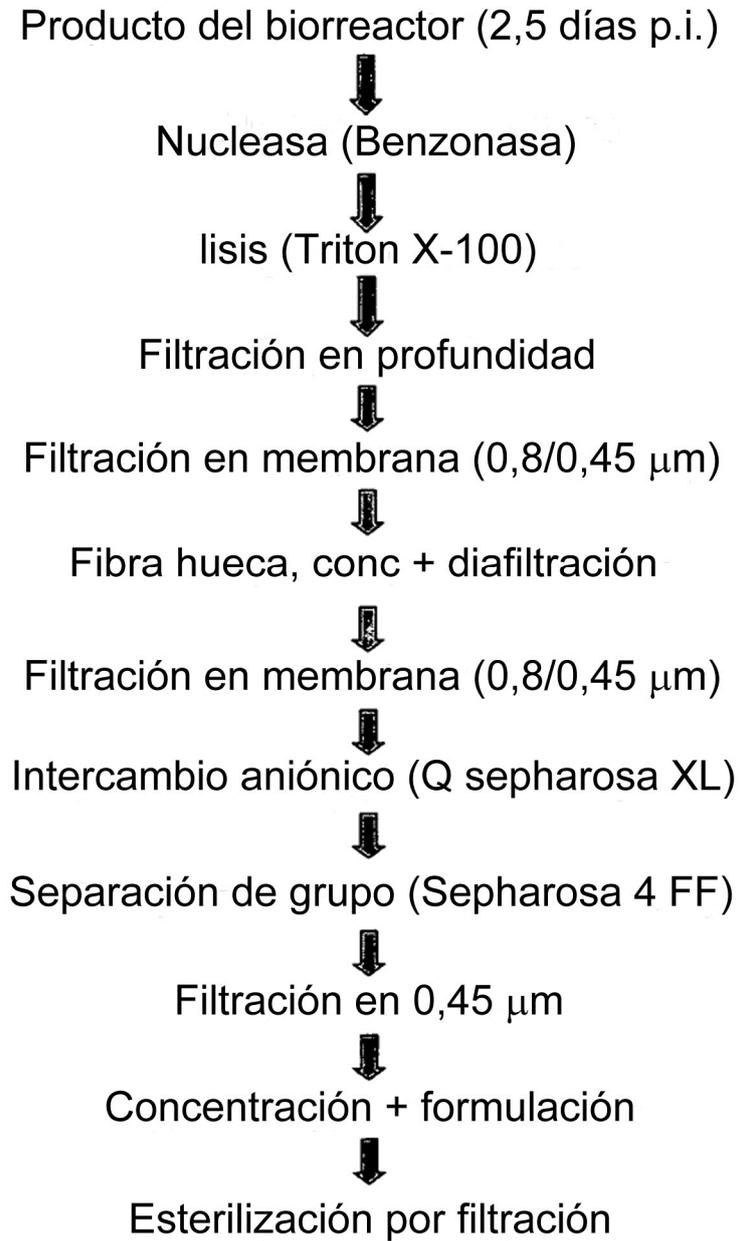


Fig. 4

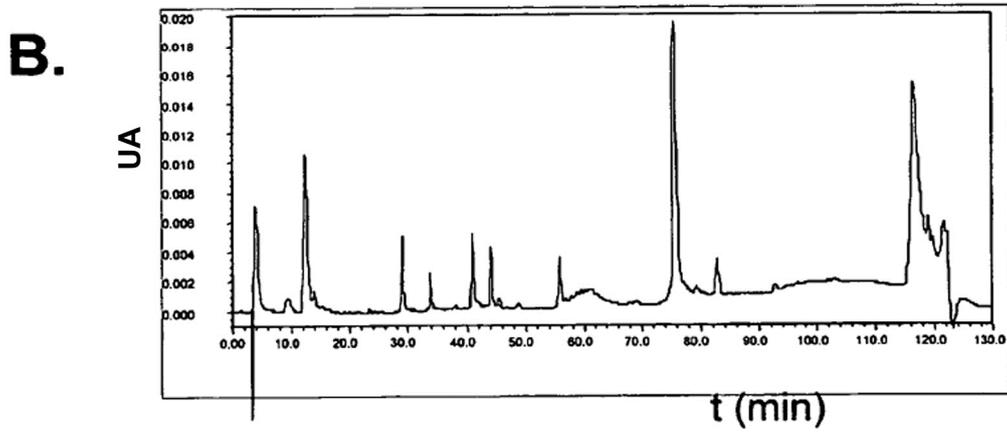
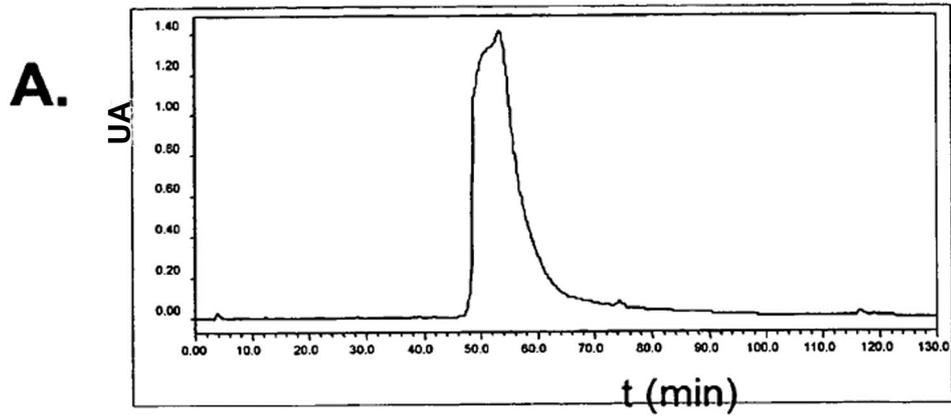


