



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 454**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03724692 .3**

96 Fecha de presentación : **28.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1501921**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Métodos de purificación viral mejorados.**

30 Prioridad: **30.04.2002 US 377273 P**
29.01.2003 US 443176 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2009

73 Titular/es: **Oncolytics Biotech Inc.**
Suite 210, 1167 Kensington Crescent N. W
Calgary, Alberta T2N 1X7, CA

72 Inventor/es: **Coffey, Matthew, C.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 323 454 T3

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

ES 2 323 454 T3

DESCRIPCIÓN

Métodos de purificación viral mejorados.

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de EEUU n° de serie 60/377.273, presentada el 30 de abril, 2002; y n° de serie 60/443.176, presentada el 29 de enero, 2003.

Este invención se refiere a un método para extraer virus a partir de un cultivo celular. En particular, el método resulta útil para extraer virus infecciosos que es adecuado para la administración clínica a mamíferos, incluyendo el ser humano.

Referencias bibliográficas

Solicitud de patente de EEUU n° de publicación 20020037576, publicada el 28 de marzo, 2002.

15 Documento WO99/08692A1, publicado el 25 de febrero, 1999.

Patente japonesa 63044532A, publicada el 25 de febrero, 1988.

20 **Berry et al.**, *Biotechnology and Bioengineering*, "Production of Reovirus Type-1 and Type-3 from Vero Cells Grown on Solid and Macroporous Microcarriers", *Biotechnology and Bioengineering*, **62**:12-19 (1999).

Bos, J.L., "Ras Oncogene in Human Cancer: A Review", *Canc. Res.*, **49(17)**:4682-4689 (1989).

25 **Chandron y Nibert**, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subvirion particle", *J. of Virology*, **72(1)**:467-475 (1998).

Coffey, M.C. et al., "Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway", *Science*, **282**:1332-1334 (1998).

30 **Davis et al.**, *Microbiology*, Lippincott, Filadelfia (1990).

Drastini, Y. et al., "Comparison of eight different procedures for harvesting avian reoviruses grown in Vero cells", *J. Virological Methods*, **39**:269-278 (1992).

35 **Duncan et al.**, "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein", *Virology*, **182(2)**:810-819 (1991).

Fields, B.N. et al., *Fundamental Virology*, 3ª edición, Lippincott-Raven (1996).

40 **Mah et al.**, "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function", *Virology*, **179(1)**:95-103 (1990).

McRae, M.A. y Joklik, W.K., "The nature of the polypeptide encoded by each of the 10 double-stranded RNA segments of reovirus type 3", *Virology*, **89**:578-593 (1979).

45 **Nibert et al.**, "Reovirus and their replication", en *Fields et al.*, *Fundamental Virology*, 3ª edición, Lippincott-Raven (1996).

Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 19ª edición (1995).

50 **Smith, R.E. et al.**, "Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3", *Virology*, **39**:791-800 (1969).

55 **Strong, J.E. y P.W. Lee.**, "The v-erbV oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection", *J. Virol.*, **70**:612-616 (1996).

Strong, J.E. et al., "Evidence that the Epidermal Growth Factor Receptor on Host Cells Confers Reovirus Infection Efficiency", *Virology*, **197(1)**:405-411 (1993).

60 **Strong, J.E. et al.**, "The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus", *EMBO J.*, **17**:3351-3362 (1998).

Taber et al., "The selection of virus-resistant Chinese hamster ovary cells", *Cell*, **8**:529-533 (1976).

65 **Turner y Duncan**, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain", *Virology*, **186(1)**:219-227 (1992).

Debido a la vasta cantidad de enfermedades provocadas por virus, la virología es un campo que se ha estudiado a fondo. Siempre ha existido la demanda de producir virus con eficacia para aislar y purificar proteínas víricas, para generar vacunas o para proporcionar virus infecciosos para estudios de laboratorio. En fechas recientes, los nuevos desarrollos en terapia vírica han aumentado aún más la necesidad de una producción eficaz de virus infecciosos.

La terapia de reovirus es un ejemplo de terapia vírica. El reovirus es un virus de ARN bicatenario capaz de unirse a una multitud de células. Sin embargo, la mayoría de las células no son susceptibles a una infección por reovirus, y la unión del reovirus a su receptor celular no produce replicación vírica ni producción de partículas víricas en estas células. Probablemente ésta sea la razón de por qué no se conoce que el reovirus esté asociado a ninguna enfermedad concreta.

En fechas recientes se ha descubierto que las células transformadas con el oncogén ras se convierten en susceptibles a la infección por reovirus, mientras que sus homólogas no transformadas no son susceptibles (Strong *et al.*, 1998). Por ejemplo, cuando células NIH 3T3 resistentes a reovirus se transforman con Ras activado o con Sos, una proteína que activa a Ras, se potenció la infección por reovirus. De forma similar, fibroblastos de ratón que son resistentes a una infección por reovirus se hacen susceptibles después de su transfección con el gen receptor del EGF o el oncogén v-erbB, que activan ambos la vía de ras (Strong *et al.*, 1993; Strong *et al.*, 1996). Por tanto, el reovirus puede infectar y replicarse selectivamente en células con una vía de Ras activada.

El oncogén ras es el responsable de un gran porcentaje de tumores de mamífero. Se producen mutaciones activadoras del propio gen ras en aproximadamente 30% de todos los tumores humanos (Bos, 1989), principalmente en carcinomas pancreáticos (90%), colorrectales esporádicos (50%) y pulmonares (40%), así como en la leucemia mieloide (30%). La activación de factores cadena arriba o cadena abajo del ras en la vía de ras también está asociada a los tumores. Por ejemplo, la sobreexpresión de HER2/Neu/ErbB2 o del receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGF) es común en el cáncer de mama (25-30%), y la sobreexpresión del receptor del factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o del receptor de EGF predomina en gliomas y glioblastomas (40-50%). Se sabe que el receptor de EGF y el receptor de PDGF activan ambos a ras tras su unión a sus respectivos ligandos, y que v-erbB codifica un receptor constitutivamente activado que carece de dominio extracelular.

Puesto que la alteración genética del protooncogén ras o una alta actividad Ras es responsable de un gran número de tumores humanos, la terapia de reovirus es una terapia nueva y prometedora para estas afecciones (Coffey *et al.*, 1998). La terapia de reovirus es muy selectiva para células tumorales asociadas a Ras y no infecta a las células normales. Esta terapia tiene amplias aplicaciones y puede utilizarse en seres humanos y en animales no humanos.

Para producir reovirus adecuados para la administración clínica se necesitan métodos rápidos y eficaces para producir reovirus en células cultivadas. Además, el método tradicional para purificar virus a partir de células cultivadas es tedioso y largo, y hace que el coste de la producción de virus sea demasiado elevado. Por tanto, también se necesita un método mejorado para la purificación de virus.

La presente invención se refiere a un método mejorado para extraer y purificar virus a partir de cultivos celulares que puede aplicarse a la producción de virus a pequeña y a gran escala. El método implica una etapa de extracción sencilla en la que un detergente se añade directamente al cultivo celular. Después pueden retirarse los residuos celulares de la mezcla de extracción, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. La suspensión de virus resultante puede concentrarse aún más y/o enriquecerse mediante métodos cromatográficos. El virus preparado según la presente invención puede utilizarse para cualquier fin, incluyendo la purificación de proteínas víricas, la vacunación, la infección de células hospedantes y la administración clínica.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona un método para producir virus a partir de un cultivo de células, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un cultivo de células que se han infectado con el virus;
- (b) extraer el virus de las células añadiendo un detergente al cultivo e incubando durante un periodo de tiempo para producir un lisado celular;
- (c) retirar los residuos celulares;
- (d) purificar el virus mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular;
- (e) recoger el virus.

