



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 366**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07100409 .7**

96 Fecha de presentación : **13.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1783212**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Procedimientos de purificación de adenovirus.**

30 Prioridad: **14.05.2002 US 380332 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2011**

73 Titular/es: **MERCK SHARP & DOHME Corp.**  
**126 East Lincoln Avenue**  
**Rahway, New Jersey 07065, US**

72 Inventor/es: **Konz, John O., Jr;**  
**Lee, Ann;**  
**Goerke, Aaron y**  
**To, Chi Shung Brian**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 366 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 2 357 366 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos de purificación de adenovirus.

### 5 Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas

Esta solicitud reivindica beneficio, de conformidad con 35 U.S.C. § 119(e), a la solicitud provisional de los Estados Unidos 60/380,322, presentada el 14 de mayo de 2.002.

### 10 Estado con respecto al Patrocinio Federal R&D

No Aplicable.

### Referencia al apéndice de microficha

15 No Aplicable.

### Campo de la invención

20 La presente invención se refiere a procedimientos de purificar partículas virales, especialmente partículas de vectores de adenovirus recombinantes. Este procedimiento se desarrolla para purificar adenovirus a partir de lisado celular. Ello usa una combinación de precipitación selectiva, filtración en profundidad y/o centrifugación, ultrafiltración, digestión con nucleasas y cromatografía para producir producto altamente purificado de forma sólida y económica.

25 Es este procedimiento, los niveles de DNA huésped contaminante se reducen consistentemente a menos del límite de cuantificación de un ensayo basado en PCR específico para DNA humano (< 5 pg/10<sup>11</sup> pv).

### Antecedentes de la invención

30 Los avances en las áreas del uso de los vectores virales recombinantes para aplicaciones de terapia génica y vacunación de DNA han creado una necesidad para elaboración y purificación a gran escala de virus de calidad clínica. Una familia tal de virus son los adenovirus. Los adenovirus se agrupan dentro de la familia *Adenoviridae*, que se dividen entre el género *Aviadenovirus* (de aves) y *Mastadenovirus* (de seres humanos, de simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos y de zarigüeyas). Una revisión de la familia *Adenoviridae* se puede encontrar en *Fundamental Biology*, 3<sup>a</sup> ed., Fields, B.N., Knipe, D.M. y Howley, P.M., Ed., en el capítulo 30, páginas 979-1016 (1996), que se incorpora por  
35 la presente mediante referencia. De interés específico en las aplicaciones de vacunación génica y/o de terapia génica es el uso de un adenovirus incompetente en replicación de primera generación (FG), hecho defectivo por las deleciones de genes E1 y/o E1/E3, en base al serotipo de adenovirus. Los adenovirus tienen un tropismo celular amplio que incluye células que presentan antígenos especializadas tales como macrófagos y células dendríticas, pueden infectar  
40 (si no se replican en ellas) células de la mayoría de las especies animales, y pueden producirse en grandes cantidades en líneas celulares humanas apropiadas designadas para proporcionar el producto del gen E1 *in trans*.

El genoma de adenovirus está generalmente asociado a patologías benignas en seres humanos y la organización genómica del virus se ha estudiado bien desde su descubrimiento en los primeros años 50. Además, el genoma es susceptible de manipulación, dependiendo de la estrategia usada para construir el vector respectivo. Un virus de replicación incompetente (tal como un vector Ad5gag en el que se han eliminado E1/E3 que expresa un transgén gag del VIH, como se ejemplifica en el presente documento) requiere una línea celular que complementa las deleciones. Cualquier línea celular tal se puede usar para generar vectores virales recombinantes, con líneas celulares preferidas, pero no limitantes, que incluyen células 293 y células PER.C6<sup>TM</sup>. Para este fin, se han descrito numerosos vectores de  
50 adenovirus recombinantes de 1<sup>a</sup> generación en la bibliografía (por ejemplo, véase Bett, y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8802-8806; documentos WO 01/02607 y WO 02/22080). Los vectores adenovirales "Cobardes" son un vector adenoviral de 2<sup>a</sup> generación generalmente desprovisto de secuencias codificantes de proteínas víricas, frecuentemente con proteínas víricas suplementadas *in trans* por un virus coadyuvante (a menudo un adenovirus del que se ha eliminado E1) cultivado con el adenovector dependiente de adyuvante (HD) en una línea celular que lo envuelve (*por ejemplo*,  
55 PER.C6<sup>TM</sup>). Ausentes las proteínas virales, estos vectores virales pueden, con carácter alternativo, suplementarse *in trans* por una línea celular y/o "virus coadyuvante" capaz de expresar las proteínas adenovirales estructurales y funcionales necesarias para replicación, envoltura y rescate exitoso. En vista de la mayor popularidad de estos vectores virales y de la necesidad última para preparar cantidades a escala comercial bien de una vacuna basada en virus o bien de un vehículo de terapia génica, ha llegado a ser esencial para crear procedimientos económicos y escalables de producción y purificación.

Los primeros informes de purificación cromatográfica de adenovirus a pequeña escala se comunicaron en los últimos años 50 y en los primeros años 60 (por ejemplo, véase Klemperer y Pereira 1959, *Virology* 9: 536-545; Philipson, 1960, *Virology* 10: 459-465; Haruna, y col, 1961, *Virology*: 13 264-267), pero se reemplazaron por centrifugación  
65 en un gradiente de CsCl. En la última década la purificación cromatográfica de los adenovirus se ha comunicado de nuevo.

## ES 2 357 366 T3

La Patente de los Estados Unidos N.º 5,837,520 (véase también Huyghe y col., 1995, Human Gene Therapy 6: 1403-1416) revela un procedimiento de purificar adenovirus que comprende tratar el lisado celular con una nucleasa, seguida por (1) intercambio aniónico y (2) cromatografía de iones metálicos.

5 La Patente de los Estados Unidos 6,261,823 revela un procedimiento de purificar adenovirus que comprende someter una preparación vírica a cromatografía de intercambio aniónico seguida por cromatografía de exclusión por tamaño.

10 La Patente de los Estados Unidos 6,194,191 describe procedimientos de purificar adenovirus usando velocidades de perfusión baja durante el cultivo celular, una etapa de lisis por detergente, y/o una etapa de cromatografía individual.

Shabram y col., 1997 (Human Gene Therapy 8: 453-465) revela un procedimiento para medir la concentración de Ad5 con cromatografía de intercambio aniónico analítica.

15 A pesar de estas comunicaciones y otras, persiste la necesidad de desarrollar un procedimiento a gran escala para purificación de vectores virales generados dentro de sistemas de cultivo de células huésped que trate tanto los asuntos cuantitativos como los cualitativos que se imponen en una vacuna o producto de terapia génica comercializado.

### Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a procedimientos de purificar partículas virales. Pare este fin, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificar partículas de adenovirus a partir de una preparación de cultivo celular que comprende: a) lisar células dentro de la preparación de cultivo celular; b) aclarar lisado que contiene las partículas adenovirales; c) tratar el lisado aclarado con nucleasas; y d) someter el lisado tratado con nucleasas, aclarado a cromatografía de intercambio aniónico; en el que los tampones usados en la cromatografía de intercambio aniónico comprenden un tensioactivo no iónico. Un virus preferido para purificación por los procedimientos revelados en el presente documento es cualquier serotipo de adenovirus. El serotipo de adenovirus a purificar es bien una forma de tipo silvestre, una forma modificada o una forma recombinante del serotipo de adenovirus respectivo. La presente invención se ejemplifica, pero no significa que se limite a ello, por un procedimiento para purificar 5 partículas de vector de adenovirus recombinante, 6 partículas de vector de adenovirus y 35 partículas de vector de adenovirus. Otras partículas de vector de adenovirus para purificación por los procedimientos revelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, 26 partículas de adenovirus y 36 partículas de adenovirus.

35 El procedimiento de la presente invención puede incluir las siguientes etapas de procedimiento: (1) liberar partículas de virus a partir de células infectadas por una etapa de lisis tal como una etapa de lisis por detergente; (2) precipitación selectiva para eliminar un alto porcentaje de ácidos nucleicos contaminantes; (3) filtración en profundidad y/o centrifugación para eliminar restos celulares y precipitado de ácidos nucleicos; (4) ultrafiltración para reducir volumen e intercambio de tampón; (5) tratamiento de nucleasa para digerir los ácidos nucleicos que quedan y para facilitar eliminación; (6) cromatografía de intercambio aniónico para purificar virus de contaminantes celulares, componentes de virus no ensamblados y cápsides vacías; (7) ultrafiltración de flujo tangencial para eliminar adicionalmente contaminantes así como para introducir un tampón de formulación; (8) filtración estéril de la preparación del virus; (9) opcionalmente, incluyendo etapa(s) adicional(es) para purificar adicionalmente la preparación viral, tal como una etapa de cromatografía de intercambio iónico dinámico, una etapa de adsorción de fase inversa, y/o una etapa de cromatografía de hidroxapatita; y (10) opcionalmente, una etapa anterior a o en conjunción con cromatografía de intercambio aniónico que es una etapa de filtración para eliminar partículas anterior a cargar en la columna de cromatografía de intercambio iónico. La Tabla 1 esboza paso a paso un procedimiento de purificación de AdV a modo de ejemplo.

50 La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar virus de tipo silvestre o recombinante, especialmente adenovirus de tipo silvestre o recombinante, en el que una o más etapas del procedimiento ejemplificado (véase Tabla 1) se omiten. Una omisión la puede usar el técnico sobre la base de una mezcla o de una combinación con el fin de generar un protocolo completo para purificación de adenovirus que es cualitativamente aceptable y se formula a una concentración susceptible de aplicaciones clínicas y/o comerciales. Cualquier procedimiento modificado preferentemente, pero no necesariamente, incluye al menos las siguientes etapas: (1) lisis celular; (2) precipitación selectiva de DNA; (3) aclarado; (4) una etapa de concentración (con un tratamiento de nucleasa); con la etapa adicional de (5), que es una etapa de intercambio aniónico, en cualquier orden razonable que da como resultado la recuperación de las cantidades de calidad comercial de adenovirus.

60 La presente invención se refiere adicionalmente a incorporación de metodología más adelante en el procedimiento adicional después de las etapas 1-5 tratadas en los párrafos anteriores para incluir una o más, y en cualquier combinación y/u orden razonable, de una etapa de ultrafiltración, una etapa de filtración para eliminar particulados antes de cargar sobre una columna de intercambio aniónico, una etapa de cromatografía alternativa u ortogonal (que incluye pero no se limita a una etapa de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxapatita, y/o a etapas de cromatografía de adsorción en fase inversa (por ejemplo, usando Amberlita XAD)), y/o una etapa de filtración estéril.

65 Por lo tanto, la metodología revelada en el presente documento cumple con la necesidad de un esquema de purificación vírica que es susceptible de requerimientos de producción comercial, a gran escala. Los procedimientos descritos en el presente documento son especialmente útiles en el campo de vacunas génicas/terapia génica para superar muchos

## ES 2 357 366 T3

defectos de los procedimientos conocidos de purificación viral. Como se destaca por toda esta memoria descriptiva, los procedimientos descritos en el presente documento dan como resultado preparaciones de adenovirus concentradas con cantidades despreciables de contaminación de DNA. Se prefiere que las preparaciones de adenovirus de la presente invención contengan adenovirus a al menos  $1 \times 10^{11}$  pv/ml y preferentemente a más de  $1 \times 10^{12}$  pv/ml, teniendo mientras una célula huésped residual de al menos de 100 picogramos/ $10^{11}$  pv, o adicionalmente menos de 30 picogramos/ $10^{11}$  pv, preferentemente menos de 10 picogramos/ $10^{11}$  pv y lo más preferentemente menos de 5 picogramos/ $10^{11}$  pv.

Aún otro objeto de la presente invención se ejemplifica como un procedimiento de purificar adenovirus, que incluye, pero no necesariamente requiere cada una de las siguientes etapas de procedimiento: (1) liberar partículas de virus a partir de células infectadas por una etapa de lisis tal como una etapa de lisis por detergente; (2) precipitación selectiva para eliminar un alto porcentaje de ácidos nucleicos contaminantes; (3) filtración y/o centrifugación en profundidad para eliminar restos celulares y precipitado de ácidos nucleicos; (4) ultrafiltración para reducir volumen e intercambio de tampón; (5) tratamiento de nucleasa para digerir los ácidos nucleicos que quedan y para facilitar eliminación; (6) cromatografía de intercambio aniónico para purificar virus de contaminantes celulares, componentes de virus no ensamblados; (7) ultrafiltración de flujo tangencial para eliminar adicionalmente contaminantes así como para introducir un tampón de formulación; (8) filtración estéril de la preparación del virus; (9) opcionalmente, incluir etapa(s) adicional(es) para purificar adicionalmente la preparación viral, tales como una etapa de cromatografía de intercambio catiónico dinámico, una etapa de adsorción de fase inversa, y/o una etapa de cromatografía de hidroxipatita; y (10) opcionalmente, una etapa anterior a o en conjunción con cromatografía de intercambio aniónico que es una etapa de filtración para eliminar partículas anteriores a cargar en la columna de cromatografía de intercambio aniónico.

La Tabla 1 esboza un procedimiento de purificación de Ad ejemplificado, paso a paso, en el que la combinación y/o el orden de las etapas de procedimiento respectivas pueden ser susceptibles de purificarse por el técnico.

Como se usa en el presente documento, "pv" se refiere a - partícula viral -.

Como se usa en el presente documento, "AEX" se refiere a - cromatografía de intercambio aniónico -.

Como se usa en el presente documento, "CEX" se refiere a - cromatografía de intercambio catiónico -.

Como se usa en el presente documento, "TFF" se refiere a - filtración de flujo tangencial -.

Como se usa en el presente documento, "TNBP" se refiere a -fosfato de tri-n-butilo -.

Como se usa en el presente documento, "CPC" se refiere a - cloruro de cetilpiridinio -.

Como se usa en el presente documento "DB" se refiere a - bromuro de domifeno -.

Como se usa en el presente documento "CTAB" se refiere a - bromuro de cetiltrimetilamonio-.

Como se usa en el presente documento, "BTC" se refiere a - cloruro de bencetonio -.

Como se usa en el presente documento "TTA" se refiere a - cloruro de tetradeciltrimetil-amonio -.

Como se usa en el presente documento "PS-80" se refiere a - polisorbato 80 -.

Como se usa en el presente documento "SPA" hace referencia a - agente de precipitación selectiva -. Un agente de precipitación selectiva se define en el presente documento como cualquier agente, compuesto o tal que, cuando se añade a una preparación que contenga una población de virus, tales como adenovirus, y moléculas contaminantes de ácidos nucleicos, afectará la precipitación selectiva de una cantidad sustancial de moléculas de ácido nucleico contaminantes desde el virus respectivo.

Como se usa en el presente documento, el término "adenovirus" o "Ad" o "AdV" hace referencia a cualquier adenovirus, incluyendo pero no limitado a cualquier serotipo de adenovirus que es un virus de tipo silvestre, un virus modificado (tal como un virus atenuado), y/o un virus recombinante, tal como cualquier serotipo de adenovirus que es, por ejemplo, un virus recombinante de 1ª o 2ª generación que puede o no puede contener uno o más transgenes heterólogos insertados dentro del vector de adenovirus recombinante respectivo.

Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" o "línea celular huésped" se refiere a cualquier línea celular de mamífero que mantiene replicación de un virus respectivo, tal como un adenovirus de tipo silvestre, modificado o recombinante. Se reconocerá que cualquiera de tales líneas de células huésped se hace crecer en cultivo a una fase de crecimiento conocida de la técnica, seguida por infección con una reserva de simiente del virus respectivo, seguida después por cultivo adicional en condiciones fisiológicamente aceptables, que da como resultado la producción de una población de virus adicional, que puede recogerse por los procedimientos descritos en el presente documento.

**Breve descripción de las figuras**

Figura 1 muestra un ejemplo de cromatografía de intercambio aniónico preparativo (AEX). La alimentación se ajustó a aproximadamente 38 ms/cm y se cargó sobre Source 15Q. La columna se lavó con 5 volúmenes de HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 0,39 M, PS-80 al 0,1%, pH 7,5 y un gradiente lineal se llevó a cabo a NaCl 0,47 M.

Figuras 2A, 2B y 2C muestran resultados de cromatogramas de ensayos de intercambio aniónico a partir de la etapa de cromatografía AEX preparativa. (A) alimentación; (B) flujo a través de la columna; (C) reserva de producto. Las identificaciones de pico son como sigue: 1 minuto - impurezas misceláneas, PS-80; 7 minutos - proteína hexón; 11 minutos - partículas AdV; 16 minutos-ácido nucleico.

Figura 3 muestra un perfil de intercambio aniónico preparativo para el Ejemplo 2. Se muestran carga, lavado y elución.

Figura 4 muestra perfiles de precipitación de adenovirus para detergentes catiónicos BTC, DB, CTAB, CPC y TTA.

Figura 5 muestra perfiles de precipitación de DNA para detergentes catiónicos BTC, DB, CTAB, CPC y TTA.

Figura 6 muestra diversas capacidades para filtración en profundidad de CE-25 y DE-45 en diversas condiciones de mezclado.

Figura 7 muestra un análisis de SDS-PAGE de un procedimiento de purificación de adenovirus paso a paso (MR-KAd5gag) a partir de un cultivo de 300 litros de células. La carga se normalizó a 6,34E9 pv.

Figura 8 muestra análisis de la proteína del gel SDS-PAGE en el intermedio de producto de intercambio aniónico (AEP) para tres preparaciones intermedias de adenovirus ejemplificados. Todas las muestras se cargaron en 1,19e10 total pv. Carril (1) Marcadores de peso molecular; (2) 0112A; (3) 0112C; (4) 0114; (5) 0113A1; (6) 0113A2; (7) 0113A3; (8) 0113B; (9) 0113C; (10) 0113D.

Figura 9 muestra tiempos de separación para diversos serotipos de adenovirus recombinantes (Ad5, Ad24 y Ad35) por cromatografía de intercambio aniónico.