Fig. 5

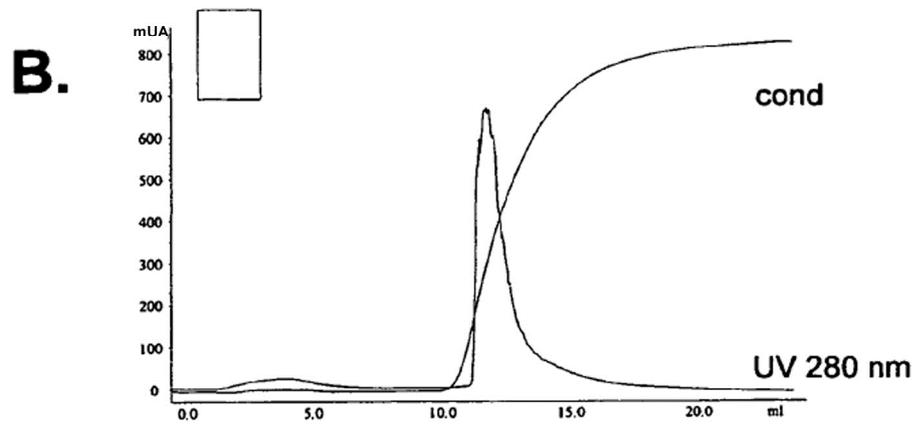
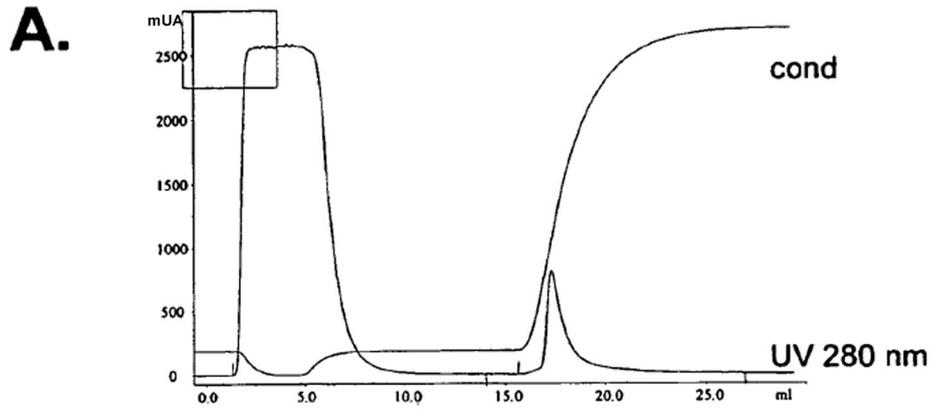