Puede utilizarse cualquier método para retirar los residuos celulares (es decir, para aclarar el lisado celular) en la etapa (c). El método es preferiblemente un método sencillo basado en las diferencias de tamaño o de densidad entre el virus y los otros constituyentes del lisado celular, tal como filtración o centrifugación. Más preferiblemente, se emplea la filtración, en particular la filtración discontinua. Una filtración discontinua apropiada comprende un prefiltro que

ES 2 323 454 T3

tiene un tamaño de poro mayor, seguido de al menos otro filtro con un tamaño de poro menor que el del prefiltro. En una realización preferida, los residuos celulares se retiran mediante una filtración discontinua, que comprende:

(1) filtrar a través de un prefiltro que tiene un tamaño de poro de $5\ \mu\text{M}$ u $8\ \mu\text{M}$, y

(2) filtrar, después de la etapa (1), a través de un filtro combinado que tiene unos tamaños de poro de $3\ \mu\text{M}$ y $0,8\ \mu\text{M}$.

El lisado celular puede tratarse opcionalmente con benzonasa u otra enzima de ruptura del ADN para romper ADN celular largo y viscoso.

Después de retirar los residuos celulares mediante filtración, el filtrado puede concentrarse opcionalmente para reducir el volumen de la suspensión vírica. Puede emplearse cualquier método adecuado para la concentración vírica, preferiblemente ultrafiltración o diafiltración, incluyendo filtración de flujo tangencial. Los ejemplos de métodos incluyen el sistema de placa y marco, y el sistema de fibras huecas. Más preferiblemente se emplea el sistema de fibras huecas.

El presente método puede aplicarse a la producción de cualquier virus, preferiblemente un virus sin envuelta, y más preferiblemente un reovirus. El reovirus es preferiblemente un reovirus de mamífero, más preferiblemente un reovirus humano, aún más preferiblemente un reovirus de serotipo 3, y lo más preferiblemente un reovirus de la cepa Dearing. El reovirus puede ser un reovirus recombinante. El reovirus recombinante puede generarse mediante coinfección de células, tales como células de mamífero o células aviarias, con diferentes subtipos de reovirus. Los reovirus recombinantes pueden ser naturales o no naturales. El reovirus recombinante puede proceder de dos o más cepas de reovirus, en particular de dos o más cepas de reovirus seleccionadas del grupo que consiste en la cepa Dearing, la cepa Abney, la cepa Jones y la cepa Lang. El reovirus recombinante también puede proceder de la reordenación de reovirus de diferentes serotipos, como los seleccionados del grupo que consiste en reovirus de serotipo 1, reovirus de serotipo 2 y reovirus de serotipo 3. El reovirus recombinante pueden comprender variantes de secuencias codificadoras de proteínas de la envuelta naturales o secuencias codificadoras de proteínas de la envuelta mutadas.

El cultivo celular utilizado en la presente invención puede comprender cualquier célula apropiada para la producción del virus deseado. Para los reovirus, las células son preferiblemente células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) o células derivadas de éstas, en particular células HEK 293 que se han adaptado para su crecimiento en cultivos en suspensión.

El método comprende una etapa de cromatografía de intercambio iónico, en la que el virus se enriquece mediante la unión a una resina de intercambio iónico bajo condiciones de unión apropiadas. El virus entonces se eluye del intercambiador iónico utilizando una disolución de elución adecuada. La elección del intercambiador iónico y de las condiciones de unión/elución variará según el virus que se está purificando. Para los reovirus, un intercambiador aniónico y un pH de aproximadamente 7,0-9,0 es lo más eficaz. El pH es preferiblemente de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5, y más preferiblemente de aproximadamente 8,0.

El virus se purifica aún más utilizando una cromatografía de exclusión molecular. De forma específica, puede emplearse una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para producir reovirus infecciosos, que comprende:

(a) proporcionar un cultivo de células HEK 293 que se han infectado con el reovirus;

(b) extraer el virus de las células añadiendo Triton X-100 al cultivo e incubando de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C ;

(c) tratar la mezcla de la etapa (b) con una enzima de ruptura del ADN;

(d) retirar los residuos celulares mediante filtración;

(e) concentrar el filtrado mediante ultrafiltración o diafiltración;

(f) purificar el reovirus mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular; y

(g) recoger el virus.

La presente invención se refiere a un método mejorado para extraer y purificar virus a partir de un cultivo celular que puede aplicarse a la producción de virus a pequeña y a gran escala. El método implica una sencilla etapa de extracción en la que un detergente se añade directamente al cultivo celular. Después se retiran los residuos celulares de la mezcla de extracción, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. La suspensión de virus resultante puede concentrarse

ES 2 323 454 T3

aún más y/o enriquecerse mediante métodos cromatográficos. El virus preparado según la presente invención puede utilizarse para cualquier fin, incluyendo la purificación de proteínas víricas, la vacunación, la infección de células hospedantes y la administración clínica.

5 Antes de describir con más detalle la invención se definen los términos y las expresiones utilizados en esta solicitud como se muestra a continuación, a menos que se indique lo contrario.

Tal como se emplea en la presente, una “infección vírica” se refiere a la entrada de un virus en una célula y a la posterior replicación del virus en la célula.

10 Tal como se emplea en la presente, la “multiplicidad de infección” se refiere a la proporción entre el número de virus al número de células cuando se utiliza un virus para que se ponga en contacto con células.

15 Tal como se emplea en la presente, la “lisis celular” se refiere a la ruptura de la membrana celular de una célula y a la posterior liberación de todo o parte del contenido de la célula.

20 Tal como se emplea en la presente, las “condiciones de cultivo” se refieren a las condiciones utilizadas en un cultivo celular, que incluyen pero no se limitan a la temperatura, el tipo de recipientes de cultivo, la humedad, la concentración de CO₂ o de cualquier otro gas utilizado en los recipientes de cultivo, el tipo de medio de cultivo, la densidad inicial de las células cultivadas, y si las células están infectadas por un virus, la multiplicidad de infección inicial.

25 Tal como se emplea en la presente, un “cultivo celular” o un “cultivo de células” significa una población de células cultivadas tal como se encuentran en sus condiciones de cultivo. En particular, un cultivo celular incluye las células y el medio de cultivo. Las células que se han sedimentado no se consideran un cultivo celular a menos que se coloquen de nuevo en un medio de cultivo bajo las condiciones de cultivo.

30 Tal como se emplea en la presente, un virus que está “asociado a una célula” se refiere a un virus que está unido a una célula o atrapado en parte de una célula en la que se ha producido el virus. Por tanto, un virus está asociado a una célula antes de que se lise la célula hospedante. Cuando comienza la lisis celular, un virus puede permanecer unido a la célula rota o atrapado en parte de la célula rota y sigue estando asociado a una célula. Sin embargo, cuando el virus se libera hacia el medio ya no está asociado a una célula. Un “virus exento de células” es un virus que no está asociado a una célula.

