

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 356**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07755685 .0**
- 96 Fecha de presentación: **19.04.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2007883**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **Procedimiento de purificación para el aislamiento del virus purificado de la estomatitis vesicular de un cultivo celular**

30 Prioridad:
20.04.2006 US 793376 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.03.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
**KANG, Yun;
CUTLER, Mark William;
OUATTARA, Amadou Affrey y
SYVERTSEN, Kristen Elissa**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 356 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de purificación para el aislamiento del virus purificado de la estomatitis vesicular de un cultivo celular

Antecedentes de la invención

5 El virus de la estomatitis vesicular (VSV), miembro de la familia Rhabdoviridae, tiene un genoma de ARN monocatenario no segmentado de sentido negativo. Su genoma de once kb tiene cinco genes que codifican cinco proteínas estructurales del virus: la proteína de nucleocápside (N), que se requiere en cantidades estequiométricas para la encapsidación del ARN replicado; la fosfoproteína (P), que es un cofactor de la ARN polimerasa ARN dependiente (L); la proteína matriz (M) y la glicoproteína de enlace (G) (por ejemplo, véase Gallione et al., 1981 J. Virol., 39:529-535; Rose y Gallione, 1981, J. Virol., 39: 519-528; Patente de Estados Unidos N° 6.033.886; Patente de Estados Unidos N° 6.168.943).

10 En general, el VSV no se considera un patógeno humano, y como tal, la inmunidad preexistente al VSV es rara en la población humana. Así, el desarrollo de vectores derivados del VSV se ha centrado en áreas tales como composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) y el transporte de genes que codifican las proteínas terapéuticas. Por ejemplo, hay estudios que han establecido que el VSV puede servir como un vector eficaz para expresar la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (Roberts et al., 1999 J. Virol., 73:3723-3732), la proteína del virus H del sarampión (Schlereth et al., 2000 J. Virol., 74:4652-4657) y las proteínas env y gag del VIH-1 (Rose et al., 2001 Cell, 106(5):539-49). Otras características del VSV que hacen de él un vector atractivo incluyen: (a) la capacidad de replicarse fuertemente en el cultivo celular; (b) la incapacidad tanto de integrar ADN en la célula huésped como de experimentar recombinación genética; (c) la existencia de múltiples serotipos que posibiliten estrategias de inmunización para estímulos primordiales; (d) se pueden insertar genes extraños de interés en el genoma del VSV y se pueden expresar abundantemente por la transcriptasa viral; y (e) el desarrollo de un sistema especializado para el rescate de virus infecciosos de una copia de ADNc del genoma del virus (por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 6.033.886; Patente de Estados Unidos N° 6.168.943).

15 La producción de composiciones inmunogénicas vectorizadas del VSV incluyen generalmente la infección de un cultivo celular adecuado (huésped) con VSV recombinante, crecimiento del VSV en el cultivo celular, la cosecha del fluido del cultivo celular en el momento adecuado y la purificación del VSV a partir del fluido del cultivo celular. El uso de vectores del VSV y composiciones inmunogénicas del mismo en aplicaciones clínicas requerirá muestras de VSV (o dosis) de la pureza adecuada para cumplir los requisitos de seguridad de las diversas autoridades de seguridad de fármacos en todo el mundo (por ejemplo, Food and Drug Administration (FDA), Agencia Europea del Medicamento (EMA), Canadian Health Products and Food Branch (HPFB), etc.).

20 Sin embargo, generalmente es difícil separar el VSV de los contaminantes del cultivo celular (por ejemplo, las proteínas y el ADN que son impurezas del cultivo celular) y obtener un VSV de pureza y rendimiento adecuados usando los procedimientos de purificación del VSV disponibles actualmente (por ejemplo, purificación mediante centrifugación en gradiente de sacarosa). Por ejemplo, usando los procedimientos de purificación disponibles actualmente, generalmente hay una relación inversa entre la pureza y la recuperación (rendimiento porcentual) de las muestras de VSV, haciendo por tanto difícil fabricar cantidades suficientes de VSV purificado. Adicionalmente, en los procedimientos actuales basados en biorreactores, el aumento de las concentraciones celulares y los mayores tiempos de cultivo dan como resultado títulos de VSV superiores, con aumentos concomitantes en los residuos celulares y las concentraciones de constituyentes orgánicos en el fluido del biorreactor, complicando adicionalmente los procedimientos de purificación del VSV.

25 La ultracentrifugación en gradiente de sacarosa ha sido el procedimiento convencional para purificación de virus (incluyendo la purificación de VSV) desde 1964 (Yamada et al., 2003 BioTechniques, 34(5):1074-1078, 1080; Brown et al., 1967 J. Immun., 99(1): 171-7; Robinson et al., 1965 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 54(1):137-44; Nishimura et al., 1964 Japan. J. Med. Sci. Biol., 17(6):295-305). Sin embargo, mientras las concentraciones del virus aumentan, también se producen aumentos concomitantes de los residuos celulares, del ADN huésped y de las impurezas de proteínas, que son muy difíciles de eliminar en altas concentraciones mediante la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Además, la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa es extremadamente costosa para adaptarla a gran escala. La concentración y purificación del VSV mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) (McShany et al., 1970 Virol., 40(3):745-6) presenta problemas similares de altos niveles de impureza.