Fig. 7

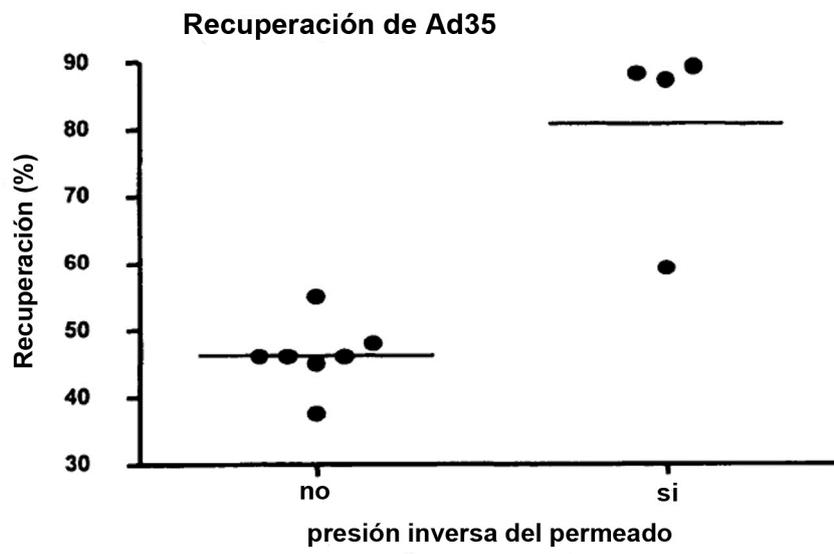


Fig. 8

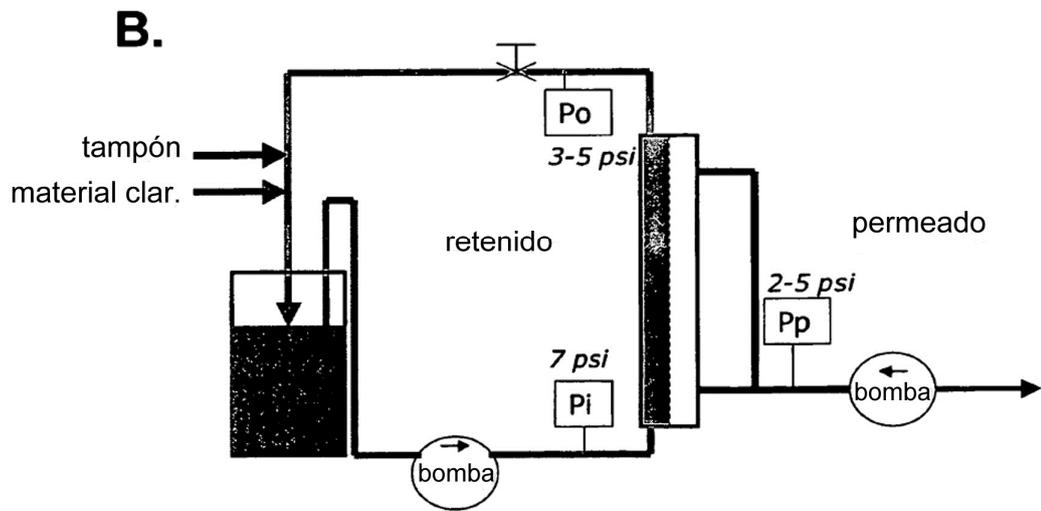