35 Tal como se emplea en la presente, “extraer” un virus se refiere al acto de convertir un virus asociado a una célula en un virus exento de células.

40 Tal como se emplea en la presente, un “detergente” es una sustancia que tiene un extremo hidrófilo y un extremo hidrófobo. El detergente es preferiblemente un compuesto químico sintético, y más preferiblemente es un compuesto químico sintético biodegradable. El detergente útil en la presente invención potencia la ruptura de las membranas celulares para facilitar la liberación del contenido de las células rotas.

Tal como se emplea en la presente, “incubar” después de la adición de un detergente a un cultivo celular se refiere al acto de permitir que el cultivo celular se mezcle con el detergente durante un periodo de tiempo.

45 Tal como se emplea en la presente, “recoger” el virus se refiere al acto de recoger el virus producido a partir de un cultivo celular que se ha infectado previamente con el virus. El virus se recoge, de forma típica, separando los residuos celulares del virus y recolectando la porción que comprende el virus. Opcionalmente, el virus puede separarse aún más de las sustancias solubles, por ejemplo mediante centrifugación.

50 Tal como se emplea en la presente, la “temperatura ambiente” se refiere a una temperatura entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 30°C. La temperatura ambiente es preferiblemente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 30°C, más preferiblemente entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 25°C, y lo más preferiblemente de aproximadamente 25°C.

55 Tal como se emplea en la presente, un “efecto citopático” viene indicado porque las células se hinchan y toman un aspecto granular y las agrupaciones celulares se rompen. Las células que muestran un efecto citopático también captan el tinte de tinción en un recuento de células viables.

60 Tal como se emplea en la presente, las “células adherentes” se refieren a células que se adhieren a los recipientes de cultivo en un cultivo celular. Los ejemplos de células adherentes incluyen células en monocapa, que son células que forman una única capa de células sobre la superficie de un recipiente de cultivo. Las “células en suspensión” o las “células suspendidas” se refieren a células que no se adhieren a los recipientes de cultivo en un cultivo celular. Las células en suspensión pueden cultivarse en un “cultivo agitado”, que es un cultivo en que el medio de cultivo se agita continuamente durante el proceso de cultivo.

65 Tal como se emplea en la presente, una células se “rompe” cuando la membrana celular se rompe y al menos una parte del contenido celular se libera de la célula. Una célula puede romperse, por ejemplo, mediante congelación -descongelación, mediante sonicación o mediante tratamientos con detergentes.

ES 2 323 454 T3

Tal como se emplea en la presente, la “viabilidad de las células” o el “porcentaje de células que siguen siendo viables” es el porcentaje de células que no muestran un efecto citopático en una población.

5 Tal como se emplea en la presente, un “virus sin envuelta” es un virus que no tiene una envuelta. Por ejemplo, un virus sin envuelta puede ser cualquier virus que pertenezca a la familia Adenoviridae (por ejemplo, adenovirus), Picornaviridae (por ejemplo, el virus de la polio), Reoviridae (por ejemplo, reovirus), Papovaviridae (por ejemplo, el virus del papiloma), Parvoviridae (por ejemplo, el virus Kilham de la rata) o Iridoviridae (por ejemplo, virus iridiscente de la típula).

10 Tal como se emplea en la presente, un “reovirus” se refiere a cualquier virus clasificado en el género de los reovirus, natural, modificado o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma de ARN bicatenario segmentado. Los viriones tienen un diámetro de 60-80 nm y poseen dos cubiertas de cápsida concéntricas, cada una de las cuales es icosaédrica. El genoma consiste en ARN bicatenario en 10-12 segmentos discretos con un tamaño total del genoma de 16-27 kpb. Los segmentos de ARN individuales varían en tamaño. Se han recuperado tres tipos de reovirus diferenciados pero relacionados procedentes de muchas especies. Los tres tipos comparten un antígeno común de fijación del complemento.

15 Los reovirus humanos consisten en tres serotipos: el tipo 1 (cepa Lang o T1L), el tipo 2 (cepa Jones, T2J) y el tipo tres (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres serotipos pueden identificarse con facilidad basándose en ensayos de neutralización e inhibición de hemaglutinina (véase, por ejemplo, Fields, B.N. *et al.*, 1996).

20 El reovirus puede ser natural o puede estar modificado. El reovirus es “natural” cuando puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionadamente en el laboratorio por seres humanos. Por ejemplo, el reovirus puede proceder de una “fuente de campo”, es decir, de un ser humano que ha sido infectado por el reovirus.

25 Los reovirus pueden modificarse pero pueden mantener la capacidad de infectar líticamente a una célula de mamífero que tenga una vía de ras activa. El reovirus puede ser química o bioquímicamente pretratado (por ejemplo, mediante el tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células en proliferación. El pretratamiento con una proteasa elimina la envuelta externa o la cápsida de los virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede revestirse sobre un liposoma o una micela (Chandron y Nibert, 1998). Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula infecciosa de subvirión.

30 El reovirus puede ser un reovirus recombinante que surge de la recombinación/reordenación de segmentos genómicos procedentes de dos o más reovirus genéticamente diferenciados. La recombinación/reordenación de segmentos genómicos de reovirus puede producirse en la naturaleza tras la infección de un organismo hospedante por al menos dos reovirus genéticamente diferenciados. También pueden generarse viriones recombinantes en un cultivo celular, por ejemplo mediante coinfección de células hospedantes permisivas con reovirus genéticamente diferenciados (Nibert *et al.*, 1995).

35 Por consiguiente, la invención contempla los reovirus recombinantes que surgen de la reordenación de segmentos del genoma procedentes de dos o más reovirus genéticamente diferenciados que incluyen, pero no se limitan a reovirus humanos, tales como el tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang), tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones) y tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney), reovirus de mamíferos no humanos, o reovirus aviares. La invención contempla también reovirus recombinantes que surgen de la reordenación de segmentos del genoma procedentes de dos o más reovirus genéticamente diferenciados, en los que al menos un virus de origen está modificado genéticamente, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados de modo químico, se ha tratado con mutágenos químicos o físicos, o en sí mismo es el resultado de un acontecimiento de recombinación. La invención contempla también el reovirus recombinante que ha sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos que incluyen, pero no se limitan a sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos que incluyen, pero no se limitan a luz ultravioleta y otras formas de radiación.

40 La invención contempla además reovirus recombinantes que comprenden delecciones o duplicaciones en uno o más segmentos del genoma, que comprenden información genética adicional como resultado de una recombinación con el genoma de una célula hospedante, o que comprenden genes sintéticos.

45 El reovirus puede modificarse mediante la incorporación de proteínas de la envuelta mutadas tales como, por ejemplo $\sigma 1$, en la cápsida externa del virión. Las proteínas pueden mutarse mediante sustitución, inserción o delección. La sustitución incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de otros restos aminoácidos en la proteína en uno o más emplazamientos. Las delecciones incluyen delecciones de uno o más restos aminoácidos en la proteína. Estas mutaciones pueden generarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida específica de sitio oligonucleotídico del gen que codifica una de las proteínas de la envuelta puede producir la generación de la proteína de la envuelta mutante deseada. La expresión de la proteína mutada en células de mamífero infectadas por reovirus *in vitro*, tales como células COS1, da como resultado la incorporación de la proteína mutada en la partícula del virión del reovirus (Turner y Duncan, 1992; Duncan *et al.*, 1991; Mah *et al.*, 1990).