Figura 10 muestra el efecto de la concentración de bromuro de domifeno en diversos serotipos de adenovirus recombinantes y de DNA de cada virus recombinante respectivo.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a los procedimientos de partículas víricas purificadoras de un lisado celular.

Mientras que cualquier número de virus de tipo silvestre o virus modificados y/o vectores víricos recombinantes pueden ser susceptibles a esta metodología, un virus preferido es un adenovirus de tipo silvestre o modificado o un vector adenoviral recombinante, ejemplificado en el presente documento con un vector de adenovirus recombinante de serotipo 5, 6 y 35. Un virus preferido para purificación es cualquier adenovirus de tipo silvestre, modificado, mutado y/o recombinante (de nuevo, véase *Fundamental Biology*, 3ª Ed., Fields, B.N., Knipe, D.M. y Howley, P.M., Ed., en el capítulo 30, páginas 979-1016 (1996)). La presente invención se refiere en parte a un procedimiento de purificación en el que una etapa de post-lisis incluye una etapa de precipitación selectiva por inclusión de un agente de precipitación selectiva, que es preferentemente un detergente catiónico, que retira de forma efectiva la mayoría de las moléculas de ácido nucleico, así como otros restos celulares. La metodología de la presente invención da como resultado la recuperación de cantidades comercialmente viables de vector de adenovirus con características de pureza excelentes, haciendo esta metodología especialmente útil para la carga y la distribución de las vacunas con base adenoviral o los productos de terapia génica con base adenoviral. La presente invención se refiere a procedimientos de obtener virus purificados a partir de instalaciones de producción a gran escala que incluyen, en un aspecto preferido, una combinación de precipitación, filtración en profundidad y/o centrifugación, ultrafiltración, digestión por nucleasas y cromatografía para producir de forma sólida y económica producto altamente purificado. Los niveles de DNA de la célula huésped están de forma constante por debajo de 5 pg/10<sup>11</sup> pv cuando se usan los procedimientos de la presente invención como se ejemplifican en la Tabla 1. Será evidente para el técnico que una medida del contenido en DNA de célula huésped no se entiende para remitirse como una limitación para esta metodología. En cambio, estos datos respaldan la esencia de la presente invención: una metodología a gran escala para la generación de partículas virales que da como resultado un producto altamente purificado que se puede usar en ajustes clínicos y comerciales. Puede destacarse que la importancia de lograr niveles de DNA particulares en el producto final es específica de producto. Los productos para uso parenteral en seres humanos requerirán los estándares más restrictivos pero, incluso en ese caso, las metas pueden variar de 100 pg/dosis hasta 10 ng/dosis ("WHO Requirements for the Use of Animal Cells as *in vitro* Substrates for the Production of Biologicals (Requirements for Biological Substances N.º 50), WHO Technical Report Series, N.º 878, 1998) o más altas, y son probablemente para ajustarse dependiendo de la indicación del producto.

Además, para productos basados en adenovirus, la dosificación en general puede variar por encima de varios órdenes de magnitud. Por lo tanto, no hay trascendencia específica de lograr niveles de DNA residuales específicos más adelante (tales como más adelante 5 pg/10<sup>11</sup> pv) y, en la mayoría de las aplicaciones, las variaciones de varias

veces aproximadamente lote a lote no es probable que sean importantes. Por lo tanto, como se destaca anteriormente, se prefiere que las preparaciones de adenovirus de la presente invención contengan adenovirus a al menos  $1 \times 10^{11}$  pv/ml y preferentemente a más de  $1 \times 10^{12}$  pv/ml, teniendo mientras una célula huésped residual de al menos menos de 100 picogramos/ $10^{11}$  pv, o adicionalmente menos de 30 picogramos/ $10^{11}$  pv, preferentemente menos de 10 picogramos/ $10^{11}$  pv y lo más preferentemente menos de 5 picogramos/ $10^{11}$  pv.

La Tabla 1 esboza un procedimiento de purificación ejemplificado, paso a paso. Como se destaca en el presente documento, una opción adicional para el procedimiento descrito en el presente documento es la adición de una etapa de filtración anterior a o en conjunción con cromatografía de intercambio iónico. Es posible que en ciertos casos (que podrían depender de los componentes particulares del medio de cultivo así como de las propiedades tanto de la línea de producción celular como del producto), particulados pequeños o “agregados” pueden bien pasar a través de la etapa de aclarado primario o bien formarse durante el tratamiento con nucleasas o durante la ultrafiltración, en particular la ultrafiltración incorpora una etapa de concentración. En este caso, se contempla una etapa de filtración adicional para eliminar estos particulados antes de cargar sobre la cromatografía de intercambio aniónico. El filtro podría situarse en línea durante la carga de la columna, o podría usarse en una operación independiente. La filtración se llevaría a cabo generalmente usando filtros de cápsula o de cartucho disponibles. Estos filtros en línea podrían bien estar basados en la profundidad o bien estar basados en membranas. Los medios en estos filtros podrían ser polipropileno, celulosa, ésteres de celulosa, fluoruro de polivinilideno modificado, nylon, polietersulfona, o cualquier otro material que sea consistente con unión a producto baja, además, todos estos medios podrían estar presentes con o sin agentes modificadores tales como tierra de diatomeas y/o resinas para incrementar propiedades de filtro. El tamaño nominal de un filtro tal estaría entre 0,2 micrómetro y 1 micrómetro.

La presente invención se refiere así a la metodología que resulta en la purificación de partículas vectores de adenovirus a partir de instalaciones de producción a gran escala que producen cantidades comercialmente adecuadas de virus recuperado así como también muestran excelentes características de pureza. El término “gran escala” tal como se usa en el presente documento se considera que es volúmenes de cultivo de células huésped totales de más de aproximadamente 10 litros hasta aproximadamente 50.000 litros, con funcionamientos de aproximadamente 300 litros a aproximadamente 20.000 litros siendo la norma.

En un aspecto a modo de ejemplo de la presente invención, una combinación de lisis celular, precipitación con un SPA, filtración en profundidad y/o centrifugación, ultrafiltración, digestión con nucleasas y etapas de cromatografía se usan para producir de forma sólida y económica producto altamente purificado, dando como resultado niveles de DNA de células huésped residuales a menos de niveles detectables cuando se usa un ensayo de Q-PCR para DNA de células huésped. Una etapa de lisis inicial proporciona liberación máxima de adenovirus intracelular de las células huésped y proporciona un potencial para inactivar agentes adventicios potenciales (en particular, virus con envoltura tales como herpesvirus o retrovirus) que podrían contaminar hipotéticamente el cultivo celular a un nivel bajo.

Como se ha indicado anteriormente, una primera etapa de lisis de células infectadas permite cosechar tanto virus asociados a células (intracelulares) como virus no asociados a células (extracelulares) del medio de cultivo de células huésped. Como resultado, ello proporciona flexibilidad en la selección de las condiciones de cultivo que son óptimas para productividad de virus general. Además, la presencia de detergente por todo el procedimiento minimiza la asociación del virus con el DNA de la célula huésped. La lisis de detergente de células huésped, aunque es el procedimiento preferido de lisar células huésped que contengan AdV, se puede reemplazar por procedimientos de lisis no mecánica susceptibles de procedimientos de purificación a gran escala (tales como tratamiento de enzimas) y/o procedimientos de cizallamiento mecánico (tales como ultrafiltración de fibras huecas) para liberar cantidades máximas de adenovirus. Cualquier componente de lisis celular susceptible de introducción dentro de un sistema biológico tal como protocolo de terapia génica o de purificación por vacuna se puede usar para lisar las células huésped infectadas, a saber se contempla un detergente o enzima conocido en la técnica para ser útil en aplicaciones biológicas, incluyendo pero no limitado a detergentes Tritón y/o Polisorbato-80. Además, un disolvente tal como TNBP se puede añadir al lisado o al lisado aclarado a concentraciones bajas (por ejemplo al 0,3%) para complementar a estos detergentes en su capacidad para inactivar los virus con cubierta. Además, la autólisis de las células huésped infectadas puede proporcionar liberación sustancial de virus intracelular. Por lo tanto, cualquier forma de lisis celular de que se conoce en la técnica se puede usar para liberar virus intracelulares dentro del medio de cultivo para recogida eventual por los procedimientos revelados en el presente documento.

Tras la lisis, el DNA puede precipitarse de forma selectiva por adición de una solución de SPA concentrada dejando mientras el adenovirus en la fase líquida. Esta etapa tiene en cuenta la precipitación selectiva de DNA de células huésped y también incrementa la solidez en la parte posterior del proceso. Como se ejemplifica en el presente documento, esta etapa de precipitación temprana da como resultado una reducción de aproximadamente el 90% en ácidos nucleicos tras aclarado.

Aunque los autores de la presente invención no se comprometen con ninguna teoría, se cree que la adición de un SPA tras la lisis celular da como resultado los grupos cargados positivamente (y los anillos aromáticos, si están presentes) en los compuestos que se unen a los grupos fosfato cargados negativamente (y a los pares de bases) en las moléculas de DNA. Las colas hidrófobas en los detergentes interactúan después unas con otras dando como resultado precipitación. Los resultados experimentales descritos en el presente documento mostraron que las moléculas de DNA tienen afinidad más alta para los SPA que para los adenovirus, por lo tanto las moléculas no interaccionarán con el adenovirus hasta que la concentración de DNA en la fase líquida sea baja. Las micelas mezcladas también propor-

## ES 2 357 366 T3

cionan mayor solidez. Este mecanismo proporciona la selectividad requerida durante la precipitación. Los SPA que pueden ser útiles en poner en práctica la invención descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de amina, compuestos de amino cuaternario y cualesquiera mezclas respectivas de los mismos. Mezclas de SPA proporcionan actuación similar a SPA puros mientras que incorporan mecanismos de precipitación múltiples (es decir sitios de unión primarios). Se puede añadir una mezcla de SPA al lisado celular según el tampón de precipitación o se puede incorporar según una metodología de adición de corte alto/de corte bajo. Más específicamente, las muchas formas de polietileno imina (PEI) han mostrado ser muy efectivas en neutralización de carga aniónica en exceso (impurezas de DNA), especialmente en condiciones de pH ácidas y neutrales. Teóricamente, los copolímeros que tienen masa molecular relativamente alta pueden ser igual de eficientes.

Los compuestos de amonio cuaternario de las siguientes siete clases han sido los más beneficiosos para la presente invención. Éstos incluyen pero no se limitan a las siguientes clases y ejemplos de productos comercialmente aceptables: sales de monoalquiltrimetilamonio (ejemplos de productos comercialmente disponibles incluyen bromuro de cetiltrimetilamonio o cloruro de cetiltrimetilamonio como CTAB, bromuro de tetradeciltrimetilamonio o cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTA), cloruro de alquiltrimetilamonio, cloruro de alquiariltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio o cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodecildimetil-2-fenoxietilamonio, hexadecilamina: sal de cloruro o de bromuro, dodecilamina o sal de cloruro, y bromuro o cloruro de cetildimetilamonio), sales de monoalquildimetilbencilamonio (ejemplos incluyen de cloruros de alquildimetilbencilamonio y cloruro de bencetonio como BTC), sales de dialquilmetilamonio (productos comerciales incluyen bromuro de domifeno como DB, haluros de didecilmetilamonio, y cloruro o bromuro de octododecilmetilamonio), sales de amonio heteroaromáticas (los productos comerciales incluyen haluros de cetilpiridinio (CPC o sal de bromuro y bromuro o cloruro de hexadecilpiridinio), isómero cis de 1-[3-cloroalil]-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantano, bromuro de alquilisoquinolinio y cloruro de alquildimetilnaftilmetilamonio (BTC 1110)), sales de amonio cuaternario polisustituídas, (los productos comercialmente disponibles incluyen, pero no se limitan a, sacarinato de alquildibencilamonio y ciclosulfamato de alquildimetiletilbencilamonio), sales de amonio biscuaternario (los ejemplos de producto incluyen 1,10-bis(cloruro de 2-metil-4-aminoquinolinio)-decano, hexano de 1,6-bis{1-metil-3-(2,2,6-trimetilciclohexil)-propildimetilamonio} o cloruro de triclobisonio y el bis-quat se refieren como CDQ por Buckman Brochures) y sales de amonio cuaternario polimérica (incluye poliionenos tales como dicloruro de poli[oxietileno(dimetiliminio)etileno(dimetiliminio)etileno], dicloruro de poli[N-3-dimetilamonio)propil]N-[3-etilneoxietileno(dimetilamonio)propil]urea y alfa-4-[cloruro de 1-tris(2-hidroxietil)amonio]).

El lisado celular tratado con SPA se aclara por filtración en profundidad para eliminar impurezas precipitadas y restos celulares. La centrifugación con o sin filtración en profundidad refinándola también es factible. Por lo tanto, el aclarado del lisado precipitado se puede llevar a cabo usando centrifugación sola, o usando centrifugación en tándem con una etapa de aclarado refinándola tal como filtración en profundidad. Para volúmenes mayores de líquido (mayores de aproximadamente 50 l), se prefiere la centrifugación continua sobre los procedimientos por lotes. La centrifuga continua puede tener un diseño tubular, como en el CARR Powerfuge, o de disco, como en el Westfalia CSA-1, si bien otros fabricantes y modelos probablemente están siendo satisfactorios. En general, los tiempos de residencia y la fuerza centrífuga requerida se impondrán por la eficiencia del equipamiento individual así como la distribución de tamaños en el precipitado y la metodología para seleccionar condiciones apropiadas para eliminar precipitado pero ningún adenovirus será patente para cualquiera experto en la técnica. El Ejemplo 15 muestra el uso de centrifugación continua seguida por una filtración en profundidad de refinado. El uso de centrifugación continua se prefiere en aplicaciones donde la densidad celular es alta (por ejemplo, retroalimentación o cultivo por perfusión) y/o cuando los volúmenes son muy grandes (más grandes que 1000 l). El lisado celular aclarado se concentra después según sea apropiado (dependiendo de la masa celular y de la productividad del cultivo del adenovirus, con 10-20 veces siendo típicas de los procedimientos de lote simples), tratado con nucleasa y sometido a diafiltración. La combinación de la precipitación y el aclarado retira aproximadamente el 90% del DNA total y, dependiendo de las afecciones de ultrafiltración/tratamiento con nucleasa, la pureza de esta corriente puede ser suficiente para muchas aplicaciones.

Se ejemplifica en el presente documento y se prefiere que una etapa de precipitación selectiva tenga lugar en la primera etapa después de la lisis celular. Sin embargo, esta preferencia no es de ninguna manera una limitación, ya que una etapa de precipitación selectiva puede insertarse en otras fases de los procedimientos de purificación para eliminar mejor moléculas de ácidos nucleicos residuales y restos celulares a partir de un lisado de células tamponadas o solución tampón que contiene Ad de fase avanzada. Por ejemplo, la precipitación de detergentes puede situarse alternativamente después del aclarado o la ultrafiltración (concentración/diafiltración) con la adición de un aclarado subsiguiente. El aclarado adicional puede tomar cualquiera de varias formas incluyendo filtración en profundidad o filtración de membrana.

Se puede contemplar una etapa de filtración para eliminar restos celulares y precipitado de ácidos nucleicos. Esta etapa proporciona un medio conveniente para eliminar económicamente restos celulares y precipitado celular. Al elegir un filtro o un esquema de filtro fue necesario asegurar una actuación sólida en caso de que se produzcan cambios o variaciones corriente arriba. Mantener el equilibrio entre buena actuación de aclarado y rendimiento de etapa requiere investigar una amplia diversidad de tipos de filtro con medios internos variantes. Los filtros adecuados pueden usar filtros de celulosa, fibras de celulosa regeneradas, fibras de celulosa combinadas con coadyuvantes de filtros inorgánicos (por ejemplo tierra de diatomeas, perlita, sílice ahumado), fibras de celulosa combinadas con coadyuvantes de filtro inorgánico y resinas orgánicas, o cualquier combinación de las mismas, y fibras poliméricas (ejemplos incluyen pero no se militan a nylon, polipropileno, polietersulfona) para lograr eliminación efectiva y recuperaciones de virus

## ES 2 357 366 T3

aceptables. En general, es preferible pero no se requiere un procedimiento de fases múltiples. Un procedimiento de dos o tres fases ejemplar consistiría en filtro(s) tosco(s) para eliminar precipitado grande y restos celulares seguido(s) por filtros(s) de segunda fase de refinado con tamaños de poro nominales mayores de 0,2 micrómetros pero de menos de 1 micrómetros. La combinación óptima será una función de la distribución por tamaño de precipitado así como de otras variables. Además, operaciones de fase individual que usan un filtro relativamente estrecho o que usan centrifugación pueden producir también un producto de buena calidad. Más generalmente, cualquier aproximación de aclarado incluyendo filtración en línea, microfiltración, centrifugación, o suministro de coadyuvantes de filtro (por ejemplo tierra de diatomeas) en combinación con filtración en línea o con filtración en profundidad, que proporcione un filtrado de claridad adecuada para obstruir la membrana y/o resina en las etapas subsiguientes, será aceptable para practicar dentro de la presente invención.

La filtración en profundidad o las filtraciones en profundidad en combinación con centrifugación han sido los procedimientos más sólidos de aclarado para la presente invención. Éstos incluyen pero no se limitan a los siguientes ejemplos de productos comercialmente aceptables: filtros en profundidad de la serie AP de CUNO Incorporated (los ejemplos incluyen AP01), filtros en profundidad de la serie CP de CUNO Incorporated (los ejemplos incluyen CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), filtros en profundidad de serie HP Incorporated de CUNO (los ejemplos incluyen HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), filtros en profundidad de la serie CA de CUNO Incorporated (los ejemplos incluyen CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), filtros en profundidad de la serie SP de CUNO Incorporated (los ejemplos incluyen SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90), filtros Delipid y Delipid Plus de CUNO, filtros en profundidad de serie CE de Millipore Corporation (los ejemplos incluyen CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75), filtros en profundidad de serie DE de Millipore Corporation (los ejemplos incluyen DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE55, DE560, DE65, DE70, DE75), filtros de serie Millipore Corporation HC (los ejemplos incluyen A1HC, B1HC, COHC), Filtros de CUNO Polynet (un ejemplo incluye Polynet-PB), filtros de Millipore Clarigard y de Polygard, filtros de CUNO Life Assure, filtros en profundidad de ManCel Associates (los ejemplos incluyen pero no se limitan a PR 12 UP, PR12, PR 5 UP) y filtros de PALL o Incorporados de SeitzSchenk (los ejemplos incluyen pero no se limitan a Bio20, SUPRA EKIP, KS-50P).