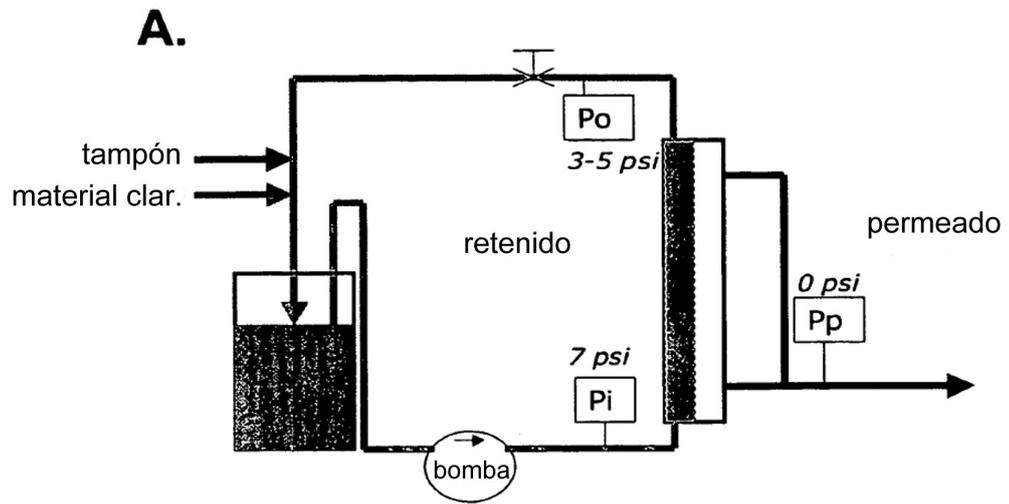
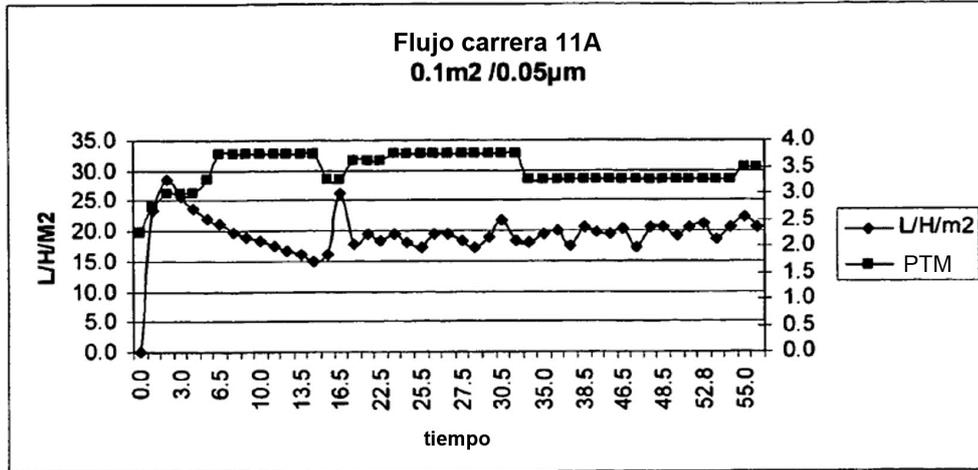


Fig. 9

A.



B.