30 Se han obtenido virus de una calidad relativamente alta mediante cromatografía de exclusión de tamaño (Transfiguración et al., 2003 Human Gene Ther., 14(12):1139-1153; Vellekamp, et al., 2001 Human Gene Ther., 12(15):1923-36; Rabotti et al., 1971 Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Serie D: Sciences Naturelles, 272(2):343-6; Jacoli et al., 1968 Biochim. Biophys. Acta, Genl Subj., 165(2):99-302). Sin embargo, debido al coste del procedimiento y a las dificultades de operación, no es factible, generalmente, para la producción de virus a gran escala. La cromatografía de afinidad, tales como heparina (Zolotukhin et al., 1999 Gene Ther., 6(6):973-985), lecitinas (Kaarsnaes et al., 1983 J. Chromatog., 266:643-9; Kristiansen et al., 1976 Prot. Biol. Fluids, 23:663-5) y sulfato de Matrex™ Cellufine™ (Downing et al., 1992 J. Virol. Meth., 38(2):215-228), ha encontrado alguna aplicación para la purificación de virus. Generalmente, la heparina y la lecitina no se prefieren (o usan) para la producción de virus cGMP debido a posibles problemas de lixiviación, que requerirían ensayos

adicionales anteriores al lanzamiento del producto.

La purificación de virus por afinidad utilizando sulfato de Matrex™ Cellufine™ es una cuestión sin resolver, debido a la eficacia en la purificación del virus, calidad del virus y regeneración de la columna. Para la purificación del VSV, se necesitan columnas de afinidad muy grandes (por ejemplo, 0,2 l de resina de sulfato de Matrex™ Cellufine™ por litro de cultivo celular; resultados no publicados por Wyeth Vaccine). Se observó un bajo rendimiento de virus al purificar mediante cromatografía de intercambio iónico, tanto de forma individual como en combinación de otros tipos de técnicas cromatográficas tradicionales usadas en la purificación de virus (Publicación de la Patente Internacional N° WO2006/011580 Specht et al., 2004 Biotech. Bioeng., 88(4):465-173; Yamada *et al.*, 2003, citada anteriormente; Vellekamp *et al.*, 2001 citada anteriormente; Zolo-tukhin *et al.*, 1999, citada anteriormente; (Publicación de la Patente Internacional N° WO1997/06243 Kaarsnaes et al., 1983, citada anteriormente).

De esta manera, existe una necesidad actual y en desarrollo de la técnica de procedimientos de purificación que puede generar el VSV en un nivel adecuado de pureza y de recuperación (rendimiento).

Sumario de la invención

Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento se refieren generalmente a los campos de la virología, microbiología, inmunología y desarrollo de procedimientos. Más especialmente, se describen procedimientos de purificación novedosos para obtener el virus de la estomatitis vesicular (VSV) con mayor pureza y rendimiento.

En un aspecto, un procedimiento para la purificación del fluido del cultivo celular del VSV a partir del cultivo celular de un mamífero infectado con el virus VSV comprende las etapas de: (a) aclarado primario, (b) aclarado secundario, (c) adsorción de membrana de intercambio aniónico, (d) filtración de flujo tangencial y (e) filtración. En una realización, la etapa (a) comprende el aclarado del fluido del cultivo celular mediante centrifugación a baja velocidad y recuperación del VSV en el sobrenadante. En una realización, la etapa (b) comprende el filtrado del sobrenadante a través de un filtro de 0,2 a 0,45 µm y la recuperación del VSV de la solución filtrada. En otra realización, la etapa (c) comprende la carga de la solución filtrada del VSV en un adsorbente de membrana de intercambio aniónico equilibrado con una primera solución salina de pH tamponado, la elución del VSV en un adsorbente de membrana de intercambio aniónico con una segunda solución salina de pH tamponado, y la recuperación de las fracciones eluidas del VSV. En una realización, la etapa (d) comprende la purificación del VSV recuperado mediante la filtración de flujo tangencial (TFF) utilizando una membrana de fibra hueca con un peso molecular límite entre 300 kDa y 1000 kDa, y la recuperación del VSV en el retenido. En una realización, la etapa (e) comprende el filtrado del retenido del VSV a través de un filtro de 0,2 a 0,22 µm y la recuperación del VSV en la solución filtrada.

En determinadas realizaciones, las células del cultivo celular de los mamíferos se seleccionan entre células embrionarias de riñón humano (HEK), células HEK 293, células ováricas de hamster chino (CHO), células renales de cría de hamster (BHK) y células renales de mono verde africano (AGMK), también conocidas como células Vero.

En determinadas realizaciones, la etapa de centrifugación a baja velocidad del procedimiento de purificación está entre 4400 x g y 8000 x g. En una realización particular, la centrifugación a baja velocidad es a 6238 x g.