Un aspecto adicional de los procedimientos descritos son una serie de etapas para concentrar el Adenovirus, añadir un tratamiento de nucleasa adicional (por ejemplo Benzonasa<sup>TM</sup>, EM Industries) e introducir un tampón de intercambio por medio de diafiltración. El tamaño de membrana seleccionado permite la eliminación de proteínas estructurales de virus no ensambladas, detergente y nucleasa. La adición de Benzonasa<sup>TM</sup> no se requiere para derivar un producto que es altamente puro por HPLC de intercambio aniónico pero conduce a niveles de DNA residuales más bajos al final de esta etapa y presumiblemente en el producto purificado final.

La membrana de ultrafiltración particular será de un tamaño suficientemente pequeño para retener adenovirus pero lo suficientemente grande para quitar impurezas de forma efectiva. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, los límites de peso molecular nominales (NMWCO) entre 100 y 1000 kDa pueden ser apropiados. La composición de membrana puede ser, pero no está limitada a, celulosa regenerada, polietersulfona, polisulfona, o derivados de las mismas. Estas membranas pueden ser láminas planas o fibras huecas. Se prefiere ultrafiltración que usa modo de flujo tangencial. Las pantallas favorecedoras de turbulencias pueden ser también útiles para optimizar la eliminación de impurezas. En una realización preferida, membranas de láminas planas de NMWCO PES de 300 kDa o de 500 kDa con una pantalla promotora de turbulencias (por ejemplo Millipore Pellicon 2 Biomax con pantalla C) se usan en modo de flujo tangencial. En modo de flujo tangencial, la etapa puede controlarse ajustando un flujo cruzado fijo con o sin resistencia en el retorno retenido, ajustando una presión transmembrana fija, o fijando tanto el flujo cruzado como el flujo permeable.

El factor de concentración señalado como objetivo durante la ultrafiltración será una función de las condiciones de cultivo, incluyendo el medio usado, la densidad celular y la productividad viral. Para el cultivo de lote con densidad celular de infección de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml, se prefiere concentración de 5 a 40 veces; se prefiere especialmente concentración de 10 y 25 veces.

El tratamiento de nucleasas puede incluir el uso de una nucleasa de amplio espectro (por ejemplo Benzonasa<sup>TM</sup>, una DNasa, una RNasa, o cualquier combinación de las mismas.

Se prefiere una nucleasa o cóctel con las dos y con actividad DNasa.

Se puede contemplar una etapa de tratamiento con nucleasas en cualquier punto del procedimiento, así como un contenido de nucleasas residuales en el producto final es aceptable para la aplicación. Se prefiere que el tratamiento con nucleasas tenga lugar después del aclarado y se prefiere especialmente que el tratamiento con nucleasas tenga lugar después del aclarado y de una etapa de concentración, pero antes de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Una manifestación útil del procedimiento tiene en cuenta el tratamiento con nucleasas en el aparato de ultrafiltración después de la concentración. La permeación se puede detener temporalmente durante una incubación de duración apropiada y después se puede reiniciar para diafiltración.

La diafiltración en un tampón usando ultrafiltración puede ser deseable. En la mayoría de las aplicaciones, algunos volúmenes de lote de tampón se usarán para asegurar el intercambio completo. Si la corriente se carga en una columna de intercambio aniónico, se prefiere la diafiltración en un tampón con pH entre 6,5 y 8,0, aunque no se requiere.

## ES 2 357 366 T3

Más específicamente, la diafiltración en HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5, con detergente para evitar agregación (tal como PS-80 al 0,1%), puede ser apropiada.

5

TABLA 1

10

Suspensión Celular de Biorreactor



Lisis de Tritón



15

Precipitación selectiva



20

Filtración en Profundidad



25

Ultrafiltración/Tratamiento con Nucleasa



Ultrafiltración por Cromatografía de Intercambio Aniónico



30

Filtración Estéril

Como se pone de relieve por toda esta memoria descriptiva y como se muestra en la Tabla 1, se incluye una etapa de cromatografía de intercambio iónico. Para purificación con adenovirus de tipo 5 con Source 15Q, la concentración de NaCl para cargar y lavar podría estar presumiblemente en cualquier punto entre 0,33 y 0,41 M a pH 7,5 y variaría a pH alternativos. El pH de los tampones necesita ser suficientemente alto para unir a los adenovirus (mayor que aproximadamente 6,5). Además, el pH del sistema de tampón sería también suficientemente bajo para evitar la inestabilidad viral. El pH máximo preciso que puede usarse dependerá del perfil de estabilidad específica del serotipo de adenovirus y de los componentes del tampón y puede determinarse fácilmente por el técnico para esa aplicación particular. Como una guía y ciertamente no como una limitación, un intervalo de pH de Ad5 podría variar potencialmente desde aproximadamente 6-10, con niveles preferidos de 6,5-9 e incluso más preferidos de 6,5-8,0. La presencia de PS-80 al 0,1% en los tampones es crítica para lograr niveles de DNA residuales bajos en el producto debido a que ello atenúa la asociación virus/DNA y la agregación de virus. Estará dentro del reino de la experimentación de rutina para el técnico experto establecer concentraciones más altas o más bajas de detergente o establecer detergentes alternativos que serían útiles para promover la disociación de las partículas virales de otros virus así como de diversos contaminantes celulares. También está dentro del mismo reino de experimentación el que el técnico pueda elegir un detergente alternativo para el tampón del procedimiento. Como un ejemplo, pero no significando de ningún modo una limitación, los tensioactivos no iónicos que podrían usarse potencialmente para inhibir agregación en intercambio aniónico y durante todo el procedimiento incluyen ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán, incluyendo pero no limitados a Polisorbato-80 (Tween 80<sup>®</sup>) [como se ejemplifica en el presente documento], Polisorbato-60 (Tween 60<sup>®</sup>), Polisorbato-40 (Tween 40<sup>®</sup>) y Polisorbato-20 (Tween 20<sup>®</sup>), éteres de alquilo de polioxietileno, incluyendo pero no limitados a Brij 58<sup>®</sup>, Brij 35<sup>®</sup>, así como otros tales como Tritón X-100<sup>®</sup>, Tritón X-1140<sup>®</sup>, NP40<sup>®</sup>, Span 85 y la serie Plurónica de tensioactivos no iónicos (por ejemplo Pluronic 121). De éstas, se prefiere la serie de Polisorbatos. Se describe en el presente documento que una resina tal como una resina Source 15Q (Amersham Biosciences) tiene una capacidad extraordinariamente alta para adenovirus que se pueden usar de forma efectiva debido a la inhibición de agregación. Los casos que se conocen y la técnica conocida parecen indicar que las cargas bajas (< 1 x 10<sup>12</sup> pv/ml de resina) son la norma industrial. Para Source 15Q, se prefieren las columnas con alturas de lecho en exceso de 5 cm cuando el diámetro de la columna excede de 10 cm. Las columnas con alturas entre 10 y 25 cm trabajan especialmente bien. Aunque no se requiera, es preferible implementar una estrategia que fraccione el pico de producto principal de impurezas cromatográficamente relacionadas, por ejemplo, usando un valor límite para absorbancia de UV. Otras resinas que son adecuadas para purificación de adenovirus en este procedimiento incluyen pero no se limitan en modo alguno a Source 30Q (Amersham Biosciences), Fractogel TMAE (EM Industries) y Q-Sepharosa XL (Amersham Biosciences). Cualquier intercambiador aniónico sería usable, otros que han demostrado los autores de la presente invención incluyen Fractogel DEAE (EM Industries), Q-Hyper D/F (Biosepra), Toyopearl DEAE-650M (Tosohaas), Toyopearl DEAE-750C (Tosohaas), y Toyopearl QAE-550C (Tosohaas). Además, los productos de cromatografía de membrana de intercambio iónico tales como aquellos producidos por Pall (por ejemplo serie Mustang<sup>TM</sup>) y Sartorius (por ejemplo serie Sartobind) son adecuados para purificación de adenovirus.

En cualquier realización particular de la presente invención, el producto de intercambio iónico puede diafiltrarse en cualquier realización particular de la presente invención, el producto de intercambio iónico puede diafiltrarse en tampón de formulación y filtrarse de forma estéril. Alternativamente, una etapa de cromatografía adicional (por ejemplo, intercambio catiónico) puede añadirse bien antes o bien después de la diafiltración con el potencial para incrementar la solidez de eliminación de impurezas y/o de virus/priones. La ultrafiltración de flujo tangencial es útil en eliminar proteína residual y ácido nucleico residual y en intercambiar el virus en un tampón de formulación. Esta etapa proporciona control de PS-80 y puede proporcionar eliminación de las impurezas residuales incluyendo DNA, detergentes residuales y proteínas de las células huéspedes. La presencia de PS-80 en la alimentación y en el tampón de diafiltración minimiza el potencial de agregación de productos. El control de flujo es importante para la reducción efectiva de PS-80 en presencia de concentraciones de adenovirus altas. La elección entre membranas de 300 kD y de 500 kD está dictada por las soluciones de compromiso entre el rendimiento y la eliminación de impurezas incrementada. Otras configuraciones de membrana (tales como una fibra hueca) son sustitutos aceptables. Más generalmente, la selección de condiciones para esta ultrafiltración es similar a aquella descrita antes. Es decir, la membrana de ultrafiltración particular seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño para retener adenovirus pero lo suficientemente grande para eliminar impurezas de forma efectiva. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, los límites de peso molecular nominales (NMWCO) entre 100 y 1000 kDa pueden ser apropiados. La composición de membrana puede ser, pero no está limitada a, celulosa regenerada, polietersulfona, polisulfona, o derivados de las mismas. Estas membranas pueden ser láminas planas o fibras huecas. Se prefiere ultrafiltración que usa modo de flujo tangencial. Las pantallas promotoras de turbulencias pueden ser también útiles para optimizar la eliminación de impurezas. En una realización, membranas de láminas planas de NMWCO PES de 300 kDa o de 500 kDa con una pantalla promotora de turbulencias (por ejemplo Millipore Pellicon 2 Biomax con pantalla C) se usan en modo de flujo tangencial. En modo de flujo tangencial, la etapa puede controlarse ajustando un flujo cruzado fijo (con o sin resistencia en el retorno retenido), ajustando una presión transmembrana fija, o fijando tanto el flujo cruzado como el flujo permeable. Se prefiere controlar el flujo cruzado y el flujo permeable. El tampón de diafiltración particular elegido sería un tampón de formulación apropiado (véase documento WO 0166137) o un subgrupo de componentes deseados. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a (1) Tris 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 8,0, (2) Tris 10 mM, Histidina 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 7,4, (3) Tris 5 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 7,4 y (4) Tris 10 mM, Histidina 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,02%, EDTA 0,1 mM, etanol al 0,5% (v/v), pH 7,4.

Se puede incluir una etapa de filtración estéril, que es útil en eliminar carga biológica. El producto puede filtrarse a través de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) modificado de 0,22 micrómetros (por ejemplo Millipore Millipak). Además de PVDF modificado, el filtro estéril puede estar construido de una diversidad de otros materiales que se conocen bien en la técnica y están disponibles para el técnico. Éstos pueden incluir pero no se limitan a polipropileno, celulosa, ésteres de celulosa, nylon, poliétersulfona, o cualquier otro material que es consistente con producto de unión baja. El filtro puede tener una capa de membrana individual o puede incorporar un prefiltro del mismo o de diferente material. El producto puede mantenerse congelado o a aproximadamente 4°C para formulación y carga subsiguientes. Una etapa adicional opcional más adelante en el procedimiento es la inclusión de una etapa de purificación ortogonal con el fin de quitar cualesquiera impurezas resultantes y/o otros agentes. Una etapa tal incluye, pero no está limitada necesariamente a, una etapa de cromatografía de intercambio catiónico. Si se elige, la operación de la etapa del intercambio de cationes estaría en modo a través de flujo. La segunda ultrafiltración se opera como antes salvo que se puede reducir la concentración del tampón de diafiltración (por ejemplo, a 10 mM). Después de la ultrafiltración y del intercambio catiónico inmediatamente anterior, el pH del lote se redujo a 6,5 por medio de adición de un tampón de pH bajo (Histidina). pH más bajos se pueden conseguir pero se corre el riesgo de pérdida de adenovirus en el tampón de formulación ejemplificado; los pH más altos reducen la eficacia de la etapa pero incrementan la estabilidad de los adenovirus. De forma similar, se puede variar la concentración de NaCl. Hasta la fecha, se ha evaluado un número de resinas para recuperación de adenovirus incluyendo Poros 50HS, Source 30S, Source 15S, SP Sefarosa HP, SP Sefarosa XL, SP Sefarosa FF; se prefiere Source 30S. Inmediatamente después del intercambio catiónico, el pH se incrementa para la formulación objetivo por la adición de un tampón de Tris de pH alto. Además y como se destaca anteriormente, los productos de cromatografía de membrana de intercambio iónico tales como aquellos producidos por Pall (por ejemplo serie Mustang<sup>TM</sup>) y Sartorius (por ejemplo serie Sartobind) son adecuados para purificación de adenovirus. El producto puede después ser filtrado estéril como anteriormente.

Una etapa de adsorción en fase inversa se puede añadir también, preferentemente tras aclarado de la primera etapa de ultrafiltración. La adsorción en fase inversa puede retirar detergentes incluyendo Tritón X-100 y bromuro de domifeno así como componentes de medio de cultivos tales como rojo fenol de Pluronicand así como una diversidad de otras impurezas hidrófobas. Por lo tanto ello representa un procedimiento conveniente para incrementar la solidez del procedimiento o para eliminar las etapas anteriores en el procedimiento. La etapa de adsorción puede operarse bien en modo de lote o bien en modo de columna. En el modo por lotes, el adsorbente se eliminará subsiguientemente usando una filtración, preferentemente en modo en línea. En modo en columna, el lote se bombearía sobre la resina en un tiempo de residencia adecuado para permitir adsorción de detergentes y otras impurezas. Las resinas adecuadas tendrían un tamaño de poro que excluye el producto y puede incluir cualquiera de la serie XAD de Amberlite, por ejemplo XAD4, XAD16, XAD 1600, XAD 1180 (Rohm y Haas) o resinas similares a partir de otros fabricantes por ejemplo Bio-Beads SM2 (Bio-Rad).

Una etapa de cromatografía de hidroxiapatita puede considerarse también para eliminar impurezas adicionales. Esta etapa puede operarse bien en modo de unir/eluir o bien en modo dinámico. La etapa puede situarse después

## ES 2 357 366 T3

de la etapa de ultrafiltración finalizando la UF con una diafiltración en un tampón con aproximadamente fosfato 10 mM y NaCl 0,5 M a un pH preferido entre 6,5 y 8. Un gradiente en fosfato para 0,4 M es suficiente para elución de adenovirus.

5 Llegará a ser evidente tras la revisión de esta memoria descriptiva que los procedimientos en la presente invención son escalables, abarcando toda la gama desde los cultivos celulares a escala más pequeña (por ejemplo, aproximadamente funcionamientos de 5-10 litros) completamente a preparaciones a escala comercial, tales como funcionamientos de 10.000 a 50.000 l. Las secciones de Ejemplos 2 y 5 muestran datos de funcionamientos a escala más pequeña, mientras que la discusión más adelante en esta sección contempla, como un ejemplo y ciertamente no como una limitación,  
10 un procedimiento de purificación de adenovirus a partir de un cultivo de 1000 litros (l) (volumen de trabajo de 800 l) de células PER.C6<sup>TM</sup> (CruCell) infectadas anteriormente con el vector de adenovirus respectivo. Para este fin, la Tabla 1 resume los descriptores del procedimiento para un funcionamiento de biorreactor de 1000 l profético (volumen de trabajo de 800 l) pero será escalable linealmente. Las etapas del procedimiento inicial (lisis, filtración en profundidad y ultrafiltración) suben con el volumen del cultivo mientras que la cromatografía de intercambio aniónico y las  
15 etapas subsiguientes suben con la entrada de partículas virales. Por lo tanto, el tamaño de las etapas se basará en una productividad de reactor estimada de  $4 \times 10^{13}$  partículas virales por litro (pv/l). Con estas asunciones, se producirán aproximadamente  $1,6 \times 10^{16}$  pv por lote. Adicionalmente, el Ejemplo 9 muestra datos generados a partir de un funcionamiento de 600 l de Ad5.

20 Una primera etapa en un procedimiento de purificación de la presente invención es una etapa de lisis de células huésped, que mantiene liberación máxima de partículas de adenovirus de las células así como que mantiene una oportunidad para inactivar potencialmente agentes adventicios. Como se menciona anteriormente, un disolvente (por ejemplo TNBP) puede añadirse también a concentración baja (es decir, al 0,3%) para incrementar la eficiencia de la inactivación de los agentes adventicios. El mantenimiento prolongado de una corriente de lisado o de lisado aclarado que incorpora TNBP puede conducir potencialmente a un decrecimiento en infectividad del producto. A partir de un procedimiento de cultivo de adenovirus de 800 l, se añadirán procedimientos de cultivo de adenovirus, aproximadamente 8 litros de Tritón X-100 al 10% y 40 litros de Tris 0,5 M, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, PS-80 al 1% se añadirán al  
25 biorreactor con agitación suave. La lisis celular se completará en 2 horas pero se mantendrá durante tiempo adicional para propósitos de eliminación vírica. El lisado celular se mantiene después a 4°C o se purifica inmediatamente. Esta  
30 etapa de lisis inicial, independientemente de la escala del cultivo de adenovirus, tiene en cuenta la recogida tanto de virus asociados a células (intracelulares) como de virus no asociados a células (extracelulares). Como un resultado, ello proporciona flexibilidad en la selección de las condiciones de cultivo que son óptimas para productividad de virus general. Además, la presencia de detergente por todo el procedimiento minimizará la asociación del virus con el DNA de la célula huésped.