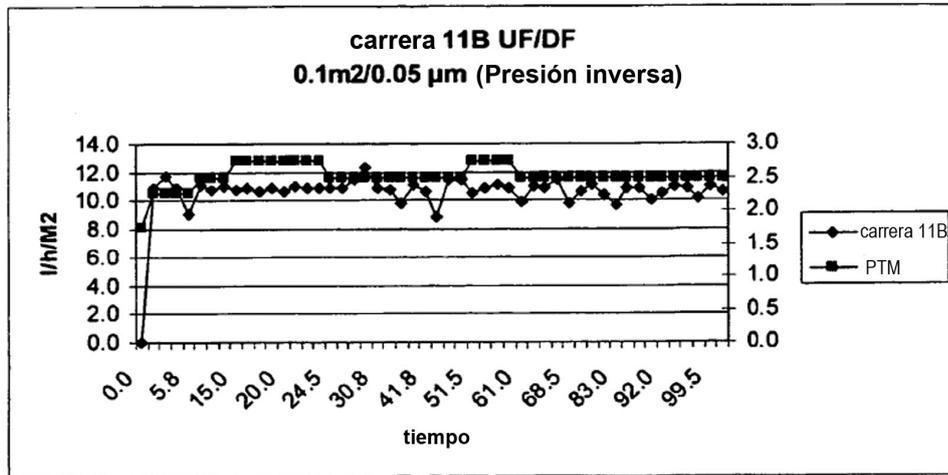


Fig. 10

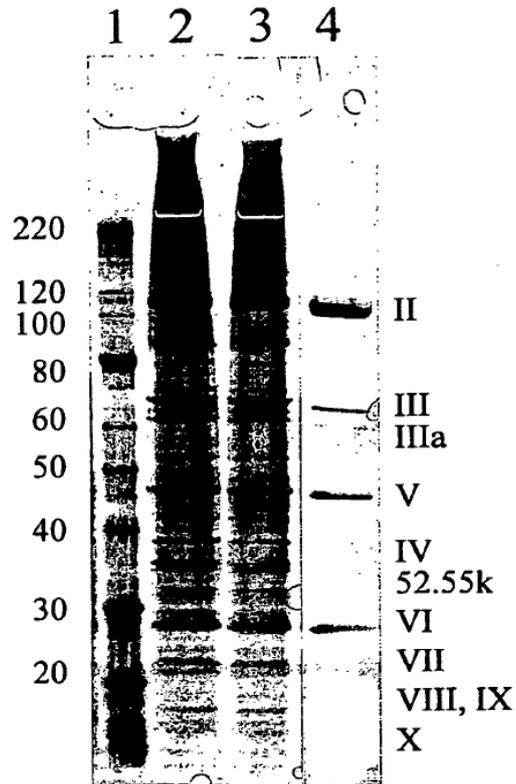