ES 2 323 454 T3

Tal como se emplea en la presente, "células HEK 293" se refiere a la línea celular de riñón embrionario humano denominada 293 (n° de ATCC CRL-1573) o sus derivados. Por ejemplo, las células 293/SF (n° de ATCC CRL-1573.1) son células HEK 293 que se han adaptado para crecer en un medio exento de suero. También se contemplan en esta invención las células HEK 293 adaptadas para crecer en otras condiciones de cultivo, o cualquier tipo de células HEK 293 o sus derivados que se transforman con ADN exógeno, con la condición de que esta transformación no perjudique la capacidad de las células para sostener una producción eficaz de reovirus según se describe en esta invención.

Tal como se emplea en la presente, "administración clínica" de una sustancia se refiere a poner en contacto cualquier parte del cuerpo de un organismo vivo con la sustancia para mejorar o mantener las condiciones de salud del organismo.

Métodos

Los inventores han desarrollado previamente un método para cultivar reovirus en células HEK 293 (solicitud de patente de EEUU n° de publicación 20020037576). Los reovirus se replican en células HEK 293 para producir una alta valoración de virus en las células poco tiempo después de la infección vírica proporcionando, con ello, un método sencillo y eficaz para producir reovirus. Además, las células HEK 293 se han adaptado para que crezcan en suspensión, lo cual hace que puedan cultivarse en grandes cantidades, y los inventores han desarrollado un método de producción a gran escala. Para aislar los reovirus del cultivo en suspensión, los inventores inicialmente siguieron métodos tradicionales para extraer y para purificar partículas víricas. Brevemente, las células se rompieron mediante congelación-descongelación y se extrajeron con Freon® tres veces. Las partículas víricas entonces se purificaron con un gradiente de CsCl y se sometieron a una ultracentrifugación. Sin embargo, este protocolo resultaba demasiado tedioso y largo para la producción de virus a gran escala.

Por tanto, los inventores desarrollaron un método simplificado para extraer los reovirus. Se descubrió que incubando el cultivo de células HEK 293 con un detergente durante un corto periodo de tiempo se liberaban altos niveles de reovirus infecciosos hacia el extracto. Los virus entonces pueden separarse de los residuos celulares con un sencillo método de separación basado en las diferencias de tamaño o de densidad, tal como filtración, diafiltración o exclusión molecular, y el virus resultante puede utilizarse para la terapia con reovirus. El reovirus producido según la presente invención es adecuado para su administración a seres humanos, y este protocolo resulta coherente con la recomendación de la FDA para romper células en presencia de un detergente.

Los inventores ensayaron cuatro detergentes en un experimento preliminar, los detergentes no iónicos Triton X-100, NP-40 y Tween-20, así como el detergente iónico desoxicolato de sodio. Los cuatro detergentes fueron capaces de lisar las células y de liberar las partículas víricas infecciosas por encima del nivel de fondo, y el Triton X-100 fue el más eficaz. Se contempla que otros detergentes, en particular aquellos que se emplean habitualmente para romper células, puedan utilizarse también en la presente invención. Los ejemplos de estos otros detergentes incluye los otros detergentes Triton, los otros detergentes Tween (por ejemplo, Tween-80), dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de litio, y cloruro de dodeciltrimetilamonio.

Los resultados también indican que la extracción con detergentes puede ser más eficaz que la congelación-descongelación, que es el procedimiento convencional para la extracción de virus. Además, se ha indicado que para extraer reovirus aviarios de células Vero, en las que el reovirus está fuertemente asociados a las células, el agua desionizada destilada resulta más eficaz que la congelación-descongelación, la extracción con Freon® o el tratamiento con tripsina (Drastini *et al.*, 1992). La presente invención proporciona un enfoque más rápido y conveniente, aunque eficaz, porque no es necesario sedimentar y después resuspender las células como se requiere en el método del agua destilada.

Se contempla que puedan utilizarse altas concentraciones de sales, tales como cloruro de guanidina, en la presente invención para sustituir a los detergentes. Sin embargo, es preferible utilizar detergentes en lugar de altas concentraciones de sales.

Por tanto, la presente invención proporciona un método rápido y sencillo para extraer virus de un cultivo celular. El detergente puede añadirse directamente al cultivo en suspensión o al medio de las células adherentes. En cualquiera de estos casos, no es necesario que el medio se retire primero. Además, no son necesarios otros medios para romper las células o para extraer los virus, tales como congelación-descongelación o sonicación.

Una característica importante de la presente invención es que el procedimiento de extracción puede realizarse a la temperatura ambiente o por encima de ésta. De modo tradicional, la extracción y la purificación de virus se realiza a baja temperatura, de forma típica a 0-4°C, para conservar las estructuras y las funciones de las proteínas. Por la misma razón también se incluyen habitualmente inhibidores de proteasas en las disoluciones de extracción. Por tanto, resulta sorprendente que el presente protocolo pueda realizarse a una temperatura mayor sin inhibidores de proteasas. De hecho, una temperatura tan elevada como 37°C produjo aproximadamente la misma cantidad de virus infecciosos que a 25°C. Por consiguiente, la extracción de los virus puede realizarse añadiendo un detergente directamente al cultivo celular y después agitando el cultivo para liberar los virus sin tener que cambiar de temperatura. Como alternativa, puesto que no es necesario mantener una temperatura constante para la extracción de virus según la presente invención, el procedimiento puede realizarse a temperatura ambiente incluso aunque la temperatura ambiente puede variar de un lugar a otro o puede variar con el tiempo en el mismo lugar.

ES 2 323 454 T3

Después de la extracción, el virus se purifica basándose, por ejemplo, en las diferencias de tamaño o de densidad entre los virus y los otros constituyentes del extracto. En particular puede emplearse una filtración o una centrifugación para eliminar los residuos celulares del virus. Para optimizar las condiciones de filtración, los inventores ensayaron el efecto de diversos filtros en presencia de varios detergentes de extracción diferentes (ejemplo 1). Un protocolo de filtración discontinuo demostró ser lo más eficaz. Por tanto, se emplea primero un prefiltro que tiene un tamaño de poro relativamente grande (por ejemplo, 5 μM u 8 μM) para retirar los trozos grandes de la mezcla de extracción, seguido de filtros con unos tamaños de poro menores, tal como una unidad de filtros combinados que contenga un filtro de 3 μM y un filtro de 0,8 μM . En ausencia de prefiltros, la mezcla de extracción obturaría el filtro con rapidez gastando, con ello, material y tiempo.

Basándose en el volumen recogido después de la filtración, como se muestra en el ejemplo 1, es preferible utilizar Triton X-100 al 1% para la extracción de los virus. Además, los filtros de membrana de acetato de celulosa son mejores que los filtros de membrana de fibra de vidrio, porque el filtro de membrana de acetato de celulosa permite filtrar un volumen mayor de mezcla de extracción, haciendo que sea más adecuado para una producción a gran escala.

Dependiendo del objetivo de la producción de virus, puede resultar deseable concentrar el filtrado que contiene los virus. En el ejemplo 2 se muestra una etapa de concentración que emplea ultrafiltración/diafiltración. Se ensayaron dos sistemas de ultrafiltración/diafiltración, el módulo de placa y marco de Pall Filtron, y el cartucho de fibras huecas de A/G Technology. Los resultados demuestran que los dos sistemas son comparables en su velocidad de funcionamiento o en su grado de pérdida de volumen, pero el cartucho de fibras huecas es más fácil de manipular.