35 Como se ha indicado anteriormente, un esquema de purificación preferido incorpora una etapa para precipitar moléculas de ácidos nucleicos de células huésped de precipitados y otros restos celulares así como incrementa solidez de los procedimientos posteriores. Continuando una descripción de un procedimiento de purificación proyectado para un funcionamiento de 800 l, aproximadamente 60 l de bromuro de domifeno al 0,5% (CTAB o CPC se pueden sustituir con algún ajuste de la concentración final), se añaden lentamente al biorreactor o tanque de cosecha para una concentración final de aproximadamente el 0,04%. Si es necesario, la concentración de SPA óptima para un funcionamiento específico se puede determinar usando estudios de sonda a escala de 1 ml. La adición por debajo de la superficie del SPA se prefiere pero no se requiere. El lisado precipitado es aclarado inmediatamente. Una precipitación tal dará como resultado aproximadamente una reducción del 90% en ácido nucleico tras aclarado. Además, se pueden flocular  
40 otras impurezas (restos celulares, etc.) durante esta precipitación. Cuando se compara con el control no precipitado el rendimiento de la filtración en profundidad puede estar potenciado espectacularmente y pueden incrementarse los rendimientos a través de la filtración en profundidad. El producto aclarado de un funcionamiento de 800 l tal será significativamente menos turbio y la realización de la ultrafiltración subsiguiente estará marcadamente incrementada.

50 El lisado celular tratado con SPA se aclara para eliminar impurezas precipitadas y restos celulares. Esta etapa puede incluir bien una filtración en profundidad o bien una etapa de centrifugación con o sin una etapa de refinado por filtración en profundidad. Cualquiera que sea la etapa que se incorpore, el lisado aclarado de la célula se concentrará después 10-20 veces, se tratará opcionalmente con nucleasa, y se someterá a diafiltración. La combinación de la precipitación y el aclarado eliminará aproximadamente el 90% del DNA total y, dependiendo de las afecciones de ultrafiltración/tratamiento con nucleasa, la pureza de esta corriente puede ser suficiente para muchas aplicaciones. Más específicamente, una etapa de filtración en profundidad será útil para eliminar restos celulares y ácidos nucleicos del huésped. Cuando se opta por la filtración en profundidad, el lisado celular se filtrará a través de dos filtros en profundidad en serie para eliminar los restos celulares. La filtración usará dos cartuchos de filtro de 40,64 centímetros (16 pulgadas) de CE20 de Millipore Millistak ( $6,967 \text{ m}^2$  (75 pie<sup>2</sup>)) seguidos por dos cartuchos de 40,64 centímetros (16 pulgadas) de CE50 de Millistak ( $6,967 \text{ m}^2$  (75 pie<sup>2</sup>)). Estas áreas incluyen un factor de seguridad de al menos 2. La filtración se llevará a cabo usando una velocidad de flujo de aproximadamente  $96,875 \text{ l/h/m}^2$  (9 l/h/pie<sup>2</sup>). El líquido que quede en la caja protectora se desplazará con presión de aire. La filtración en profundidad proporciona un medio conveniente para eliminar económicamente restos celulares y precipitado celular. Se conocerá por el técnico experto al menos tras revisión de esta memoria descriptiva que la selección de filtro real puede cambiarse para optimizar  
65 adicionalmente el rendimiento o la eliminación de impurezas. Como se destacó anteriormente, la centrifugación es una alternativa viable a la filtración en profundidad que puede ser especialmente aplicable en funcionamientos a gran escala.

## ES 2 357 366 T3

En el esquema de purificación según se muestra en la Tabla 1, se incorporan las etapas de concentración, tratamiento de nucleasas y diafiltración con el fin de reducir volumen de lotes, digerir y eliminar ácidos nucleicos y promover un intercambio de tampones. Más específicamente, el lisado aclarado se concentrará desde aproximadamente 800 l hasta aproximadamente 40 l usando una ultrafiltración de volumen constante con una membrana de poliétersulfona (PES) NMWCO de 300 kD en condiciones de flujo constante. Tras la concentración, se añadirán 0,6 MM Unidades de Benzonasa™ (15 U/ml) directamente a lo retenido y se recircularán lentamente en el sistema de ultrafiltración con mezclado. Después de 1-2 horas a temperatura ambiente, el lote se someterá a diafiltración frente a 5 volúmenes (200 l) de HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 en condiciones de flujo constante. Se destacaría que el tamaño de membrana seleccionado se tendrá en cuenta para la eliminación de las proteínas estructurales del virus no ensambladas, las micelas de detergentes y la Benzonasa™. Un MWCO más grande (por ejemplo 500 kD) puede proporcionar también realización adecuada. La adición de Benzonasa™ no se requiere para obtener un pico que es altamente puro por HPLC de intercambio aniónico pero conducirá a niveles de DNA residuales más bajos al final de esta etapa y presumiblemente en el producto purificado final.

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) de la Tabla 1 será útil para purificar el virus a partir de las proteínas de las células huésped, de los ácidos nucleicos de las células huésped, y de los componentes no ensamblados de virus. La conductividad del lote se ajustará a 38 mS por la adición de aproximadamente 62 l de HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, PS-80 al 0,1%, pH 7,5. Tras la dilución, el lote se bombeará sobre una columna de resina Source 15Q (Amersham Biosciences) a una carga de aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  partículas por ml de resina. Para MRKAd5gag, esto corresponde a una columna de alrededor de 5 litros (alrededor de 20 cm H x 16 cm D). Tras cargar, la columna se lavará con 5 volúmenes de HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 0,39 M, PS-80 al 1%, pH 7,5 para eliminar el Tritón residual y las impurezas de proteínas. El producto se eluye después en un gradiente lineal de 4 volúmenes a NaCl 0,47 M y se recoge en base a la señal de A<sub>260</sub>. La necesidad de controlar la temperatura durante este procedimiento se dictará por el tiempo de procesamiento y la estabilidad del AdV en esta fase. La carga a una conductividad de 38 mS es aproximadamente equivalente a NaCl 0,38 M. La concentración de sales es adecuada para unir partículas de adenovirus pero no las impurezas relacionadas; ello se traduce en una capacidad de unión más alta para adenovirus. La presencia de PS-80 al 0,1% (o un compuesto relacionado en una concentración biológicamente efectiva) en los tampones será crítica para lograr niveles de DNA residual bajos en el producto debido a que atenúa la asociación virus/DNA y la agregación de virus. La resina Source 15Q tiene una capacidad de unión extremadamente alta para adenovirus que se puede usar de forma efectiva debido a que los autores de la presente invención están inhibiendo agregación.

La ultrafiltración de flujo tangencial es una etapa mostrada en la Tabla 1 que es útil para eliminar también proteína y ácido nucleico residual así como para intercambiar virus en un tampón de formulación. Brevemente, el área de la membrana (300 kD de MWCO PES) está seleccionada para una carga de  $1-2 \times 10^{16}$  pv perm<sup>2</sup>. El producto AEX se diluirá a alrededor de  $1,1 \times 10^{12}$  pv/ml (aproximadamente 16 litros) y se someterá a diafiltración después usando control de flujo contra 5 volúmenes de tampón de formulación (Tris 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 8,0). La etapa se operó a aproximadamente 4°C y el producto se mantuvo a 4°C hasta la filtración estéril. Esta etapa proporcionará control de PS-80 y puede proporcionar eliminación de las impurezas residuales incluyendo DNA y proteínas de las células huéspedes. La presencia de PS-80 en la alimentación y en el tampón de diafiltración minimizará el potencial para agregación de productos. El control de flujo es importante para la reducción efectiva de PS-80 en presencia de concentraciones de adenovirus altas. Las membranas de 500 kD pueden sustituirse, sin embargo, hay algún potencial para permeación de virus. Otras configuraciones de membrana (por ejemplo, fibra hueca) proporcionan sustitutos aceptables.

La filtración estéril puede añadirse, como por la Tabla 1, para eliminar la carga biológica. La parte retenida final se filtrará a través de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) modificada de 0,22 micrómetros (por ejemplo Millipore Millipak 200) usando una carga de filtro de aproximadamente  $3 \times 10^{13}$  pv/cm<sup>2</sup>. Además de PVDF modificado, el filtro estéril puede estar construido de una diversidad de otros materiales que se conocen bien en la técnica y están disponibles para el técnico. Estos pueden incluir pero no se limitan a polipropileno, celulosa, ésteres de celulosa, nylon, poliétersulfona, o cualquier otro material que es consistente con producto de unión baja. El filtro puede tener una capa de membrana individual o puede incorporar un prefiltro del mismo o de diferente material. El producto puede mantenerse congelado o a aproximadamente 4°C para formulación y carga subsiguientes.

Una etapa de purificación ortogonal se puede añadir para ocuparse de la eliminación de impurezas así como para una eliminación de agentes adventicios. Las etapas de purificación ortogonal no se requieren necesariamente y pueden evaluarse por el técnico experto e implementarse a su vez en base la necesidad. La concentración de la dosis clínica más alta, la solidez de la eliminación de impurezas y las cuestiones del sustrato celular relativas a tumorigenicidad, virus adventicios y priones definen todas estas necesidades para el técnico experto. Las etapas potenciales incluyen cromatografía de intercambio catiónico dinámica, adsorción en fase inversa y cromatografía de hidroxapatita. El intercambio catiónico dinámico es particularmente deseable porque proporcionaría un factor de eliminación alta para PrP y muchos virus adventicios potenciales, incluyendo virus adeno-asociados (AAV).

Como se señala en el presente documento, la presente invención se refiere a purificación de virus de tipo silvestre, modificados o recombinantes. De interés específico en la vacunación genética y/o en las aplicaciones de terapia génica es el uso de un adenovirus incompetente de replicación de 1ª o 2ª generación, inactivado por delección de E1 o por delecciones adicionales, incluyendo vectores de adenovirus "cobardes". El genoma de adenovirus está generalmente asociado a patologías benignas en seres humanos y la organización genómica del virus se ha estudiado bien desde su descubrimiento en los primeros años 50. Además, el genoma es susceptible de manipulación, dependiendo de

la estrategia usada para construir el vector respectivo. Un virus de replicación incompetente (tal como un vector Ad5gag en el que se han eliminado E1/E3 que expresa un transgén gag del VIH, como se ejemplifica en el presente documento) requiere una línea celular que complemente las deleciones. Cualquier línea celular se puede usar para generar vectores virales recombinantes, con líneas celulares preferidas, pero no limitantes, que incluyen células 293 y células PER.C6<sup>TM</sup>. Para este fin, se han descrito numerosos vectores de adenovirus recombinantes de 1<sup>a</sup> generación en la bibliografía (por ejemplo, véase Bett, y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8802-8806; documentos WO 01/02607 y WO 02/22080). Los vectores adenovirales “Cobardes” son un vector adenoviral de 2<sup>a</sup> generación generalmente desprovisto de secuencias codificantes de proteínas víricas, frecuentemente con proteínas virales suplementadas en *trans* por un virus coadyuvante (a menudo un adenovirus del que se ha eliminado E1) cultivado con el adenovector dependiente de coadyuvante (HD) en una línea celular que los empaqueta (por ejemplo, PER.C6<sup>TM</sup>). Ausentes las proteínas virales, estos vectores virales pueden, con carácter alternativo, suplementarse en la traducción por una línea celular capaz de expresar las proteínas estructurales y funcionales adenovirales necesarias para replicación, envoltura y rescate exitoso. En vista de la mayor popularidad de estos vectores virales y de la necesidad definitiva para preparar cantidades a escala comerciales bien de una vacuna de vector viral o bien de un vehículo de terapia génica, ha llegado a ser esencial desarrollar metodología cualitativa y cuantitativa más eficiente para producción de vectores de adenovirus recombinantes de calidad comercial. Se entenderá que los serotipos alternativos, incluyendo pero no limitados a los serotipos 2, 4, 12, 6, 17, 24, 26, 31, 33, 34 35, 36 y 16 son de purificación susceptible por medio de los procedimientos a gran escala revelados en el presente documento. Los serotipos adenovirales 2, 5 y 6, 24, 26, 35 y 36, particularmente 5 se prefieren para usar en esta invención, dado que en este punto temporal, se sabe más sobre este serotipo generalmente que otros serotipos y se conocen sus secuencias de DNA completas. El adenovirus de serotipo 5 prototipo se ha secuenciado completamente (Chroboczek y col., 1992 J. Virology 186: 280, que se incorpora por la presente mediante referencia). Ellos también pertenecen a los adenovirus del subgrupo C, que no están asociados con malignidades de seres humanos o de roedores. Sin embargo, como se destaca anteriormente, se prevé que se puede usar en esta invención cualquier serotipo de adenovirus, incluyendo quiméricos (tal como un virus Ad recombinante “cambiado”, donde dicha región E4 de un serotipo (por ejemplo, Ad5) reemplaza la región similar de un serotipo alternativo (por ejemplo, Ad24)), que puede tener en cuenta el crecimiento de los virus quiméricos Ad24 en una línea celular (por ejemplo, PERC6) que expresa una región Ad5 E1. Además, los serotipos no humanos (por ejemplo, las cepas de adenovirus que infectan al chimpancé) pueden purificarse también por los procedimientos descritos en el presente documento. Un vector Ad5 recombinante, pero de ninguna manera limitante, ejemplificado es MRKAd5gag, así como Mrkad5pol, ambos de los cuales se revelan en el documento WO 02/22080. Otro vector de Ad relacionado es Ad5gag, como se revela en el documento WO 01/02607. Ambas de estas publicaciones PCT se incorporan en el presente documento por referencia.

La célula huésped para usar en el procedimiento presentado en el presente documento comprende cualquier línea celular de mamífero que respalde replicación de la línea celular respectiva, especialmente cualquier línea celular huésped conocida en la técnica que respalde infección y replicación de un vector adenoviral de 1<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup> generación. Una célula hospedadora preferida es una línea celular hospedadora que respalda infección y replicación de un adenovirus recombinante del que se ha eliminado E1 y/o E1/E3.

Como se desvela en el presente documento, un virus incompetente en replicación (tal como un Ad5gag, como se ejemplifica en el presente documento) requiere una línea celular coadyuvante que complemente la deleción de E1 del Ad5. Cualquier línea celular tal se puede usar para generar virus recombinante, con líneas celulares preferidas, pero no limitantes, que incluyen células 293, células PER.C6<sup>TM</sup>, células 911 de una línea celular retinal embrionaria humana (Fallaux y col. 1996, Human Gene Therapy 7: 215-222); aminocitos transformados por E1 (Schiedner y col. 2000, Human Gene Therapy 11: 2105-2116); una línea celular A549 transformada con E1 para un carcinoma de pulmón humano (Imler y col. 1996, Gene Therapy 3: 75-84) y GH329: HeLa (Gao y col. 2000, Human Gene Therapy 11: 213-219). Una línea celular tal se transforma para respaldar replicación y empaquetamiento de un adenovirus recombinante respectivo, tal como un adenovirus recombinante en el que se ha eliminado E1 o E1/E3. Líneas celulares adicionales que se pueden usar en la presente invención son de nuevo líneas celulares que se han adaptado para actuar como células huésped para un virus termoestable en particular. Es preferible que la línea celular sea una línea celular continua y es más preferible que la fuente de células cultivadas se origine a partir de un tejido no neoplásico. Es también preferible que la fuente sea mamífera, lo más probablemente de un origen primate, y especialmente de origen humano. De nuevo, una línea celular preferida es una línea celular que es útil para la propagación de un virus recombinante en el que se ha delecionado E1 de Ad o E1/E3 de Ad; un virus recombinante que complementa vector de adenovirus con E1 delecionado incluidas líneas celulares transfectadas con el gen que codifica E1 de Ad que se han seleccionado por este fenotipo transformado, tales como células 293 (células epiteliales de riñón humano) y PER.C6<sup>TM</sup> (retinoblastos embrionarios humanos). Otros tipos celulares incluyen pero no se limitan a células HeLa, células A549 cells, células KB, células CKT1, células NIH/sT3, células Vero, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o cualesquiera células eucariotas que respalden el ciclo de vida del adenovirus.

Cualesquiera procedimientos de producción de virus anteriores en el procedimiento conocidos en la técnica que se puede adaptar a cultivo celular a gran escala de células huésped de mamíferos se pueden usar para generar el material de partida (es decir, un cultivo de células huésped infectadas por virus que se han sometido a un periodo tras la infección de crecimiento del cultivo tal como para maximizar la cantidad de virus intracelular y extracelular) para la metodología de purificación de la presente invención, tomando en cuenta modificaciones conocidas por el técnico según sea apropiado para tener en cuenta, por ejemplo, cambios en densidad celular o la presencia de microtransportadores. Esta metodología se conoce en la técnica (por ejemplo, véase Patente de los Estados Unidos N.º 6,194,191 para una revisión de técnicas de cultivo conocidas en la técnica, así como “Culture of Animal Cells: A Manual of

## ES 2 357 366 T3

Basic Techniques”, 2000, Ed. R.I. Freshney, Wiley-Liss, ambos documentos incorporados por la presente mediante referencia) y se pueden adaptar de virus a virus y de sitio a sitio con el fin de optimizar la producción de virus. Por ejemplo, las células PER.C6<sup>TM</sup> se pueden cultivar en un biorreactor de 300 l con 240 l de volumen de trabajo y se pueden infectar con un Adenovirus recombinante que codifica un transgén gag de VIH (tal como MRKAd5gag o Ad5gag) a una concentración celular viable de  $0,59 \times 10^6$  células/ml a una multiplicidad de infección (MOI) de 280 pv/célula. Aproximadamente cincuenta horas después de la infección (hpi), el biorreactor se cosecha, a una concentración celular total de aproximadamente  $0,55 \times 10^6$  cells/ml con viabilidad del 55%. Al tiempo del inicio de esta operación unitaria, aproximadamente el 25% del virus es el sobrenadante, como por un ensayo de AEX. De forma similar, las células PER.C6<sup>TM</sup> se cultivan en Biorreactores de Onda de 20 l con un volumen de trabajo de 10 l y se infectan con un vector de adenovirus que codifica un transgén nef de VIH a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 290 partículas virales por célula (pv/célula) y una concentración de células viables de aproximadamente  $0,72 \times 10^6$  células/ml. Aproximadamente cincuenta horas después de la infección (hpi), se cosechan dos biorreactores de onda a una concentración celular total de aproximadamente  $0,66 \times 10^6$  cells/ml con viabilidad del 81%. Al tiempo del comienzo de la concentración, el 20,4% del virus estuvo en los ensayos de AEX de intercambio de sobrenadante por anión.