Fig. 11

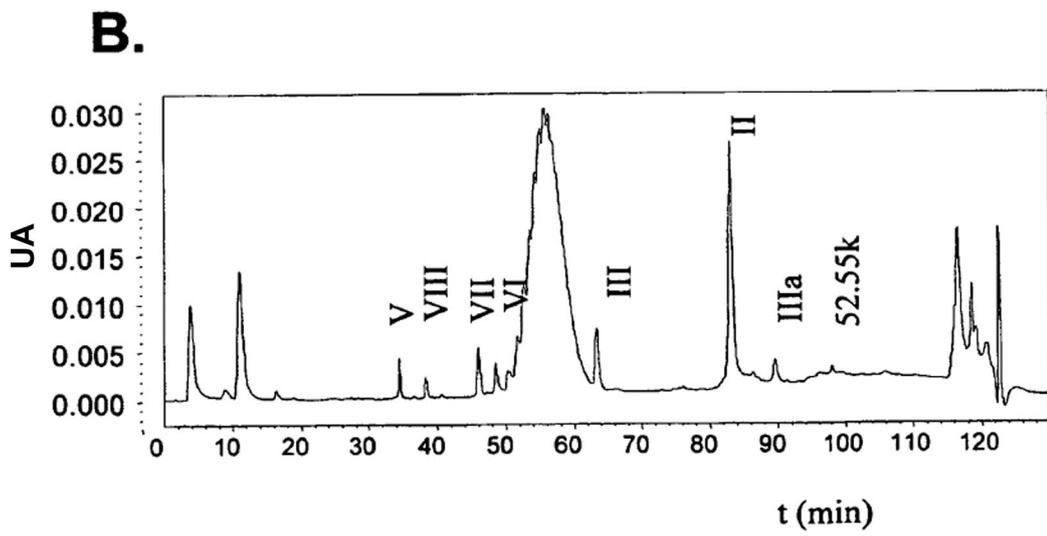
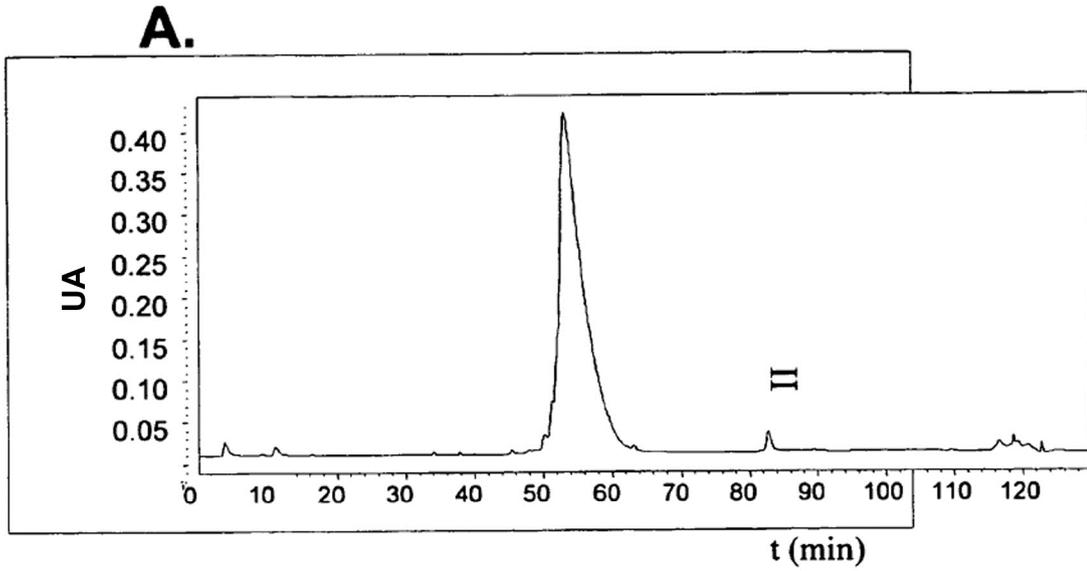