El virus se purifica basándose en su carga sobre la superficie. Puesto que diferentes virus tienen diferentes proteínas de la superficie, las cuales dictan su carga sobre la superficie a cualquier pH dado, las condiciones apropiadas para la purificación deben decidirse para cada virus. El ejemplo 3 ilustra la determinación de las condiciones de intercambio iónico óptimas para los reovirus. Así, se utilizaron columnas de intercambio iónico que contenían diferentes resinas a diferente pH para purificar una preparación de reovirus que se había extraído, filtrado y concentrado como se describió anteriormente. Los resultados indican que una columna aniónica débil que contenía ANX Sepharose a pH 7,0-8,5 era lo más eficaz. El pH es más preferiblemente de aproximadamente 7,5 u 8,0, y es lo más preferiblemente de aproximadamente 8,0.

Además, el virus se purifica basándose en las diferencias de tamaño con una cromatografía de exclusión molecular. Para los reovirus, una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular es particularmente eficaz. Adicionalmente, también pueden utilizarse otros métodos cromatográficos, tales como los basados en la afinidad o la interacción hidrófoba, cuando resulte apropiado. Por tanto, puede adoptarse una cromatografía en columna como alternativa eficaz a una ultracentrifugación en gradiente de densidad de CsCl para lograr un buen rendimiento, pureza y adaptación a escala.

El presente método puede aplicarse a la producción de reovirus utilizando células distintas de las células HEK 293 incluyendo, pero sin limitarse a células L929 de ratón, células Vero y células de ovario de hámster chino. Se contempla que el presente método pueda aplicarse también a otros virus, en particular otros virus sin envuelta. Los expertos en la técnica pueden determinar las condiciones apropiadas para la purificación de otros virus basándose en la presente descripción. Los virus que pueden prepararse en el presente método incluyen, pero no se limitan a los virus de las familias Myoviridae, Siphoviridae, Podpviridae, Tecoviridae, Corticoviridae, Plasmaviridae, Lipothrixviridae, Fuselloviridae, Poxviridae, Iridoviridae, Phycodnaviridae, Baculoviridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Polydnviridae, Inoviridae, Microviridae, Geminiviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Hepadnaviridae, Retroviridae, Cictoviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Leviviridae, Picornaviridae, Sequiviridae, Comoviridae, Potyviridae, Calciviridae, Astroviridae, Nodaviridae, Tetraviridae, Tombusviridae, Coronaviridae, Glaviviridae, Togaviridae y Barnaviridae.

Composiciones

La presente memoria descriptiva describe composiciones que comprenden los virus preparados según los métodos de la presente invención. Estas composiciones pueden utilizarse para el aislamiento y la caracterización de proteínas víricas, la producción de vacunas o, cuando la composición contiene virus infecciosos, como reservorios de virus, o en la administración clínica. Sin embargo, las composiciones no son un tema de la invención.

Para los objetivos de la administración clínica, la composición normalmente se mezcla con un excipiente, se diluye con un excipiente, o se encierra dentro de un vehículo que puede estar en forma de una cápsula, un sobre, un papel u otro recipiente (documento WO99/08692A1) como composición farmacéutica. Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable actúa como diluyente puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles.

ES 2 323 454 T3

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, disolución salina estéril, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y suspensores; agentes conservantes, como metil- y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retrasada del ingrediente activo después de su administración a un paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

La vía mediante la cual se administra el reovirus, así como la formulación, el portador o el vehículo, dependerá del emplazamiento así como del tipo de células diana. Puede emplearse una amplia variedad de vías de administración. Por ejemplo, para un neoplasma sólido que sea accesible, el reovirus puede administrarse mediante inyección directamente al neoplasma. Para un neoplasma hematopoyético, por ejemplo, el reovirus puede administrarse por vía intravenosa o intravascular. Para los neoplasmas que no sean fácilmente accesibles dentro del cuerpo, como metástasis, el reovirus se administra de tal manera que pueda transportarse sistémicamente a través del cuerpo del mamífero y, de ese modo, alcance el neoplasma (por ejemplo, por vía intravenosa o intramuscular). Como alternativa, el reovirus puede administrarse directamente a un único neoplasma sólido, desde donde se transporta sistémicamente a través del cuerpo hasta las metástasis. El reovirus también puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal (por ejemplo, para un tumor cerebral), tópica (por ejemplo, para un melanoma), oral (por ejemplo, para un neoplasma oral o esofágico), rectal (por ejemplo, para un neoplasma colorrectal), vaginal (por ejemplo, para un neoplasma cervical o vaginal), nasal o mediante un pulverizado para inhalación (por ejemplo, para un neoplasma pulmonar). Preferiblemente, el reovirus se administra mediante inyección.

Las formas líquidas en que las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención pueden incorporarse para la administración oral o mediante inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes aromatizados de forma adecuada, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles, tal como aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Para preparar composiciones sólidas, tales como comprimidos, el principal ingrediente activo/reovirus se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una preformulación sólida que contenga una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se indica que estas composiciones de preformulación son homogéneas significa que el ingrediente activo está disperso de manera uniforme a través de la composición, de manera que la composición puede dividirse con facilidad en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces, como comprimidos, píldoras y cápsulas.

Los comprimidos o las píldoras puede estar revestidos o pueden componerse de otra forma para proporcionar una forma de dosificación que presente la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora puede comprender un componente de dosificación interna y un componente de dosificación externa, estando este último en forma de una envuelta sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que actúa para resistir a la disgregación en el estómago y permite que el componente interno pase intacto hacia el duodeno o pueda liberarse con retraso. Puede utilizarse una diversidad de materiales para estos revestimientos o capas entéricas, y estos materiales incluyen una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o sus mezclas, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe en la presente. Preferiblemente, las composiciones se administran por la vía respiratoria nasal u oral para un efecto local o sistémico. Las composiciones preferiblemente en disolventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse con el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede unirse a una mascarilla o a una máquina respiradora de presión positiva intermitente. Las composiciones en disolución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que administren la formulación de una manera apropiada.

Otra formulación preferida empleada para las composiciones descritas en la presente invención emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Estos parches transdérmicos pueden utilizarse para proporcionar una infusión continua o discontinua del reovirus de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU 5.032.525, incorporada en la presente como referencia. Estos parches pueden construirse para la administración continua, pulsátil o a petición de agentes farmacéuticos.

Otras formulaciones adecuadas para las composiciones descritas en la presente invención pueden encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención y no deben considerarse limitantes del alcance de la presente invención de ninguna manera.

ES 2 323 454 T3

En los ejemplos a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen el significado que se acepta de modo general.