Los siguientes Ejemplos no-limitantes se presentan para ilustrar mejor la invención.

### Ejemplo 1

#### *Cromatografía de AEX Sin una Etapa de Precipitación Selectiva*

Una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) con ciertas condiciones de selección de resina y operación de columna (concentración de NaCl y pH) mantiene altas capacidades de carga de virus. Se muestra también en el presente documento que la inclusión de un detergente (por ejemplo PS-80) en los tampones en funcionamiento inhibe las agregaciones durante la carga y la elución. En conjunto, se revela en el presente documento que el uso de la resina AEX según se practica mejorará 5-20 veces por encima de los procedimientos previamente comunicados, con capacidad demostrada (pero no necesariamente limitada) a  $2,0 \times 10^{13}$  pv/ml de resina. Son cruciales para la implementación de un procedimiento económicamente eficiente y sólido la elección de resina con una alta capacidad dinámica para adenovirus y metodologías para asegurar que la capacidad puede usarse sin agregación de producto. Tres avances significativos tratan de estos asuntos: (1) Se ha seleccionado Source 15Q (Amersham Biosciences) por su alta capacidad -otras resinas que incluyen Source 30Q (Amersham Biosciences) y Fractogel TMAE (EM Industries) también proporcionan resultados aceptables aunque con capacidades más bajas que están causadas probablemente por proporciones de área de superficie efectiva frente a volumen menores; (2) se ha añadido PS-80 a los tampones de funcionamiento al 0,1% evitando agregación; y (3) el producto está cargado a una conductividad que es lo suficientemente alta asegurando que el hexón de adenovirus libre y las impurezas similares cromatográficamente no se unan a la resina. Por ejemplo, la carga a una conductividad de 38 mS es aproximadamente equivalente a NaCl 0,38 M. La concentración de sales es adecuada uniéndose partículas de adenovirus pero no las impurezas relacionadas; ello se traduce en una capacidad de unión más alta para adenovirus. La conductividad óptima dependerá del serotipo de adenovirus (por ejemplo, el Adenovirus de Tipo 6 se cargará a aproximadamente NaCl 0,33 M dado que esta concentración permite al hexón libre permanecer no unido pero permite a las partículas virales unirse fácilmente). Estas condiciones dan como resultado una etapa que opera significativamente más eficientemente que otras condiciones comunicadas. La Figura 1 muestra como opera este procedimiento. Para propósitos ilustrativos, se muestra un cromatograma preparativo usando el procedimiento descrito en una corriente que no ha sufrido precipitación selectiva. En cambio, el lisado aclarado se ha tratado con niveles altos de nucleasa. Además, la alimentación (Figura 2A), el flujo dinámico (Figura 2B), y el eluido (Figura 2C) del funcionamiento preparativo se muestran en un gradiente de 10 volúmenes de NaCl 0,3-0,6 M en la Figura 2A-C. Es patente que usando esta aproximación, el pico que consta predominantemente de hexón de adenovirus puede moverse al flujo a través del funcionamiento eliminando así cualquier competición uniéndose y significativamente incrementando la resolución de adenovirus a partir de estas impurezas y la capacidad de la columna. El producto de intercambio aniónico puede someterse a diafiltración en tampón de formulación y filtrarse de forma estéril. Alternativamente, una etapa de cromatografía adicional (por ejemplo, intercambio iónico) puede añadirse bien antes o bien después de la diafiltración con el potencial incrementando la solidez de eliminación de impurezas y/o de virus/priones.

### Ejemplo 2

#### *Purificación de Vector Adenoviral MRKAd5gag a partir de Lisado de Células Huésped*

Se obtuvieron aproximadamente 12,5 litros de material lisado con Tritón de MRKAd5gag (lote 0114) a partir de funcionamiento de reactor de 300 l y se dividió entre alícuotas de 9,5 y de 3 l. Las alícuotas se precipitaron por separado en vasos de precipitados de Nalgene de 20 litros. Se especificaron parámetros de mezcla para cada alícuota reduciendo la escala de condiciones de precipitación de 1000 litros razonables manteniendo un tiempo de renovación volumétrico constante. Ambas alícuotas se precipitaron añadiendo DB a una concentración final de 0,0435% en peso/volumen usando una solución concentrada (DB al 2% en NaCl 40 mM). La velocidad de adición de esta mezcla fue 0,3 ml/minuto para cada litro de lisado. La solución de DB se añadió por debajo de la superficie. El uso de la adición por debajo de la superficie está respaldado por datos generados por los autores de la invención.

## ES 2 357 366 T3

Una vez se completó la precipitación, la filtración en profundidad se llevó a cabo secuencialmente en cada alícuota usando el mismo aparato de filtración. El aclarado se llevó a cabo usando un filtro CE-25 de Millipore Opticap en serie con un Millipore Opticap DE-45. Ambos filtros proporcionaron áreas de superficie de filtración de  $0,093 \text{ m}^2$  ( $1 \text{ pie}^2$ ). Todos los 12,5 litros de material precipitado se procesaron exitosamente con una presión máxima acumulada en cada filtro de  $6,895 \times 10^3$  pascales (1 psi). Tras el aclarado la turbidez se redujo desde aproximadamente 540 a 3,6 NTU. Como se muestra en la Tabla 2, el rendimiento a través de esta etapa fue sólo el 60% pero pareció estar causado por fenómenos de adsorción y se exacerbó por lo tanto por el rendimiento bajo usado en este ejemplo.

Sólo 9,5 litros de este material se procesaron hasta el producto final. Se llevaron a cabo concentración y diafiltración usando un ultrafiltro de NMWCO PES de 500 Da de  $0,1 \text{ m}^2$  (Millipore Pellicon 2). Esta membrana se incorporó en un aparato TFF conteniendo un alojamiento de filtro de membrana y una bomba de lóbulo. Un factor de concentración de 20 se llevó a cabo en el material aclarado disminuyendo el volumen de lote total. Después de concentración, se añadió Benzonas<sup>TM</sup> a 15 U/ml de material y el lote se hizo recircular en el sistema dos horas con la conducción de permeado cerrada. Después de incubación el lote se sometió a diafiltración frente a 5 volúmenes de HEPES 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5.

La cromatografía de intercambio aniónico se llevó a cabo a una carga de  $2,4 \times 10^{12}$  pv/ml. La caída de presión a través de la columna no se incrementará durante la carga indicando que la corriente estuvo esencialmente libre de restos y de agentes contaminantes. Además, casi no se vio ninguna absorbancia de UV (a 260 ó 280 nm) durante la carga del producto, o tras la elución del producto (Figura 3). Estas observaciones demostraron que el grueso de las impurezas se eliminó anteriormente en el procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico y son consistentes con los datos de impurezas más adelante.

La segunda ultrafiltración se llevó a cabo usando cinco membranas de  $50 \text{ cm}^2$ , 500 kD PES. Se dirigieron cinco volúmenes de diafiltración intercambiando el virus en el tampón de formulación. Como se muestra en la Tabla 2, el rendimiento a través de esta etapa se disminuyó pero probablemente fue causado por permeación de virus y/o por carga de membrana baja. El producto se filtró de forma estéril después con un filtro de 0,22 micrómetros Millipore Sterivex GV de  $10 \text{ cm}^2$ . No se vio acumularse presión durante la filtración estéril lo que sugiere una falta de virus agregado. Nótese que los rendimientos de procedimiento actuales son conservadores dado que no tienen en cuenta toma de muestras sustancial para propósitos analíticos.

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 357 366 T3

TABLA 2

*Tabla de Rendimiento para MRKAd5gag*

Muestra	Volumen (ml)	AEX (pv/ml)	Partículas Virales	Rendimiento de Etapa	Rendimiento Neto
Lisado A	9475	$8,68 \times 10^{10}$	$8,23 \times 10^{14}$	100 %	100 %
<u>Lisado B</u>	<u>3045</u>	$6,12 \times 10^{10}$	$1,86 \times 10^{14}$		
Total	12520		$1,01 \times 10^{15}$		
Ppt en DB de A <sup>1</sup>	9655	$9,15 \times 10^{10}$	$8,84 \times 10^{14}$	107 %	107 %
<u>Ppt. en DB de B</u>	<u>3094</u>	$6,26 \times 10^{10}$	$1,94 \times 10^{14}$		
Total	12749		$1,08 \times 10^{15}$		
Lisado A <sup>2</sup> Aclarado	9553	$3,75 \times 10^{10}$	$3,59 \times 10^{14}$	60 %	65 %
<u>Lisado B Aclarado</u>	<u>3279</u>	$8,89 \times 10^{10}$	$2,91 \times 10^{14}$		
Total	12833		$6,50 \times 10^{14}$		
Retenido de UF1	263,3	$1,19 \times 10^{12}$	$3,14 \times 10^{14}$	105 %	68 %
<u>Lavado de UF1</u>	<u>189,4</u>	$3,22 \times 10^{11}$	$0,61 \times 10^{14}$		
Total	452,7		$3,75 \times 10^{14}$		
Reserva de Intercambio Iónico <sup>3</sup>	205,4	$1,47 \times 10^{12}$	$3,01 \times 10^{14}$	80 %	54 %
Retenido de UF2	276,2	$7,17 \times 10^{11}$	$1,74 \times 10^{14}$	69 %	38 %
Producto Filtrado Estéril	231	$7,10 \times 10^{11}$	$1,64 \times 10^{14}$	94 %	36 %
1. El precipitado se filtró a través de filtro de jeringuilla de 0,45 micrómetros antes del ensayo. 2. Sólo se impulsó el lisado A aclarado. 3. Sólo se mandaron a la segunda ultrafiltración 166 ml de AEP.					

Los datos de eliminación de Proteínas y DNA se ilustran en Tabla 3. Nótese que los niveles de DNA residuales están por debajo del límite de cuantificación del ensayo después de intercambio aniónico indicando que el procedimiento ejemplificado tiene solidez de procedimiento sustancial. Los niveles de proteínas específicos no cambian a partir del procedimiento de UF1 al producto final y están cerca de los niveles teóricos para adenovirus. Esta observación es bastante consistente con la carencia de señal UV expuesta en el flujo a través de la AEX preparativa y el lavado de la AEX preparativa. La "limpieza" potenciada de la corriente a través de precipitación y aclarado se cree que es la causa principal de este incremento. La Tabla 3 también muestra que la infectividad se mantiene a través del procedimiento.

## ES 2 357 366 T3

TABLA 3

*Datos de Infectividad y de Eliminación de Impurezas de Purificación de MRKAd5gag*

5

10

15

20

Intermedio	DNA residual, pg/10 <sup>11</sup> pv	Proteína (BCA) mg/10 <sup>11</sup> pv	AEX/QPA, pv/UI
Lisado	5,52e6	1292	--
Ppt. en DB	4,30e5	811	--
Lisado de Clar	--	1802	--
UF1 FR	229	14	19
AEP	2,0 (<5)	13	19
UF2 FR	--	16	--
SFP	2,2 (< 5)	15	16

25 Ejemplo 3

*Tensioactivos Catiónicos para Precipitación de Moléculas de Ácidos Nucleicos*

30 Se estudiaron tensioactivos alternativos para investigar la especificidad relativa de diferentes tipos de detergentes catiónicos. Este ejemplo estipula comprensión adicional de la selectividad incrementada de DB. La Tabla 4 contiene la lista de tensioactivos usada en este ejemplo junto con sus pesos de fórmula y sus estructuras moleculares correspondientes.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

Diferencias Estructurales de Detergentes Catiónicos			
Tensioactivos	Acrónimo	Peso de Fórmula (D)	Estructura
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	CTAB	365	
Cloruro de tetradeciltrimetilamonio	TTA	336	
Cloruro de cetilpiridinio	CPC	340	
Bromuro de domifeno	DB	414	
Cloruro de bencetonio	BTC	448	

## ES 2 357 366 T3

Las alícuotas de 1 ml de lisado celular se trataron con un intervalo de concentraciones de tensioactivos y se agitaron inmediatamente. Tras filtración con filtros de jeringuilla de 0,45 micrómetros, las muestras se analizaron para concentración de DNA por medio del ensayo de Picogreen (Molecular Probes) y la concentración de adenovirus se determinó usando un ensayo de HPLC de intercambio aniónico. La Figura 4 expone los perfiles de precipitación de adenovirus.

Una longitud de cadena más corta (por ejemplo, CTAB frente a TTA) presenta un perfil de precipitación más distinto. Aunque 0,03% es la concentración de tensioactivo permisible máxima antes de la precipitación de adenovirus tanto para CTAB como para TTA; los perfiles de DNA son diferentes (véase Figura 5). En comparación se encontró que los perfiles de precipitación de DB y de BTC eran casi idénticos. Aunque, cuando se desiste de mover el punto en el que comienza la precipitación de adenovirus, la selectividad de DNA es mayor para DB que para BTC en todas las concentraciones (véase Figura 5). Es decir, el contacto entre el nitrógeno cargado positivamente de BTC y el grupo de fósforo de DNA puede impedirse estéricamente por la proximidad cercana del anillo de benceno en BCT. Un resultado de la carga que está protegida o carecer de una cola hidrófoba distintiva puede tener la culpa también. Se puede concluir, sin embargo, que las estructuras que forman anillos son más sólidas y selectivas para DNA. La interacción hidrófoba propuesta podría ser la fuerza motriz para este fenómeno. Una diferencia única aunque significativa entre las moléculas de CPC y CTAB es la presencia de un anillo piridinio. La carga positiva se distribuye por todo este anillo. Como se ve en la Figura 5 la precipitación inicial de adenovirus por CPC y CTAB comienza en el 0,03%. Además el perfil de precipitación es mucho menos agresivo cuando la carga positiva se distribuye. Sin embargo, como se muestra también en la Figura 5, CTAB precipita más DNA para una mayoría de las concentraciones de tensioactivos.

### Ejemplo 4

#### *Efectos de Velocidad de Mezclado en Preparaciones de Filtración Profunda de Adenovirus Precipitados*

La precipitación de DNA de bromuro de domifeno (DB) en el lisado de PERC.6<sup>TM</sup> es sensible a las condiciones de mezcla. La actuación de la filtración en profundidad para diferentes concentraciones de mezcla generadas por velocidad de impulsor diferente se evalúa en este Ejemplo. MRKAd5gag0114 se precipitó a diversas velocidades de impulsor de 30, 65 y 250 RPM. El aclarado consistió en una filtración en profundidad de dos fases. Los precipitados se filtraron primero usando un CE-25 de Millipore Millistak +50 (0,00186 m<sup>2</sup> (0,02 pies<sup>2</sup>)) a 96,875 l/hr/m<sup>2</sup> (9 l/hr/pie<sup>2</sup>). El material se almacenó y filtró usando un DE-45 Millipore Millistak +50 (0,00186 m<sup>2</sup> (0,02 pies<sup>2</sup>)) a la misma velocidad de flujo. Las caídas de presión como una función del rendimiento para diversas condiciones de mezcla se comparan con el control antes de la precipitación en la Figura 6. La mezcla a 30 RPM mostró un incremento significativo en rendimiento para el filtro a 137,9 x 10<sup>3</sup> pascales manométricos (20 psig) según se compara con el caso de control, pero mostró pérdidas en rendimiento general en relación a las condiciones de mezcla a 65 y 250 RPM. Las otras condiciones de mezcla mostraron menores rendimientos que el caso control para el filtro CE-25, pero mostraron rendimientos mayores en general entre precipitación y filtración en profundidad que el caso de control. La dependencia de aclarado en condiciones de mezcla subraya la importancia de la reoptimización después de que se han determinado las condiciones de mezcla. Como para el rendimiento del DE-45, se observó acumulación de presión pequeña (< 6,895 x 10<sup>3</sup> pascales (< 1 psi)) en todas las suspensiones examinadas. Así dado que el DE-45 nunca llegó a cerrar su capacidad, el filtro CE-25 es el factor limitante en el esquema de aclarado. Aunque los filtros de CE-25 redujeron la turbidez para cantidades que varían, como se ve en la Tabla 5, los siguientes filtros de DE-45 redujeron la turbidez de los lisados precipitados a menos de 6 NTU, mientras que sólo redujeron la turbidez del lisado no precipitado a 10.