Fig. 12

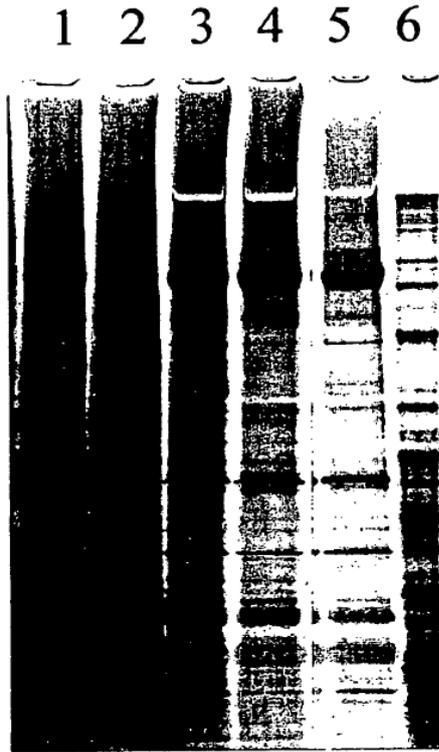


Fig. 13

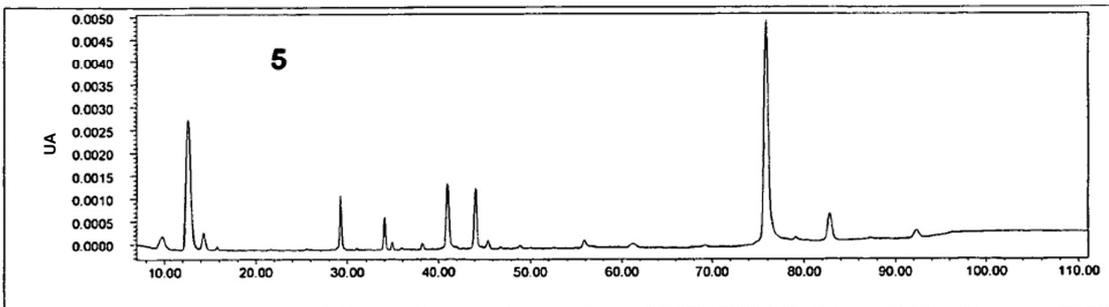
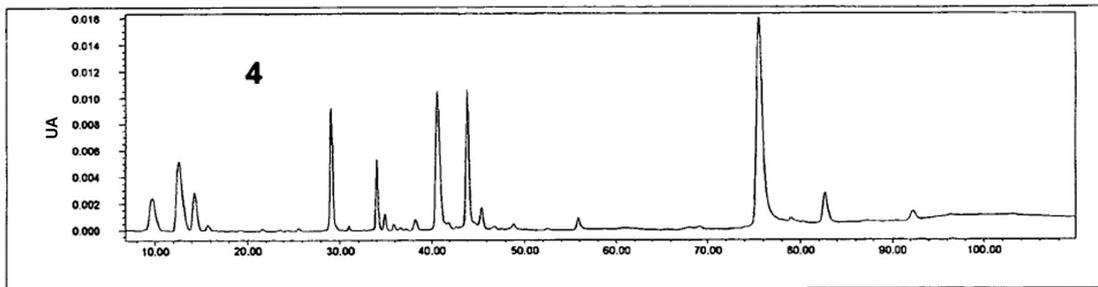
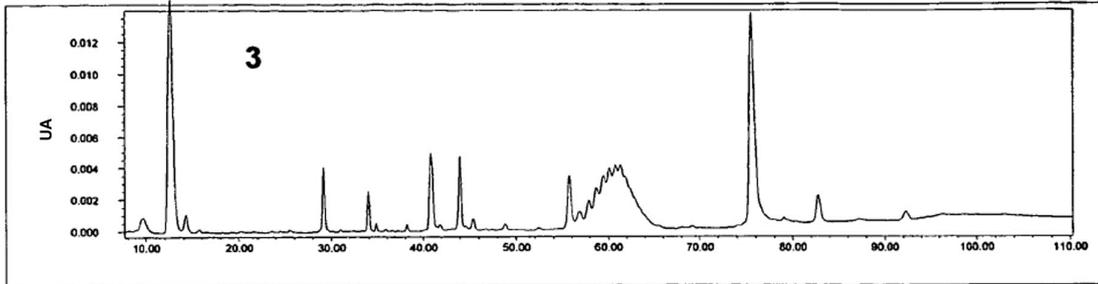
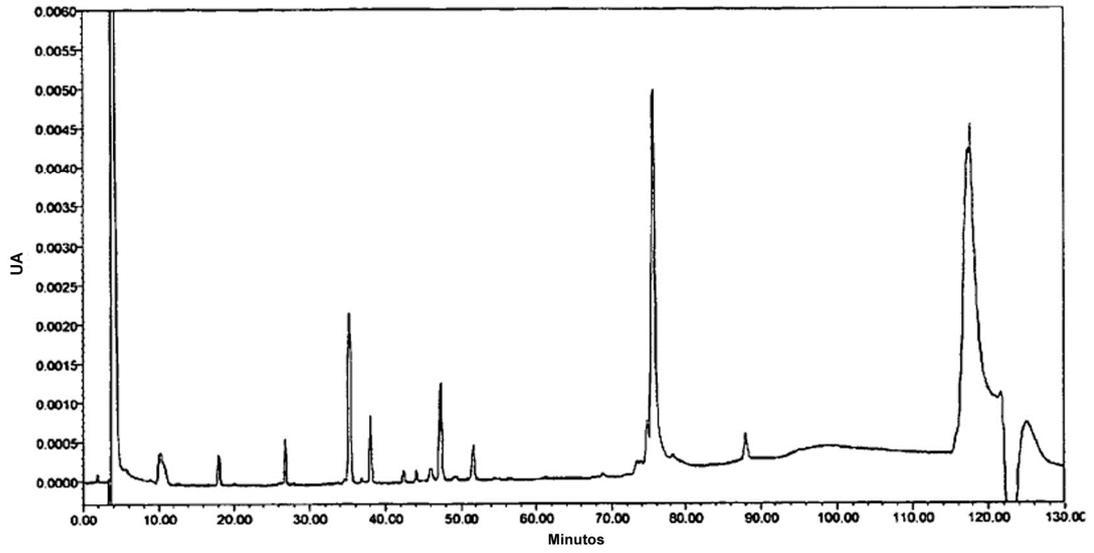


Fig. 14



Fig. 15

A.