CI = intervalo de confianza

TCID₅₀ = dosis infecciosa del cultivo de tejido₅₀

μM = micromolar

mM = milimolar

M = molar

ml = mililitro

μl = microlitro

mg = miligramo

μg = microgramo

g/l = gramos por litro

rpm = revoluciones por minuto

FBS = suero bovino fetal

DTT = ditionitrietol

NP-40 = Nonidet P-40 (octilfenoxipolietoxietanol)

SDS = dodecilsulfato de sodio

PBS = disolución salina tamponada con fosfato

β-ME = β-mercaptoetanol

MOI o m.o.i. = multiplicidad de infección

PFU = unidades formadoras de placa

h = hora

°C = grados Celsius

Materiales y métodos generales

Células y virus

Las células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) y las células de fibroblastos de ratón L-929 fueron suministradas por el fabricante BioReliance Corporation (Rockville, Maryland). Las células HEK 293 se cultivaron en un medio de cultivo que contenía 10% de suero de caballo inactivado por calor y 90% de la siguiente mezcla: medio esencial mínimo de Eagle con L-glutamina 2 mM y disolución salina equilibrada de Earle ajustada para que contuviese bicarbonato de sodio 1,5 g/l, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y piruvato de sodio 1,0 mM. Las células de ratón L-929 se propagaron en un medio de cultivo que contenía 10% de FBS y 90% de la siguiente mezcla: medio esencial mínimo de Eagle con L-glutamina 2 mM y disolución salina equilibrada de Earle ajustada para que contuviese bicarbonato de sodio 1,5 g/l, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y piruvato de sodio 1,0 mM.

Las células 293/SF se cultivaron en medio exento de suero 293 (Life Technologies, Rockville, Maryland) suplementado con L-glutamina 4 mM a 36°C±2°C, 6%±2% de CO₂, y 80%±5% de humedad relativa en matraces de agitación a una velocidad del impulsor de 35-40 rpm.

La cepa Dearing del reovirus de serotipo 3 utilizada en estos estudios primero se propagó en cultivos en suspensión de células L-292 purificadas según Smith (Smith *et al.*, 1969) con la excepción de que el β-mercaptoetanol (β-ME) se omitió del tampón de extracción. La proporción de partículas/PFU para los reovirus purificados fue, de forma típica, de 100/1. Se determinaron las valoraciones víricas mediante valoración de placas de células L-929 y se expresaron como log₁₀ TICD₅₀/ml. Entonces se produjeron los virus a gran escala en células 293/SF.

ES 2 323 454 T3

Infección de células en suspensión

Las células 293/SF se cultivaron hasta 10^6 /ml y se infectaron con el reovirus. Se dejó que el cultivo creciese hasta que el color del medio cambió de rojo a naranja, o hasta que la viabilidad de las células cayó hasta el nivel deseado, según se evidencia por un recuento de células viables. Los recuentos de células viables pueden realizarse bajo el microscopio para las células que no muestren un efecto citopático, lo cual viene indicado porque las células se hinchan y toman un aspecto granular y las agrupaciones celulares se rompen. Los recuentos de células viables también pueden realizarse mediante una tinción viable tal como se utiliza habitualmente en la técnica.

Método tradicional de extracción y purificación de virus

Cuando se alcanza el nivel de viabilidad celular deseado, las células se sedimentan en una centrífuga y se resuspenden en Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM y Triton X-100 al 0,1%. Las células entonces se lisan mediante congelación-descongelación y se mantienen en hielo durante 20-40 minutos con agitación en vórtice periódica para mezclar y lisar las células. La suspensión se extrajo con un volumen igual de Freon[®] (1,1,2-tricloro-1,1,2-trifluoroetano) preenfriado, mediante agitación en vórtice durante 10 minutos, seguido de una centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C para separar las diferentes fases. La fase acuosa (superior) se retiró y se reextrajo dos veces como se describió anteriormente, y el virus se sedimentó mediante ultracentrifugación a 25.000 rpm durante una hora a 4°C.

El sedimento se resuspendió en PBS y el virus se purificó mediante un gradiente discontinuo de cloruro de cesio. El gradiente contenía dos capas de disoluciones de CsCl (1,20 g/ml y 1,4 g/ml, respectivamente) preparadas en Tris 10 mM (pH 7,4). La suspensión vírica se cargó sobre la parte superior del gradiente y se centrifugó en un rotor SW 28.1 a 26.000 rpm durante 2 horas a 4°C. La banda vírica (la banda inferior de las dos bandas, porque la banda superior contiene cápsidas vacías) se recolectó y se dializó contra PBS estéril.

Tratamiento con benzonasa

Después de lisar las células con un detergente se añadió una disolución de $MgCl_2$ 50 mM al lisado bruto hasta una concentración final de $MgCl_2$ 1 mM. Entonces se añadió benzonasa (250.000 unidades, EM Industries, n° de catálogo 1016979M) hasta aproximadamente 10 unidades/ml. El lisado se agitó en un incubador a 36°C durante una hora.

Ejemplo 1

Clarificación: eliminación de los residuos celulares

El objetivo de este ejemplo es desarrollar un procedimiento de clarificación adecuado que sea compatible con el protocolo que utiliza detergentes para lisar células y que sea susceptible al ajuste a escala y a la fabricación futuros. En este ejemplo, el lisado se filtró a través de un filtro de cápsula de $3 \mu m/0,8 \mu m$, o se hace pasar a través de una combinación de un prefiltro ($5 \mu m$ u $8 \mu m$) y después a través de un filtro de cápsula de $3 \mu m/0,8 \mu m$. Todos los filtros utilizados en este estudio tenían una superficie específica de $13,95 \text{ cm}^2$. Basándose en el volumen filtrado a través de la membrana de $13,95 \text{ cm}^2$ se determinó la capacidad de las membranas para una filtración a gran escala. Además se comparó la eficacia de filtración para dos materiales de membrana diferentes, la membrana de acetato de celulosa y la membrana de fibra de vidrio, para el filtro de cápsula de $3 \mu m/0,8 \mu m$.

Se ensayaron tres detergentes. Las células que portaban los reovirus se dividieron en partes iguales en tres botellas estériles de 1 l rotuladas con los tres agentes de lisis diferentes que se van a ensayar: Triton X-100 al 1%, Triton X-100 al 0,3%, y Na-DOC al 0,1%. Se añadió un volumen de 92 ml y 82 ml de Triton X-100 al 10% a las botellas 1 y 2, de forma que las concentraciones de trabajo en estas botellas fueron de Triton X-10 al 1% y al 0,3%, respectivamente. Se añadió un volumen de 9,2 ml de Na-DOC al 10% a la tercera botella hasta una concentración de trabajo de 0,1%. Las tres botellas se colocaron en una placa de agitación y se agitaron a 160 ± 20 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomó una muestra post-lisis para cada condición de lisis para el análisis de las valoraciones.

Se añadieron aproximadamente 20 ml de $MgCl_2$ 50 mM al lisado bruto en cada una de las botellas hasta una concentración de trabajo de aproximadamente $MgCl_2$ 1 mM. A esto le siguió la adición de $40 \mu l$ de benzonasa (250.000 unidades/ml) hasta una concentración de trabajo de aproximadamente 10 unidades/ml. El lisado bruto se agitó en el ajuste 5 en un incubador a 36°C durante una hora. Estas etapas se incluyeron para eliminar el ADN de la célula hospedante y para reducir la viscosidad del lisado favoreciendo, con ello, la facilidad del procesamiento posterior.

Se calibró una bomba Watson-Marlow (505U) para relacionar el caudal con la velocidad de la bomba. Según las sugerencias del vendedor, se empleó una velocidad de la bomba de 5 rpm (caudal de 40 ml/min) a lo largo del estudio de clarificación.