TABLA 5

*Reducción de Turbidez para Diversas Concentraciones de Precipitación*

Parámetro	No Precipitado	Velocidad de Mezcla		
		30 RPM	65 RPM	250 RPM
Alimentación (NTU)	41	237	200	600
Reserva de CE25 (NTU)	14	22	24	4,4
Reducción	66 %	91 %	88 %	99 %
Reserva de DE45 (NTU)	10	5,2	4,8	2,2
Reducción	29 %	76 %	80 %	50 %

## ES 2 357 366 T3

### Ejemplo 5

#### *Preparación de Adenovirus Recombinante A Partir de Biorreactor de 300 Litros*

5 Se llevó a cabo un cultivo a escala celular de 240 l en el biorreactor de 300 l. Este lote confirmó la escalabilidad del proceso de purificación con operaciones unitarias individuales que corren al equivalente de 60 a 214 litros de suspensión celular. El rendimiento del procedimiento general fue del 54% según se midió por la HPLC de intercambio aniónico. La proporción de infectividad (pv/IU) y el contenido específico de DNA de cada producto final fueron (31 pv/IU) y ( $< 16,5 \text{ pg}/10^{11} \text{ pv}$ ), respectivamente, y fueron comparables a datos históricos.

10 *Lisis* - La lisis se completó por la adición de tampones concentrados logrando concentraciones finales de Tritón X-100 al 0,1% y Polisorbato-80 al 0,05%. El lisado se mantuvo durante toda una noche a temperatura ambiente antes de la etapa de precipitación por detergente.

15 *Precipitación* - La precipitación de DNA se llevó a cabo a escala de 214 l en el biorreactor. Una solución de bromuro de domifeno al 0,5% con NaCl 40 mM se añadió por encima de la superficie durante aproximadamente dos horas a una concentración final de bromuro de domifeno al 0,04%. El agitador se operó a 80 rpm durante este tiempo. La velocidad de agitación se seleccionó operando a un tiempo de recambio volumétrico que se ha demostrado que es efectivo a escala menor y que podría implementarse a escala mayor. Después de la precipitación, aproximadamente 20 153 kg de lisado precipitado se transfirieron por filtración profunda.

25 *Filtración en Profundidad* - El lisado precipitado se aclaró con un esquema de filtración en profundidad de dos fases. Para este funcionamiento, se usaron cartuchos Millistak de 30,48 centímetros (doce pulgadas) con un filtro CE20 de 0,6324 metros cuadrados (6,8 pies cuadrados) seguido por un filtro CE-50 de 0,6324 metros cuadrados (6,8 pies cuadrados). La filtración se llevó a cabo a una velocidad de flujo constante de 2 l/minuto y se recuperaron 144,2 kg de lisado aclarado. El rendimiento general fue del 84%.

30 *Ultrafiltración* - Aproximadamente 60 l de lisado aclarado se concentraron 20 veces con  $0,3 \text{ m}^2$  de área de membrana (PES de 500 kDa de Millipore Pellicon II). La velocidad de recirculación se mantuvo a 1 l/minuto y se controló el flujo permeable a 0,3 l/min. La digestión con nucleasas se llevó a cabo por la adición de Benzonasa<sup>TM</sup> a 15 U/ml seguidas por dos horas de incubación a temperatura ambiente. A continuación, el tampón se intercambió con 5 volúmenes de diafiltración de HEPES 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, NaCl 1 M, pH 7,5 para eliminación de impurezas. El producto se mantuvo durante toda una noche a 4°C.

35 *Cromatografía de Intercambio Aniónico* - El producto de UF1 se diluyó a una conductividad de 38 mS/cm usando HEPES 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, PS-80 0,1%, pH 7,5. Se empaquetó una columna FineLine de diámetro de 10 cm (Amersham Biosciences) con un total de 863,5 ml de resina Source 15Q (Amersham Biosciences). Se cargó el producto a una velocidad lineal de 1,5 cm/min, se lavó con 5 volúmenes de columna de HEPES 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, NaCl 0,39 M, PS-80 al 0,1%, pH 7,5 y después se eluyó durante un gradiente de cuatro columnas a NaCl 0,47 M.

40 *Ultrafiltración* - El pico de producto se diluyó y ajustó a una concentración de adenovirus de aproximadamente  $1,05 \times 10^{12} \text{ pv/ml}$  y a una concentración de sal de NaCl 1 M. El lote se sometió a diafiltración en tampón de formulación (Tris 5 mM, NaCl 75 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 8,0) por medio de membrana PES de 500 kDa de  $0,1 \text{ m}^2$  (Millipore Pellicon II Biomax). El flujo permeable se mantuvo a 80 ml/min.

45 *Filtración Estéril* - Lo retenido por ultrafiltración se filtró de forma estéril con un filtro Millipak-20 de Millipore ( $100 \text{ cm}^2$ ) a una velocidad de flujo de alimentación constante de 150 ml/min.

50 La Tabla 6 muestra la etapa y los rendimientos netos de MRKAd5gag. Este lote produjo  $1,91\text{E}15$  partículas virales con un rendimiento neto general del 54%. Nótese que en varios ejemplos la entrada a una etapa es significativamente menor que el rendimiento de la etapa anterior debido a la toma de muestras.

55

60

65

## ES 2 357 366 T3

TABLA 6

*Tabla de Rendimiento de RKAd5gag*

Muestra	Vol, ml	AEX, pv/ml	Ad, pv	Rendimiento de Etapa	Rendimiento Neto
Lisado	214200	$6,40 \times 10^{10}$	$1,37 \times 10^{16}$		
Precipitado <sup>1</sup>	232850	$5,08 \times 10^{10}$	$1,18 \times 10^{16}$	86 %	86 %
Alimentación de Filtración Profunda	152906	$5,08 \times 10^{10}$	$7,77 \times 10^{15}$		
Lisado Aclarado	144224	$4,70 \times 10^{10}$	$3,39 \times 10^{15}$	85 %	73 %
Alimentación de UF1	59885	$5,08 \times 10^{10}$	$3,04 \times 10^{15}$	108 %	79 %
Parte retenida de UF1	2925	$9,82 \times 10^{11}$	$2,87 \times 10^{15}$		
Lavado de UF1	501	$5,58 \times 10^{10}$	$2,79 \times 10^{15}$		
Total de UF1	3429	$8,46 \times 10^{11}$	$2,90 \times 10^{15}$	96 %	75 %
Alimentación de AE	8357	$3,37 \times 10^{11}$	$2,81 \times 10^{15}$	97 %	73 %
Producto de AE	1198	$1,77 \times 10^{12}$	$2,12 \times 10^{15}$	75 %	55 %
AEP Diluido <sup>2</sup>	2000	$1,05 \times 10^{12}$	$2,10 \times 10^{15}$		
Alimentación de UF2 <sup>2</sup>	1900	$1,05 \times 10^{12}$	$1,99 \times 10^{15}$		
Parte retenida de UF2	1876	$1,05 \times 10^{12}$	$1,97 \times 10^{15}$	99 %	55 %
Alimentación de SF	1864	$1,05 \times 10^{12}$	$1,96 \times 10^{15}$		
Producto filtrado de forma estéril	1935	$9,95E+11$	$1,92E+15$	98 %	54 %
1. Filtrado a través de filtro de jeringuilla de 0,45 micrómetros antes de ensayo. 2. Valor calculado.					

La Figura 7 muestra análisis descritos por SDS-PAGE del lote ejemplificado así como algunos experimentos adicionales que no se describen en el presente documento. Los carriles 2-4, en particular, muestran procedimientos intermedios de este ejemplo y demuestran la alta pureza del producto dado que todas las bandas significativas se identifican como proteínas estructurales de adenovirus.

La Tabla 7 resume la eliminación de DNA para el lote. Se logró reducción logarítmica de DNA de más de 2 por precipitación y filtración en profundidad. De nuevo, se logran los niveles en o cerca del límite de detección del ensayo. La Tabla 7 presenta también el perfil de eliminación de detergente durante este funcionamiento ejemplificado. Los detergentes se eliminaron ambos de forma efectiva en intercambio aniónico y en la segunda ultrafiltración. La cantidad de detergente en la corriente de producto se redujo hasta bajar el límite de detección del ensayo (aproximadamente 0,001%) después de UF2.

## ES 2 357 366 T3

TABLA 7

*Eliminación de impurezas durante lote de MRKAd5gag0123A*

Intermedio	DNA (QPCR) (pg/10 <sup>11</sup> pv)	Tritón (%)	DB (%)
Lisado	1,9 x 10 <sup>7</sup>	0,109	< 0,001 %
Lisado Aclarado	8,3 x 10 <sup>4</sup>	0,078	0,011
Producto de UF1	3410	0,297	0,122
AEP	30	0,007	0,008
Parte retenida de UF2	< 5	< 0,001 %	< 0,001 %
Producto filtrado de forma estéril	5	< 0,001 %	< 0,001 %

### Ejemplo 6

#### *Precipitación de CTAB frente a Uso de Nucleasa Elevado*

MRKAd5gag comparando un procedimiento que incorpora precipitación de CTAB y no incorpora ningún tratamiento con nucleasas (armC) con un procedimiento que usa niveles de nucleasa elevados (Benzonasa™ a 150 U/ml, RNasa a 150 U/ml) pero ninguna precipitación (Rama ALa Tabla 8 contiene los datos de eliminación del DNA residual para ambas ramas de purificación. Nótese que la precipitación de CTAB reduce la precipitación general de DNA en el procedimiento mientras el caso de base logra la mayoría de su eliminación a través del tratamiento con nucleasas (UFI CR a UFI DR). Los niveles de DNA en el Producto de Intercambio Aniónico (AEP) están dentro de la variabilidad del ensayo. Estos datos muestran que una etapa de precipitación basada en detergente puede reemplazar un tratamiento de nucleasas de alta concentración enteramente sin un impacto sobre la calidad del producto.

TABLA 8

*DNA Residual*

Resultados de Digestión con Benzonasa™ frente a Precipitación con DNA por medio de CTAB				
Intermedio de Procedimiento	MRKAd5gag0112A		MRKAd5gag0112C	
	DNA	Residual	DNA	Residual
	(pg/1E11 pv)		(pg/1E11 pv)	
Lisado	9,87 x 10 <sup>7</sup>		9,87 x 10 <sup>7</sup>	
Lisado Aclarado	7,25 x 10 <sup>6</sup>		1,10 x 10 <sup>6</sup>	
Parte Retenida de Concentración de UF1	1,01 x 10 <sup>7</sup>		--	
Parte Retenida de UF1	2,58 x 10 <sup>3</sup>		5,38 x 10 <sup>5</sup>	
AEP (Producto de Intercambio Aniónico)	595		260	

## ES 2 357 366 T3

### Ejemplo 7

#### *Precipitación de CPC y Bromuro de Domifeno*

5 En este ejemplo, los procedimientos que usan precipitación de CPC o DB (sin ningún uso de nucleasa) se comparan con un alto control de nucleasa. En particular, se comparan los siguientes escenarios de purificación:

10 *0113A*: ninguna precipitación, Benzonasa y RNasa 150 U/ml cada una, carga de AEX a aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  pv/ml.

*0113C*: precipitado con CPC, sin uso de nucleasa, carga de AEX a aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  pv/ml.

15 *0113D*: precipitado con DB, sin uso de nucleasa, carga de AEX a aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  pv/ml.

Los rendimientos de la etapa son comparables a lo largo de las tres ramas salvo para rendimientos de UF1 inusualmente bajos en la rama A (véase Tabla 9).

TABLA 9

*Tabla de Rendimientos para MRKAd5gag0113*

ETAPA	0113A1	0113C	0113D
PPT		102 %	100 %
CL	83 %	84 %	93 %
UF1 FR	60 %	109 %	110 %
AEP	76 %	88 %	80 %
NET	38 %	82 %	82 %

40 Los datos de DNA residuales para el lote se enumeran en la Tabla 10. Estos datos sugieren una eficiencia general alta para los procedimientos basados en precipitación incluso en la ausencia de cualquier uso de nucleasa. El producto de intercambio aniónico no se procesó por UF2 en este ejemplo, de tal forma que los productos finales no están disponibles.

TABLA 10

*Escisión de DNA por MRKAd5gag0113*

Intermedio	DNA de PER.C6 residual, pg/1e11 pv		
	0113A	0113C	0113D
LYS	$8,20 \times 10^6$	$8,20 \times 10^6$	$8,20 \times 10^6$
Parte retenida de UF1	116	4,88e5	4,98e5
AEP	8,7	59	26

## ES 2 357 366 T3

La eliminación de proteínas se muestra más adelante en la Tabla 11. La eficiencia de eliminación de proteínas en la etapa UF1 parece estar significativamente incrementada antes de la precipitación, pero las diferencias de pureza en la etapa de AEP no se pueden discernir usando proteína total dado que la gran mayoría está presente en el producto. Como un resultado, una impureza proteica relativa a los AEP se trata por análisis de SDS-PAGE en el Ejemplo 8.

TABLA 11

*Eliminación de Proteína Total para lotes de MRKAd5gag0113 (ensayo de BCAA)*

Intermedio	0113A mg/10 <sup>11</sup> pv	0113C mg/10 <sup>11</sup> pv	0113D mg/10 <sup>11</sup> pv
LYS	1370	1255	1450
CL	1201	1183	1210
UF1 DR	228	66	113
AEP	15	13	13

Mientras que se muestra que CTAB no tiene un efecto sobre la infectividad de adenovirus (lote 0112), las diferencias estructurales y las diferencias en los mecanismos posibles de precipitación de CPC y de DB garantizaron datos de infectividad adicionales. Para estas tres purificaciones, la proporción de partículas virales frente a unidades de infección fue como sigue: A-26 pv/UI; C-32 pv/UI; D-29 pv/UI. Estas proporciones son equivalentes estadísticamente y demuestran que los procedimientos esbozados en el presente documento no tienen impacto en la infectividad del producto.

### Ejemplo 8

*Análisis de SDS-PAGE para lotes de MRKAd5gag0112, MRKAd5gag0113 y MRKAd5gag0114*

Se llevó a cabo análisis de proteínas en gel de SDS-PAGE en muestras en curso a partir de lotes de purificación en desarrollo de MRKAd5gag0112, MRKAd5gag0113 (Ejemplo 7) y MRKAd5gag0114 (Ejemplo 2), como se muestra en la Figura 8. Se pueden hacer varias observaciones importantes. Primero, incorporar precipitación de CTAB (0112C, carril 3) parece conducir a pureza de proteínas más alta en el Producto de Intercambio Aniónico (AEP) que en la rama de control (0112A, carril 2). Segundo, los carriles 5-10 muestran pureza similar a partir del AEP a pesar de las siguientes variaciones de procedimiento: (a) la carga de AEX a 5, 10 y 15 x 10<sup>12</sup> pv por ml de resina con tratamiento de Benzonasa<sup>TM</sup> a 150 U/ml y sin precipitación (0113A1-A3-carriles 5-7); (b) uso de sólo 5 U/m de Benzonasa sin precipitación (0113B-carril 8); (c) precipitación de CPC o de DB sin uso de nucleasas (carriles 9 y 10 de 0113). Tercero, el AEP del lote 0114 (carril 4), que incorpora tanto precipitación de DB como uso de niveles bajos de Benzonasa, muestra mejor pureza de proteínas (por ejemplo menos de 39 KDa y 50 KDa de impurezas).

### Ejemplo 9

*Purificación a Escala de 600 Litros de Adenovirus de Tipo 5*

El procedimiento se aumentó a escala adicionalmente, empezando con 600 l de lisado celular. Los procedimientos específicos usados son similares a aquellos descritos en el Ejemplo 5, pero incluyen las siguientes diferencias: (1) la filtración en profundidad se llevó a cabo con un filtro CE20 de Millipore seguido por un filtro CP50 de CUNO (que incorpora carga positiva) en una proporción de área 2:1, (2) se usaron ultrafiltros de 300 kDa, (3) se incluye PS-80 al 0,1% en el tampón de diafiltración y (4) un adenovirus recombinante sometido a purificación fue MRKAd5pol, que se describe en detalle en publicación PCT WO 02/22080.

Los rendimientos para este procedimiento se muestran en la Tabla 12. La infectividad del producto final se confirmó por un ensayo TCID<sub>50</sub>, con una proporción de infectividad de 4 pv/UI. El tamaño de partícula promedio por Dispersión de Luz Dinámica fue 123 nm, consistente con las expectativas teóricas. Niveles de DNA residuales específicos, niveles de proteínas totales y productos residuales de procesos se muestran en la Tabla 13. Estos datos confirman adicionalmente la escalabilidad del proceso.

## ES 2 357 366 T3

TABLA 12

*Tabla de Rendimiento de MRKAd5pol Para Purificación a Escala de 600 l*

Muestra	Vol, l	AEX, pv/ml	Ad, pv	Rendimiento de Etapa <sup>2</sup>	Rendimiento Neto
Lisado	615	2,62 x 10 <sup>10</sup>	1,61 x 10 <sup>16</sup>	--	--
Precipitado <sup>1</sup>	668	2,32 x 10 <sup>10</sup>	1,55 x 10 <sup>16</sup>	96 %	96 %
Lisado Aclarado	672	1,83 x 10 <sup>10</sup>	1,23 x 10 <sup>16</sup>	80 %	77 %
Producto de UF1	30,6	3,53 x 10 <sup>11</sup>	1,08 x 10 <sup>16</sup>	93 %	71 %
Producto de AE	2,64	3,55 x 10 <sup>12</sup>	9,37 x 10 <sup>15</sup>	89 %	64 %
Producto de UF2	11,3	7,22 x 10 <sup>11</sup>	8,16 x 10 <sup>15</sup>	92 %	59 %
Producto Filtrado de forma Estéril	10,3	7,10 x 10 <sup>11</sup>	7,31 x 10 <sup>15</sup>	98 %	58 %

1. Filtrado a través de filtro de jeringuilla de 0,45 micrómetros de PVDF anteriormente al ensayo.

2. Los rendimientos de etapas tienen en cuenta grandes muestras tomadas en intermedios de procedimientos (incluyen precipitado: 2,2 l; lisado aclarado: 37,3 l; Producto UF1: 0,8 l; Producto AE: 0,15 l; Producto UF2: 1,0 l).