B.

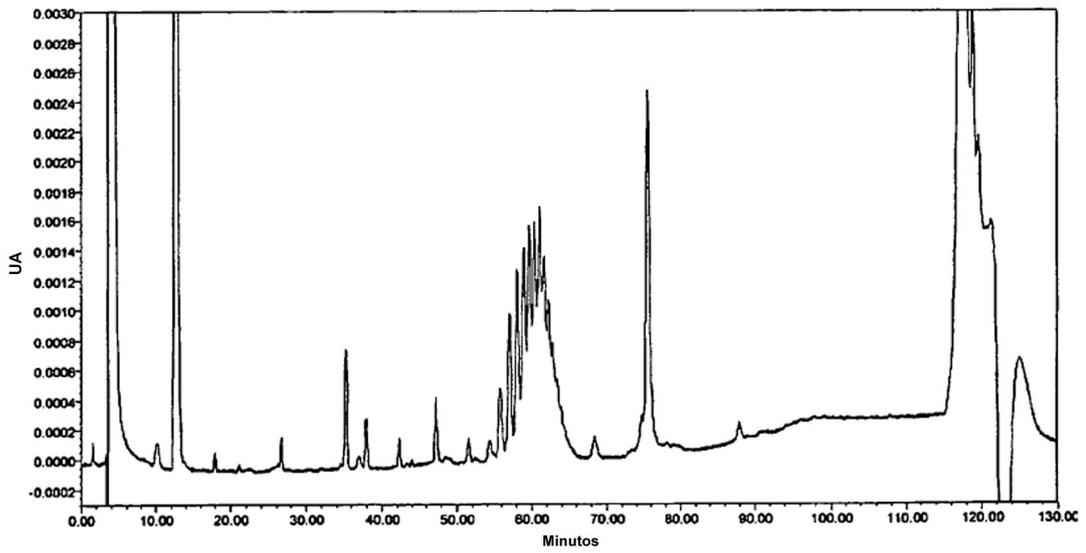


Fig. 16

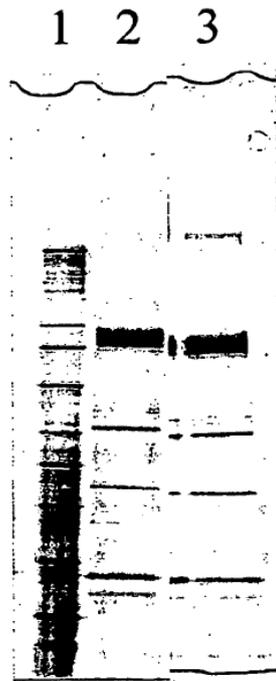


Fig. 17

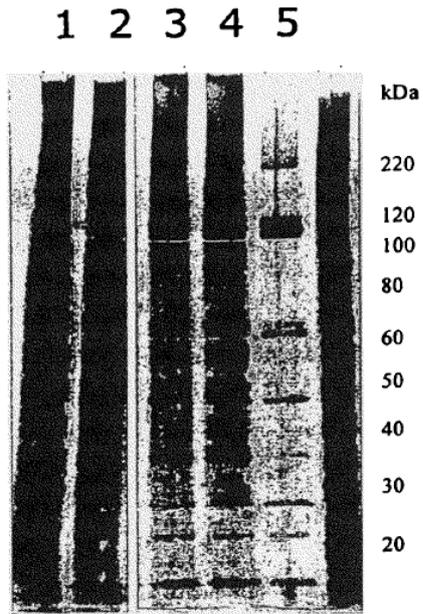


Fig. 18