ES 2 323 454 T3

El lisado procedente de cada condición de tratamiento se hizo pasar a través de uno de los siguientes filtros:

1) un filtro de cápsula de $3\ \mu\text{m}/0,8\ \mu\text{m}$;

5 2) un prefiltro con un tamaño de $5\ \mu\text{m}$ → un filtro de cápsula de $3\ \mu\text{m}/0,8\ \mu\text{m}$ conectados en serie; y

3) un prefiltro con un tamaño de poro de la membrana de $8\ \mu\text{m}$ → un filtro de cápsula de $3\ \mu\text{m}/0,8\ \mu\text{m}$ conectados en serie.

10 Los filtros de cápsula de $3\ \mu\text{m}/0,8\ \mu\text{m}$ tienen una construcción de doble capa de membranas heterogéneas que permite una capacidad de carga con una gran cantidad de suciedad y un mayor capacidad de procesamiento. El primer filtro tiene un tamaño de poro mayor ($3\ \mu\text{m}$) que el segundo filtro ($0,8\ \mu\text{m}$). Los prefiltros combinan múltiples capas de material de filtro de profundidad de polipropileno no tejido trenzado progresivamente más fino. Todos los filtros utilizados en este estudio tenían una superficie específica de $13,95\ \text{cm}^2$. Se ensayaron dos materiales de membranas, a saber, el acetato de celulosa y la fibra de vidrio, para los filtros de cápsula de $3\ \mu\text{m}/0,8\ \mu\text{m}$.

Se determinó la mejor combinación de agente de lisis y de condiciones del filtro basándose en los valores de la valoración y en los volúmenes que pasan a través del filtro. Se controló la presión de goteo a través de las membranas para determinar si se ensuciaban las membranas. La indicación de la suciedad de las membranas es una presión de goteo de $172,37\ \text{kPa}$, por encima de ésta el filtro se puede romper. Cuando se utilizó un único filtro de cápsula de $3\ \mu\text{m}/0,8\ \mu\text{m}$, no más de $35\ \text{ml}$ pasaron a través de estos filtros de cápsula antes de que la membrana se ensuciase. Los tamaños de membrana de $3/0,8\ \mu\text{m}$ se ensuciaron en 5 minutos, lo cual sugiere que el uso de un prefiltro es necesario para eliminar la obturación de las membranas por los residuos celulares. El uso de un prefiltro de $5\ \mu\text{m}$ antes del filtro de cápsula de $3/0,8\ \mu\text{m}$ aumentó significativamente la cantidad de filtrado obtenida, mientras que la filtración a través de un prefiltro de $8\ \mu\text{m}$, seguido de la filtración en la cápsula de $3\ \mu\text{m}/0,8\ \mu\text{m}$, produjo la mayor capacidad de membrana en términos del volumen que pasa a través de los filtros (se recogió una media de $200\ \text{ml}$ por $13,95\ \text{cm}^2$ de superficie específica del filtro). El Triton X-100 al 1% produjo los mejores resultados comparado con las otras dos condiciones de lisis.

30 Los resultados también demuestran que el material de membrana de acetato de celulosa actúa mejor que la membrana de fibra de vidrio, basándose en el volumen filtrado a través de estas membranas. No se observó una pérdida significativa de infectividad en ninguna etapa de la filtración cuando se compara con la infectividad de la masa del cultivo (el cultivo celular antes de la lisis y de la filtración). Basándose en los resultados de este estudio, una masa de cultivo de $20\ \text{l}$ requeriría una superficie específica de la membrana de $1395\ \text{cm}^2$ para su filtración.

35

Ejemplo 2

Concentración

40

Para seleccionar un sistema adecuado para concentrar y diafiltrar el lisado aclarado, se comparó el módulo de placa y marco de Pall Filtron (www.pall.com) y el cartucho de fibras huecas de A/G Technology (www.agtech.com). Se empleó el mismo material de membrana de polietersulfona en ambos sistemas. El criterio para la selección fue la facilidad de uso, el grado de concentración logrado y la valoración vírica del producto.

45

El módulo de placa y marco utilizado en este estudio fue el sistema MINIM de Pall, que es una unidad de mesa de laboratorio, y el LV Centramate, que contiene dos canales de barrido suspendidos de membranas de ultrafiltración de $300\ \text{kD}$ ($186\ \text{cm}^2$ cada una). Antes de concentrar el lisado aclarado, el aparato se enjuagó con $2\ \text{l}$ de agua de ósmosis inversa (RO) (calidad USP) para eliminar el gel de conservación. Los módulos se sanearon con $2\ \text{l}$ de NaOH $0,1\ \text{N}$ calentado. El sistema entonces se drenó, se enjuagó con $2\ \text{l}$ de agua RO y se acondicionó con el medio de crecimiento para el virus. El sistema completo se drenó y se determinó que el volumen de contención del sistema y de los tubos era de $6\ \text{ml}$.

50

El cartucho de fibras huecas ensayado en este estudio fue un sistema de mesa QuixStand de A/G Technology, con un cartucho de ultrafiltración de columna de tamaño $4\ \text{M}$ (superficie específica de $650\ \text{cm}^2$). Al igual que con el módulo de placa y marco, el aparato primero se enjuagó con $2\ \text{l}$ de agua de ósmosis inversa (RO) (calidad USP) para enjuagar el gel de conservación. Los módulos se sanearon con $2\ \text{l}$ NaOH $0,1\ \text{N}$ calentado. El sistema entonces se drenó, se enjuagó con $2\ \text{l}$ de agua RO y se acondicionó enjuagando con el medio de crecimiento para el virus. Se utilizó un caudal de entrada constante de $600\ \text{ml}/\text{min}$ a lo largo del experimento.

60

Para ambos sistemas, el lisado aclarado se recirculó hasta que el material se concentró hasta aproximadamente $250\ \text{ml}$ (concentración $10\times$), y se tomó una muestra para el análisis de la valoración (concentración post-I). El concentrado (retenido) se diafiltró contra $1\ \text{l}$ (5 volúmenes de diafiltración) de tampón de diafiltración (Tris $20\ \text{mM}$ + NaCl $0,2\ \text{M}$ + MgCl_2 $1\ \text{mM}$, pH $8,0\pm 0,1$) y se tomó otra muestra para el análisis de la valoración (post-diafiltración). El retenido se concentró aún más hasta aproximadamente $120\ \text{ml}$. Después de la concentración final, el producto se drenó del sistema y se recogió en un único recipiente estéril (concentración post-final). El sistema entonces se enjuagó con $40\ \text{ml}$ de tampón de diafiltración para asegurar la máxima recuperación del producto.

65

ES 2 323 454 T3

Los parámetros del proceso controlados durante el proceso de concentración con el sistema de fibras huecas y el sistema de placa y marco se muestran en la tabla 1.

5

TABLA 1

Comparación de los parámetros del proceso para el sistema de fibras huecas y para el sistema de placa y marco

10

Sistema	Tiempo del proceso (h)	Superficie específica (cm ²)	Factor de concentración	Media del caudal de entrada (ml/min)		Caudal del permeado (ml/min)		TMP (kPa)	
				Comienzo	Fin	Comienzo	Fin	Comienzo	Fin
Fibra huecas	3	650	14X	600	600	50	18	55,16	55,16
Placa y marco	4	372	20X	260	450	54	12	63,43	206,84

15

20

$$\text{TMP} = [(\text{presión de entrada} + \text{presión del retenido})/2 - \text{presión del permeado}]$$

25

La presión transmembrana (TMP) se mantuvo por debajo de 55,16 kPa a lo largo del proceso de fibras huecas, mientras que la TMP aumentó hasta 206,84 kPa con el proceso de placa y marco. El uso de una mayor superficie específica de la membrana en el sistema de fibras huecas probablemente ensució menos la membrana.