TABLA 13

*Eliminación de Impurezas Durante Purificación a Escala de 600 l*

Muestra	PG DE DNA (QPCR) pg/10 <sup>11</sup> pv	Protein (BCA), ug/10 <sup>11</sup> pv	% de Tritón	% de DB
Lisado	3,5E + 0,7	2313	0,134	--
Lisado Aclarado	8,4E + 0,4	2404	0,082	0,021
Producto de UF1	736	114	0,113	0,031
Producto de AE	20	9	0,003	0,003
Producto de UF2	17	8	< 0,0012	< 0,0008
Producto Filtrado de Forma Estéril	14	8	< 0,0012	< 0,0008

## ES 2 357 366 T3

### Ejemplo 10

#### *Adenovirus de Tipo 6*

5 En este ejemplo, se purifica el adenovirus de tipo 6 (del subgrupo C). Los cambios de procedimiento en este ejemplo están predominantemente en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Allí, el producto de UF1 se diluyó a aproximadamente 30,7 mS/cm y se cargó sobre la resina de Source 15Q. La columna se lavó con un tampón que contiene NaCl 0,32 M. La elución de producto tuvo lugar a través de un gradiente de volumen de cuatro columnas a una concentración de NaCl final de 0,41 M. Por lo demás, el procedimiento se hace funcionar esencialmente como se describe en el Ejemplo 9.

15 Los rendimientos a partir de esta purificación demuestran que la actuación del procedimiento es comparable a Ad5 (Tabla 14). Específicamente, los niveles de DNA residuales por Q-PCR se redujeron exponencialmente por encima de 2 tras precipitación y aclarado. Los niveles se redujeron a 3 pg/10<sup>11</sup> pv en el producto. Los valores de proteína totales específicos (Tabla 15) indican también que la inmensa mayoría de la proteína total se elimina por el final de UF1 y las impurezas residuales se normalizan tras AEX. Como se ve con adenovirus de tipo 5 este dato indica que los tipos de adenovirus en el mismo subgrupo se pueden purificar.

20 TABLA 14

*Tabla de Rendimiento de Ad6 Para Purificación a Escala de 20 l*

Muestra	Vol, ml	AEX, pv/ml <sup>2</sup>	Ad, pv	Rendimien- to de Etapa <sup>2</sup>	Rendi- miento Neto
Lisado	3664	1,06x10 <sup>11</sup>	3,88x10 <sup>14</sup>	--	--
Precipitado <sup>1</sup>	3952	1,01x10 <sup>11</sup>	3,99x10 <sup>14</sup>	103 %	103 %
Lisado Aclarado	3898	8,71x10 <sup>10</sup>	3,40x10 <sup>14</sup>	85 %	88 %
Producto de UF1	185,7	1,58x10 <sup>12</sup>	2,93x10 <sup>14</sup>	87 %	77 %
Producto de AE	101,6	1,76x10 <sup>12</sup>	1,79x10 <sup>14</sup>	63 %	48 %
Producto de UF2	135,9	1,13x10 <sup>12</sup>	1,54x10 <sup>14</sup>	92 %	44 %
Producto Filtrado de forma Estéril	141,4	1,01x10 <sup>12</sup>	1,43x10 <sup>14</sup>	100 %	44 %
1. Filtrado a través de filtro de jeringuilla de 0,45 micrómetros de PVDF anteriormente al ensayo. 2. Los resultados se calcularon a partir de la curva estándar de Ad5. 3. Los rendimientos de la etapa toman en cuenta la toma de muestras de intermedios (no mostrado).					

## ES 2 357 366 T3

TABLA 15

*Eliminación de Impurezas Durante Purificación de Ad6 a Escala de 20 l*

Muestra	DNA(QPCR) pg/10 <sup>11</sup> pv	Proteína (BCA), ug/10 <sup>11</sup> pv	Tritón %	% de DB
Lisado	5.8E+06	641	0,135	--
Lisado Aclarado	4.2E+04	439	0,084	0,016
Producto de UF1	310	37	0,017	0,041
Producto de AE	20	10	< 0,0012	< 0,0008
Producto de UF2	5	10	< 0,0012	< 0,0008
Producto Filtrado de forma Estéril	3	7	< 0,0012	< 0,0008

### Ejemplo 11

#### *Adenovirus de Tipo 35 (Ad35pol)*

En este ejemplo, se purifica el adenovirus de tipo 35 (del subgrupo B). Los cambios de procedimiento según se comparan con el Ejemplo 5 estuvieron predominantemente en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico preparativo. Allí, el producto de UF1 se diluyó a aproximadamente 28 mS/cm y se cargó sobre la resina de Source 15Q. La columna se lavó con NaCl 0,29 M y se eluyó en un gradiente de cuatro volúmenes de columna a NaCl 0,38 M. Por lo demás, el procedimiento se hizo funcionar esencialmente como se describe en los Ejemplos 5 y 9.

Los rendimientos de esta purificación demuestran que la actuación del proceso es comparable a Ad5 (Tabla 16). Los niveles de DNA residuales específicos por Q-PCR se redujeron exponencialmente por encima de 3 tras precipitación y aclarado a 11 ng/10<sup>11</sup> pv. Los niveles se redujeron a 1,0 ng/10<sup>11</sup> pv tras la primera ultrafiltración (UF1). Los valores de proteínas totales específicos (Tabla 17) también indican que la inmensa mayoría de la proteína total se elimina por el final de UF1; estos datos indican que este producto alcanza pureza relativamente sin purificación cromatográfica alguna y que muchos subgrupos de adenovirus pueden purificarse por el procedimiento existente, a saber sometiendo a un lisado aclarado, precipitado por SPA a una etapa de ultrafiltración individual.

TABLA 16

*Tabla de Rendimiento de Ad35 Para Purificación a Escala de 20 l*

Muestra	Vol, ml	AEX, pv/ml <sup>2</sup>	Ad, pv	Rendimiento de Etapa <sup>2</sup>	Rendimiento Neto
Lisado	20723	4,31 x 10 <sup>10</sup>	8,93 x 10 <sup>14</sup>	--	--
Precipitado <sup>1</sup>	22371	3,64 x 10 <sup>10</sup>	8,14 x 10 <sup>14</sup>	91 %	91 %
Lisado Aclarado	22259	2,86 x 10 <sup>10</sup>	6,37 x 10 <sup>14</sup>	78 %	71 %
Producto de UF1	949	4,54 x 10 <sup>11</sup>	4,31 x 10 <sup>14</sup>	75 %	53 %
Producto de AE	137	2,85 x 10 <sup>12</sup>	3,91 x 10 <sup>14</sup>	93 %	49 %
Producto de UF2	448	6,64 x 10 <sup>11</sup>	2,97 x 10 <sup>14</sup>	78 %	39 %
Producto Filtrado de forma Estéril	438	6,43 x 10 <sup>11</sup>	2,81 x 10 <sup>14</sup>	99 %	38 %

1. Filtrado a través de filtro de jeringuilla de 0,45 micrómetros de PVDF anteriormente al ensayo.  
 2. Los resultados se calcularon a partir de la curva estándar de Ad5.  
 3. Los rendimientos de la etapa toman en cuenta la toma de muestras de intermedios (no mostrado).

## ES 2 357 366 T3

TABLA 17

*Eliminación de Proteínas Durante Purificación de 20 l de Ad35*

5

Muestra	Proteína (BCA), ug/10 <sup>11</sup> pv
Lisado	1803
Lisado Aclarado	1549
Producto de UF1	24
Producto de AE	17
Producto de UF2	14
Producto Filtrado de forma Estéril	15

10

15

20

### 25 Ejemplo 12

*Separación de Tipos de Adenovirus 5, 24 y 36 por Intercambio Aniónico*

30 Se inyectaron cantidades pequeñas de adenovirus purificados por cromatografía o por ultracentrifugación con CsCl en una columna de Source 15Q a escala analítica (véase Figura 9). En este ejemplo, se usó un gradiente de NaCl de 0,2 a 0,6 M. El procedimiento es claramente capaz de unir/eluir virus a partir de subgrupo C (Ad5), subgrupo D (Ad24), o subgrupo B (Ad35). Además, inyectando nuevos tipos con un tipo conocido (en este caso Ad5), el tiempo de elución relativa se puede calcular; a partir del tiempo de elución relativo y del conocimiento de tampones preparativos para Ad5, se pueden determinar fácilmente tampones preparativos para cualquier otro serotipo. Este cambio es la única modificación notable necesaria para adaptar esta invención a otros serotipos de adenovirus.

35

### Ejemplo 13

40 *Precipitación de Bromuro de Domifeno de Tipos de Adenovirus 5, 35 y 6*

45 Un intervalo de concentraciones de DB (0 al 0,065%) se añadió a viales de 1 m de lisados celulares de adenovirus diferentes que contenían aproximadamente Tritón al 0,1%, PS-80 al 0,05%, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y Tris 25 mM, pH 8. Las células se prepararon en cultivo de suspensión con infección a aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml. Estas muestras se removieron y filtraron inmediatamente con filtros de jeringuilla de 0,45 micrómetros. Se retiraron alícuotas para la determinación de concentraciones de adenovirus y DNA por medio de ensayos de AEX-HPLC y de Picogreen.

45

50 Como se muestra en la Figura 10, los adenovirus no precipitan de forma medible a concentraciones de cloruro de domifeno por debajo del 0,05%. Por lo tanto, la adición de bromuro de domifeno a niveles entre 0,03 y 0,05% dará como resultado precipitación selectiva de DNA. Para las propiedades de corriente particulares usadas en el presente documento, la adición al 0,04% es adecuada para todos los serotipos. La precipitación de impurezas residuales por CPC, CTAB y SPA alternativos mencionados muestra también actuación similar en subgrupos de adenovirus múltiples.

50

### 55 Ejemplo 14

*Procedimiento de Purificación de Ad5 con Intercambio Catiónico*

60 La purificación de adenovirus usando un procedimiento que incluye intercambio catiónico puede venir por una cromatografía de intercambio aniónico como se describe en los ejemplos anteriores. Este ejemplo describe el procesamiento del producto de intercambio aniónico por una segunda ultrafiltración, un ajuste de pH, un intercambio catiónico dinámico y un segundo ajuste de pH/tampón para llegar a un producto en un tampón de formulación final.

60

65 El producto de intercambio aniónico se diluyó y ajustó a una concentración de adenovirus de aproximadamente 1,77 x 10<sup>12</sup> pv/ml y a una concentración de sal de NaCl 1 M. El lote se sometió a ultrafiltración en tampón (Tris 5 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, pH 7,4) por medio de tres membranas de PES de 0,05 m<sup>2</sup> de 300 kDa (Millipore Pellicon XL). El flujo permeable se mantuvo a 80 ml/min-m<sup>2</sup>.

65

## ES 2 357 366 T3

Se ajustó el pH de la parte retenida ultrafiltrada a aproximadamente 6,5 con tampón (Tris 5 mM, Histidina 0,2 M, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,005%, HCl 50 mM, pH 6,5) antes de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

5 Se empaquetó una columna Vantage L de 1,6 cm de diámetro (Millipore Corporation) con 18,8 ml de resina Source 30S (Amersham Biosciences). El producto se cargó a una velocidad lineal de 1 cm/minuto y se lavó con 6 volúmenes de columna de tampón (Tris 5 mM, Histidina 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, sacarosa 5%, PS-80 al 0,02%, pH 6,5).

10 La operación se llevó a cabo en modo dinámico y la recogida del producto se detuvo una vez la A<sub>260</sub> se aproximó al nivel de línea base. El producto se ajustó a condiciones de formulación añadiendo Tris 0,17 M, Histidina 10 mM, NaCl 2,27 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, sacarosa al 5%, PS-80 al 0,02%, tampón al pH 9,3. La Tabla 18 muestra el rendimiento para este procedimiento.

15

TABLA 18

*Tabla de Rendimiento de MRKAd5gag para Ultrafiltración e Intercambio Catiónico*

20

Muestra	Vol, ml	AEX, pv/ml	Ad, pv	Rendimiento de Etapa*	Rendimiento Neto
AEP	80,6	3,96E12	3,19E14	--	--
Alimentación de UF2	179,5	1,77E12	3,17E14	99 %	99 %
Parte retenida de UF2	206,9	1,6E12	2,61E14	83 %	83 %
Ajuste de Pre-CEX	199,1	1,18E12	2,35E14	97 %	80 %
CEP	224,2	8,55E11	1,92E14	88 %	71 %
Ajuste de Post-CEX	223,0	8,49E11	1,89E14	102 %	72 %
* Los rendimientos de las etapas dan cuenta de la toma de muestras entre etapas (no mostrados).					

45

### Ejemplo 15

#### *Aclarado de Lisado Precipitado con Centrifugación Continua-MRK Ad5pol*

50

Este ejemplo demuestra que una centrífuga continua con un filtro de profundidad de refinado se puede usar aclarando el lisado celular precipitado. El lisado celular precipitado de un Ad5 se centrifugó usando una centrífuga continua CARR Pilot Powerfuge a un tiempo de residencia de 2 minutos y tanto a 20.000 G como a 10.00 G. El recipiente usado tiene un volumen de aproximadamente 1 litro. El centrado se alimentó continuamente dentro de un filtro de profundidad CP50 de CUNO a 1,50696 LPM/m<sup>2</sup> (0,14 LPM/pie<sup>2</sup>). Las muestras de centrado y de filtrado de puntos temporales se tomaron periódicamente controlando el progreso del aclarado. Los rendimientos de adenovirus por toda la centrifugación estaban en exceso del 90%, con un rendimiento de aclarado general del 80%. La turbidez del lisado aclarado fue menos de 2 NTU. El lisado aclarado almacenado después se procesó más adelante según se describe en otros ejemplos con resultados similares en términos de eliminación de DNA residual, pureza de proteínas e infectividad del producto.

60

La presente invención no está limitada en alcance por las reivindicaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas descritas en el presente documento serán patentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se pretende que dichas modificaciones entren dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

65

## ES 2 357 366 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de purificar partículas de adenovirus a partir de una preparación de cultivos celulares que comprende:
- a) lisar células dentro de la preparación de cultivo celular;
  - b) aclarar el lisado que contiene las partículas adenovirales;
  - 10 c) tratar el lisado aclarado con nucleasa; y
  - d) someter el lisado aclarado y tratado con nucleasa a cromatografía de intercambio aniónico;
- 15 en el que los tampones usados en la cromatografía de intercambio aniónico comprenden un tensioactivo no iónico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el tensioactivo no iónico es polisorbato-80 (PS-80).
- 20 3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la nucleasa de la etapa c) es benzonasa.
4. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior en el que el producto de intercambio aniónico se somete a diafiltración en tampón de la formulación y se filtra de forma estéril.
- 25 5. Un procedimiento según la reivindicación 4 que comprende una etapa de cromatografía adicional antes o después de la diafiltración.
6. Un procedimiento según la reivindicación 5 en el que la etapa de cromatografía adicional es una etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

30

35

40

45

50

55

60

65

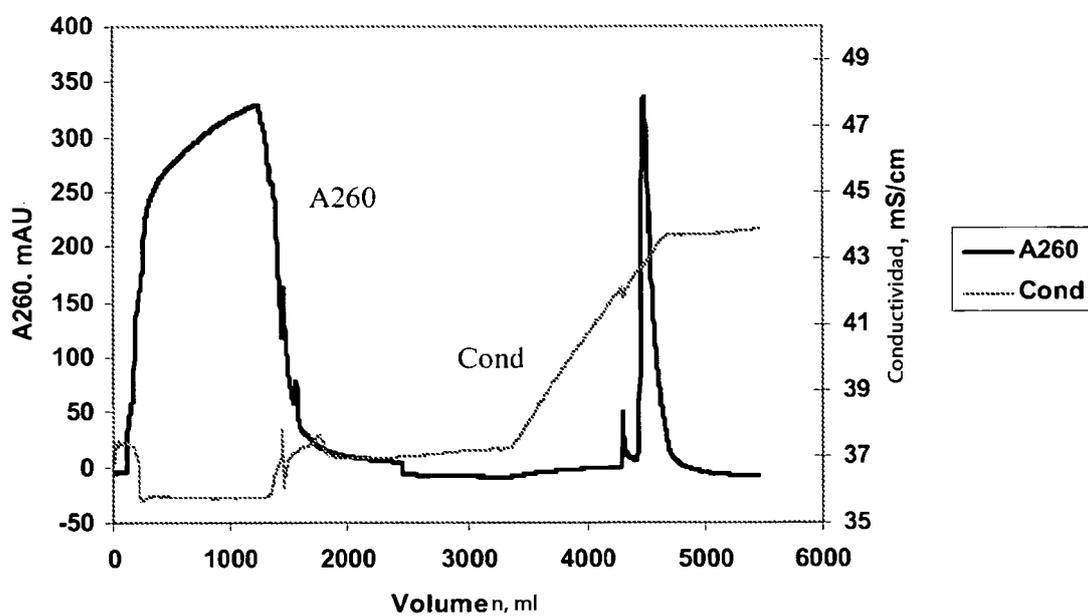
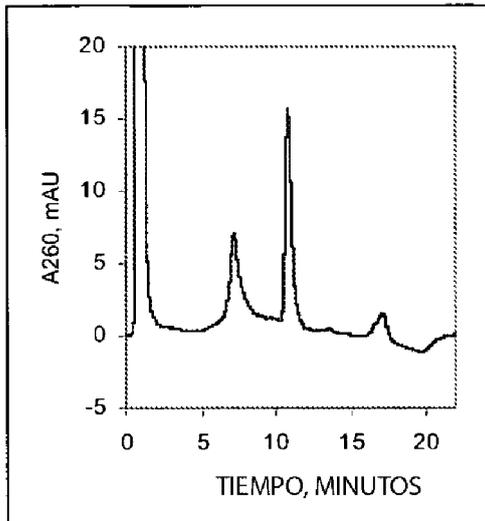
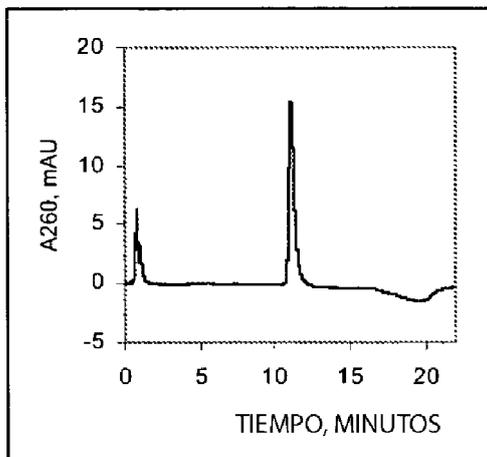
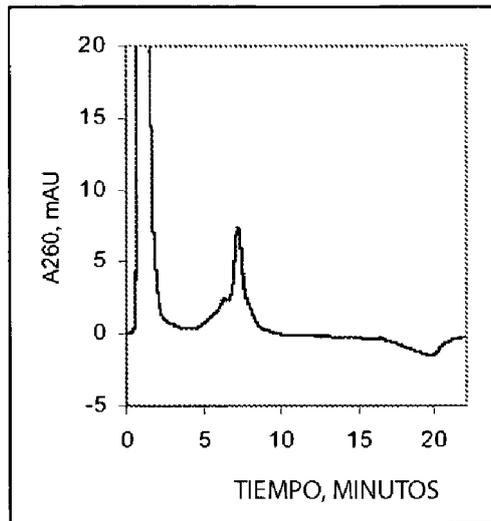