30

Se logró una concentración en aproximadamente 20X veces con el módulo de placa y marco en 4 horas, mientras que se obtuvo una concentración en 14X veces utilizando el cartucho de fibras huecas en 3 horas, y se pudo haber obtenido una concentración de 20X en otros 30 minutos. Se produjo una pérdida del producto de 45-50% cuando se compara con los valores de post-lisis en los dos sistemas. El montaje del cartucho de fibras huecas fue más sencillo que el del módulo de placa y marco. Por tanto, el cartucho de fibras huecas es el sistema adecuado para las etapas de ultrafiltración y de diafiltración basándose en la facilidad de manipulación.

35

Ejemplo 3

40

Intercambio iónico

Los virus tienen diferentes cargas en su superficie debido a las moléculas presentes en su superficie. Por tanto, es posible purificar virus utilizando una cromatografía de intercambio iónico, y las condiciones variarán dependiendo de la naturaleza de los virus. Por consiguiente, los inventores ensayaron las condiciones de una cromatografía de intercambio iónico a diversos pH para los reovirus. El reovirus se cromatografió a diferentes pH. Se determinó la valoración después de cada etapa y se lista a continuación.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 323 454 T3

TABLA 2

Efectos de una cromatografía de intercambio iónico a diversos pH

Muestra	Valoración±95% de CI (\log_{10} TCID ₅₀ /ml)	Corección del volumen ²	Valoración±95% de CI corregida (\log_{10} TCID ₅₀ /ml)
Control del virus sembrado, 10/30/01	8,05 ± 0,47	-	-
Valoración certificada de RE3013101P	8,35 ± 0,27	-	-
Control negativo	no se detectaron virus	-	-
ONC 101, masa del cultivo	**	-	-
ONC 102, post-filtración	9,18 ± 0,36	-	9,18 ± 0,36
ONC 103, post-columna, catión fuerte pH 4,0	5,93 ± 0,24	1,02	5,94 ± 0,24
ONC 104, post-columna, catión fuerte pH 5,0	8,93 ± 0,42	1,01	8,93 ± 0,42
ONC 105, post-columna, catión fuerte pH 6,0	9,18 ± 0,40	-	9,18 ± 0,40
ONC 106, post-columna, catión fuerte pH 7,0	9,30 ± 0,37	-	9,30 ± 0,37
ONC 107, post-columna, catión fuerte pH 8,0	9,55 ± 0,32	-	9,55 ± 0,32
ONC 108, post-columna, catión débil pH 4,0	8,93 ± 0,40	1,01	8,93 ± 0,40
ONC 109, post-columna, catión débil pH 5,0	9,18 ± 0,36	1,01	9,18 ± 0,36
ONC 110, post-columna, catión débil pH 6,0	8,68 ± 0,40	-	8,68 ± 0,40
ONC 111, post-columna, catión débil pH 7,0	9,30 ± 0,37	-	9,30 ± 0,37
ONC 112, post-columna, catión débil pH 8,0	8,18 ± 0,36	1,02	8,19 ± 0,36
ONC 113, post-columna, anión fuerte pH 5,0	5,30 ± 0,37	1,01	5,30 ± 0,37
ONC 114, post-columna, anión fuerte pH 6,0	4,80 ± 0,00	-	4,80 ± 0,00
ONC 115, post-columna, anión fuerte pH 7,0	7,80 ± 0,35	-	7,80 ± 0,35
ONC 116, post-columna, anión fuerte pH 8,0	10,18 ± 0,36	10,01	10,18 ± 0,36
ONC 117, post-columna, anión fuerte pH 9,0	8,55 ± 0,32	-	8,55 ± 0,32
ONC 118, post-columna, anión débil pH 5,0	7,93 ± 0,40	-	7,93 ± 0,40
ONC 119, post-columna, anión débil pH 6,0	6,68 ± 0,40	-	6,68 ± 0,40
ONC 120, post-columna, anión débil pH 7,0	8,30 ± 0,37	1,02	8,31 ± 0,37
ONC 121, post-columna, anión débil pH 8,0	10,53 ± 0,36	1,03	10,54 ± 0,36
ONC 122, post-columna, anión débil pH 9,0	8,93 ± 0,24	1,03	8,94 ± 0,24

Por consiguiente, un pH de 7,0-9,0 produjo un mayor rendimiento de reovirus que otros pH. El pH utilizado en esta etapa es preferiblemente de 7,5-8,5, en particular pH 8,0. Aunque los intercambiadores catiónicos y aniónicos funcionaron ambos, los intercambiadores aniónicos fueron en general más eficaces.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir virus a partir de un cultivo de células, que comprende las etapas de:

5 (a) proporcionar un cultivo de células que se han infectado con el virus;

(b) extraer el virus de las células añadiendo un detergente al cultivo de células e incubando durante un periodo de tiempo para producir un lisado celular;

10 (c) retirar los residuos celulares;

(d) purificar el virus mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular;

15 (e) recoger el virus.

2. El método de la reivindicación 1, en el que los residuos celulares se retiran mediante filtración.

20 3. El método de la reivindicación 1, en el que los residuos celulares se retiran mediante una filtración discontinua, que comprende:

(1) filtrar a través de un prefiltro que tiene un tamaño de poro de $5\ \mu\text{M}$ u $8\ \mu\text{M}$, y

25 (2) filtrar, después de la etapa (1), a través de un filtro combinado que tiene unos tamaños de poro de $3\ \mu\text{M}$ y $0,8\ \mu\text{M}$.

30 4. El método de la reivindicación 1, que comprende además tratar el lisado celular con una enzima de ruptura del ADN.

5. El método de la reivindicación 2, que comprende además concentrar el filtrado.

35 6. El método de la reivindicación 5, en el que el filtrado se concentra mediante diafiltración.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el virus es un virus sin envuelta.

8. El método de la reivindicación 1, en el que el virus es un reovirus.

40 9. El método de la reivindicación 8, en el que el reovirus es un reovirus de mamífero.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el reovirus de mamífero es un reovirus humano.

45 11. El método de la reivindicación 10, en el que el reovirus humano es un virus de serotipo 3.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el reovirus de serotipo 3 es la cepa Dearing.

13. El método de la reivindicación 8, en el que el reovirus es un reovirus recombinante.

50 14. El método de la reivindicación 1, en el que las células son células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293).

15. El método de la reivindicación 14, en el que las células HEK 293 se cultivan en suspensión.

55 16. El método de la reivindicación 1, que comprende además purificar el virus mediante una cromatografía de intercambio aniónico.

17. Un método para producir reovirus infecciosos, que comprende:

60 (a) proporcionar un cultivo de células HEK 293 que se han infectado con reovirus;

(b) extraer el virus de las células añadiendo Triton X-100 al cultivo de células HEK 293 e incubando de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C ;

65 (c) tratar la mezcla de la etapa (b) con una enzima de ruptura del ADN;

(d) retirar los residuos celulares mediante filtración;

ES 2 323 454 T3

(e) concentrar el filtrado mediante ultrafiltración o diafiltración;

(f) purificar el reovirus mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular; y

5

(g) recoger el virus.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65