FIGURA 1

A. Alimentación



B. Flujo dinámico



C. Reserva de Producto (parte eluida)

FIGURA 2A, 2B, 2C

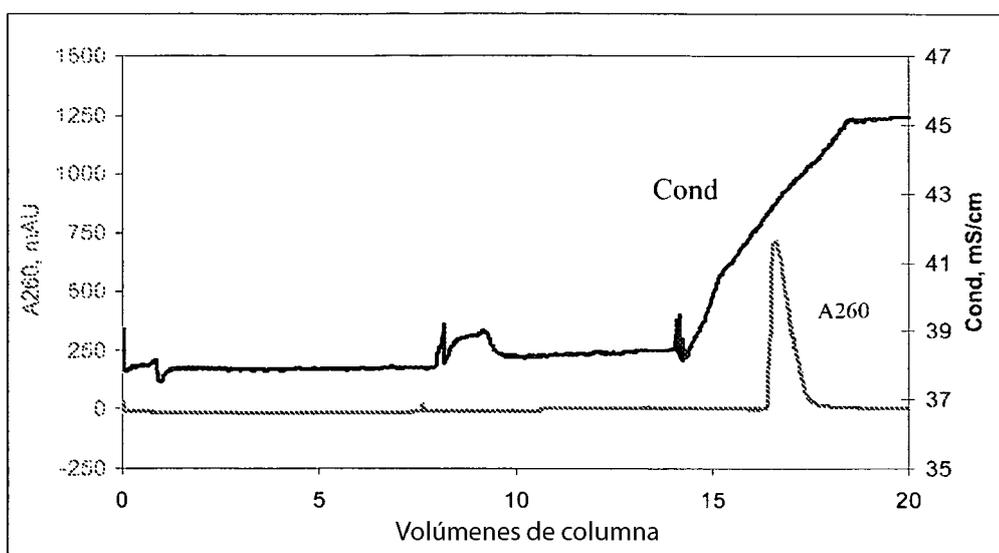


FIGURA 3

Perfiles de Precipitación de Adenovirus para Detergentes Catiónicos

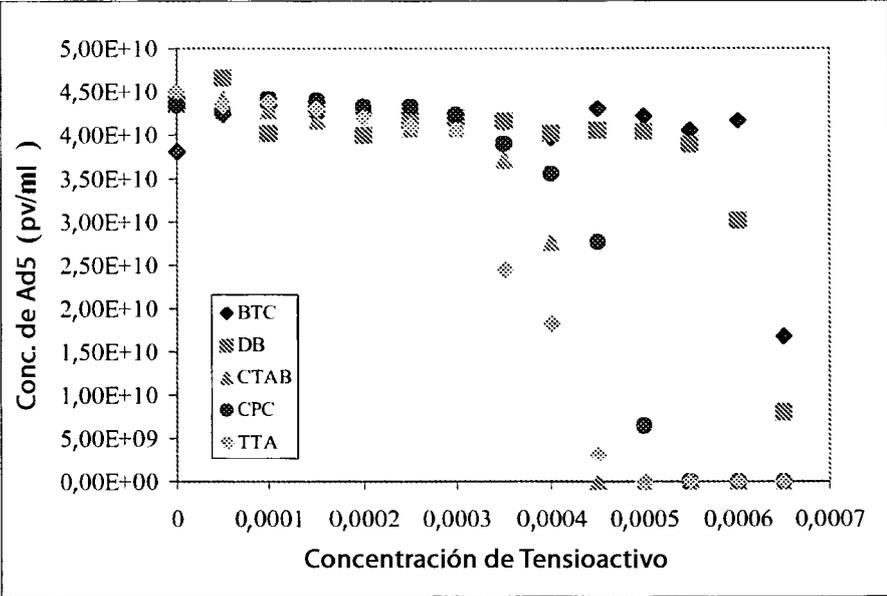


FIGURA 4

Perfiles de Precipitación de DNA para Detergentes Catiónicos

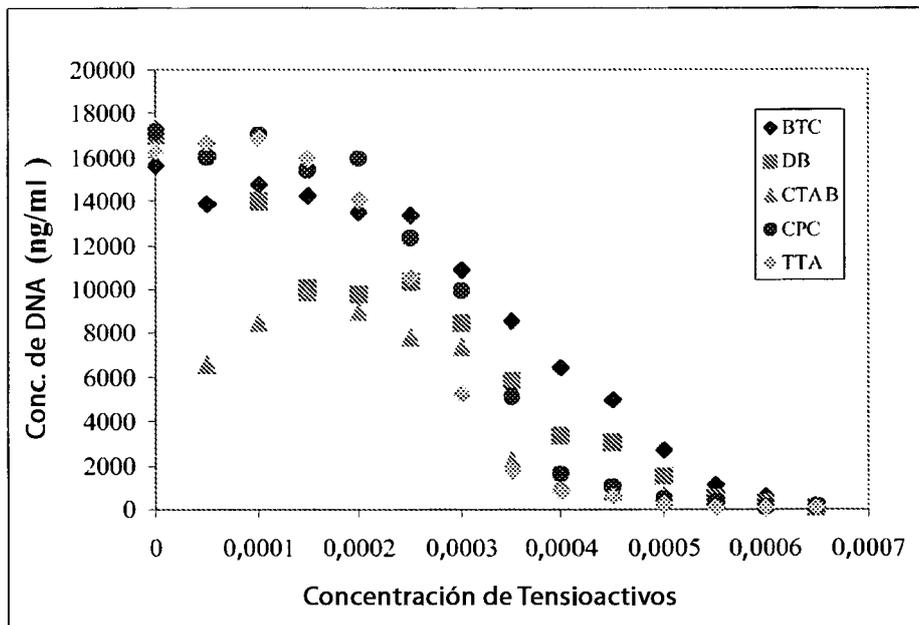


FIGURA 5

Capacidades de Filtración en Profundidad para Diversas Condiciones de Precipitación

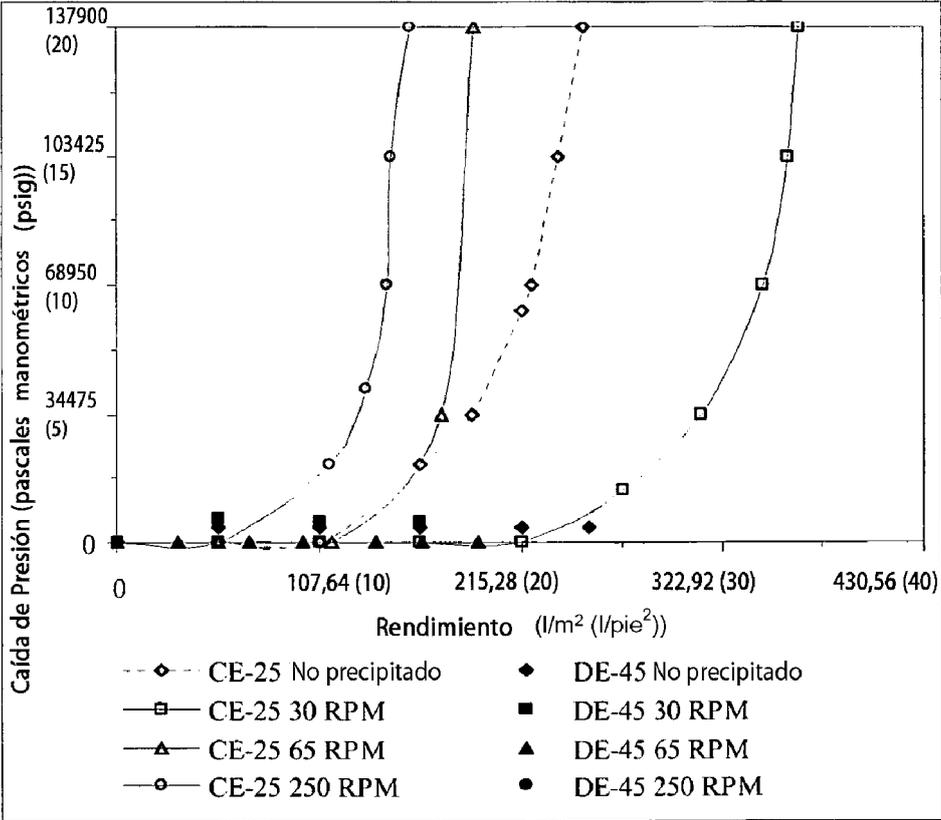


FIGURA 6

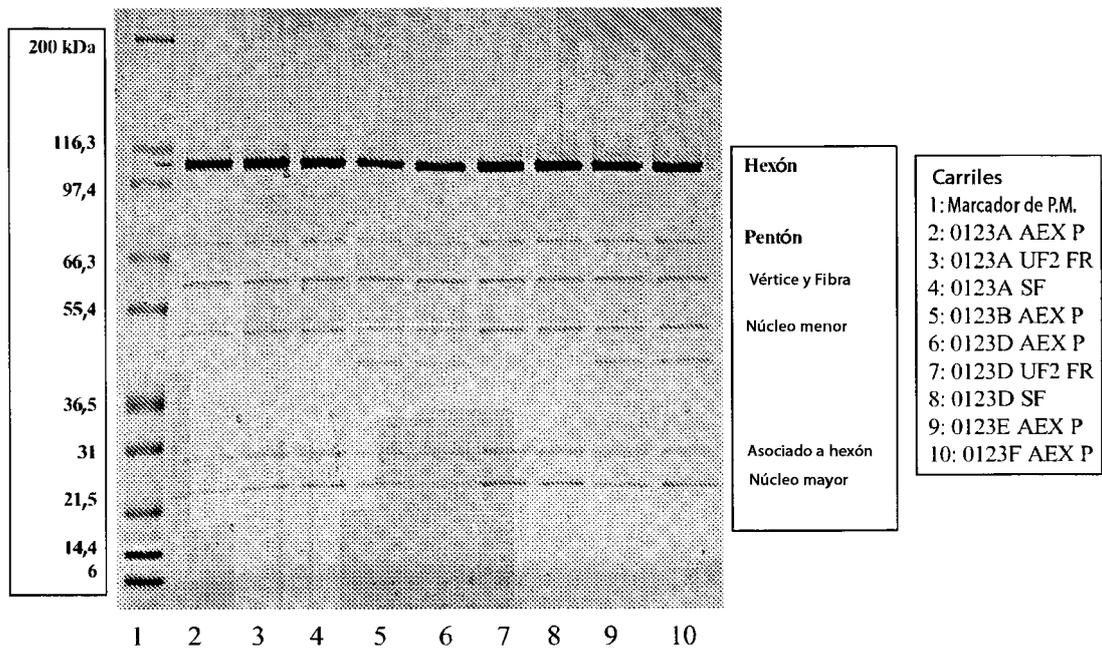


FIGURA 7

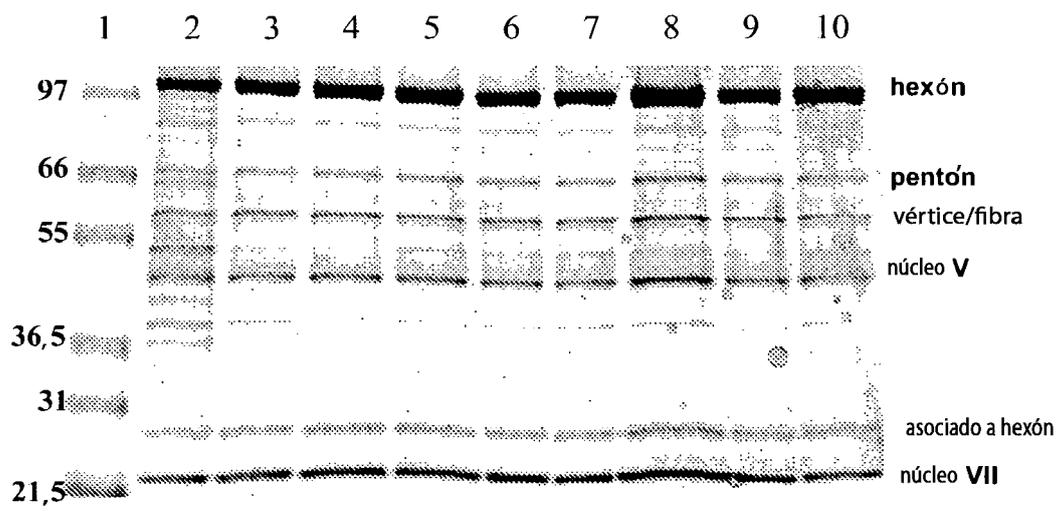


FIGURA 8

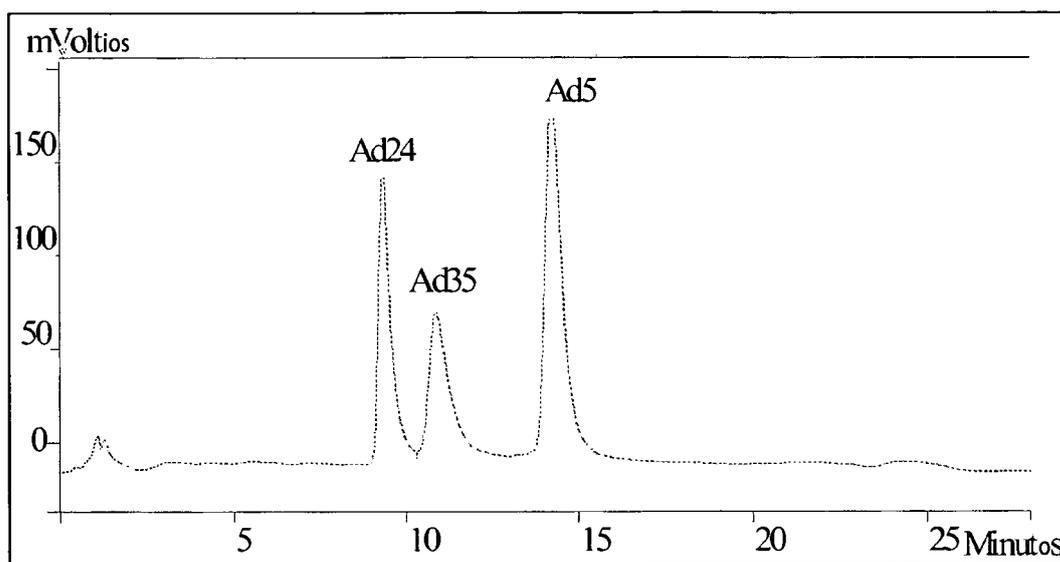


FIGURA 9

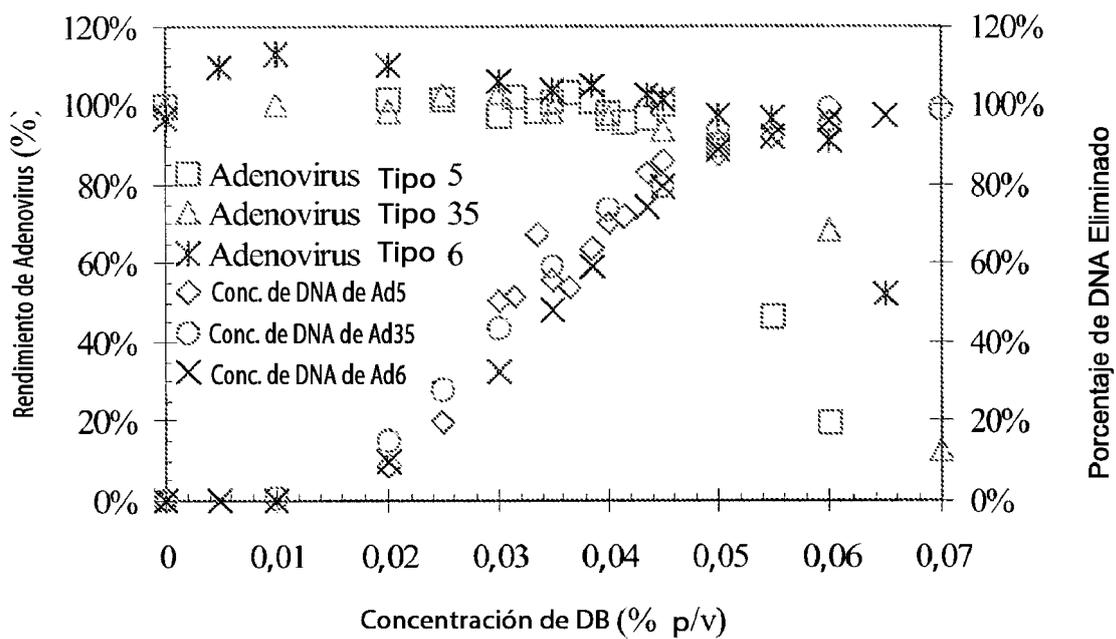


FIGURA 10