En otra realización, el filtro de 0,2 a 0,45 µm es una unidad de filtrado Millex®-GV de Millipore, una unidad de filtrado Millex®-GP de Millipore, una unidad de filtrado Supor® de Pall, una unidad de filtrado Sartobran™ de Sartorius o una unidad de filtrado Sartopore™ 2 de Sartorius. En una realización particular, el filtro es una unidad de filtrado Sartobran de Sartorius de 0,2 µm.

En otras realizaciones, el adsorbente de membrana de intercambio aniónico es un adsorbente de membrana Sartobind™ Q de Sartorius o un adsorbente de membrana Mustang™ Q de Pall. En una realización particular, el adsorbente de membrana de intercambio aniónico es un adsorbente de membrana Mustang™ Q de Pall.

En otras realizaciones determinadas, la sal en la primera solución salina de pH tamponado en la etapa (c) es NaCl o KCl. En otra realización, la fuerza iónica del NaCl o del KCl es de 0,1 M a 0,4 M. En una realización particular, la sal es NaCl y la fuerza iónica del NaCl es 0,3 M.

En otra realización, la sal en la segunda solución salina de pH tamponado en la etapa (c) es NaCl o KCl. En una realización particular, la sal en la segunda solución salina de pH tamponado es NaCl. En una realización particular, la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado está entre 0,5 M y 0,75 M. En otra realización particular, la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado es 0,6 M. Aún en otras realizaciones, la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado es 0,75 M. En otras realizaciones determinadas, la segunda solución salina de pH tamponado tiene un caudal de elución de 10 volúmenes de cápsula/minuto (CV/minuto) a 30 CV/minuto. Aún en otras realizaciones, el caudal de elución es 20 CV/minuto.

En otras realizaciones determinadas, la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado aumenta linealmente de 0,001 M a 0,75 M con un caudal de elución de 10 CV/minuto a 30 CV/minuto. En una realización particular, el caudal de gradiente de elución lineal es 20 CV/minuto.

5 Aún en otras realizaciones, el primer y segundo tampones de la etapa (c) tienen un pKa entre 6,0 y 8,5. Todavía en otras realizaciones, la primera solución salina de pH tamponado de la etapa (c) tiene un pH de 6,5 a 8,0. En una realización particular, la primera solución salina de pH tamponado tiene un pH de 7,5. En otras realizaciones, la segunda solución salina de pH tamponado de la etapa (c) tiene un pH de 6,5 a 8,0. En una realización particular, la segunda solución salina de pH tamponado tiene un pH de 7,5.

10 En otras realizaciones determinadas, el primer y segundo tampones de la etapa (c) son tampón fosfato, tampón del ácido N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) o tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS). En otra realización, la primera y segunda soluciones salinas de pH tamponado de la etapa (c) comprenden adicionalmente sacarosa en una concentración de 1,5% a 5%. En una realización particular, la concentración de la sacarosa es del 2%.

15 En otras realizaciones determinadas, la membrana TFF tiene un peso molecular límite de 300 kDa. Aún en otras realizaciones, la membrana TFF tiene un peso molecular límite de al menos 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 850, 900, 950 o 1000 kDa. En una realización particular, la membrana TFF es un módulo de membrana de fibra hueca. En otra realización, la filtración TFF consta de la concentración del VSV recuperado en la etapa (c) al menos 5 veces, seguido de, al menos, un intercambio de tampón. Todavía en otra realización, la filtración TFF comprende la
20 concentración del VSV recuperado en la etapa (c) al menos 5 veces, seguido de, al menos, cinco intercambios de tampón. En una realización particular, la disolución tampón usada en el intercambio de tampón es un tampón fosfato, tampón HEPES o tampón TRIS, en el que el tampón tiene una concentración de 5 mM a 15 mM y un pH de 7,2 a 7,5. En otra realización, el tampón de intercambio de tampón adicionalmente comprende concentraciones entre 0,10 y 0,20 M de NaCl y de 3,5% a 4,5% de sacarosa.

25 En otras realizaciones, las etapas (a) a (e) de los procedimientos de purificación se llevan a cabo a temperatura ambiente, en la que la temperatura ambiente se define como la temperatura o las temperaturas en o alrededor de 15 °C a alrededor de 25 °C. En otra realización, las etapas (a) a (e) de los procedimientos de purificación se llevan a cabo a 20 °C.

30 Aún en otra realización, el aclarado del fluido del cultivo celular de la etapa (a) se lleva a cabo con un módulo de filtración en profundidad de 1,0 µm a 4,5 µm, en el que se omite la centrifugación a baja velocidad de la etapa (a). En realizaciones específicas, el módulo de filtración en profundidad es un módulo HD Polycap™ de Whatman®, un módulo P Sartoclear™ de Sartorius o un módulo HC Millistak +® de Millipore®.

35 En otro aspecto, se obtiene, a partir de cultivo celular de mamíferos, un VSV de mayor pureza. En determinadas realizaciones, el VSV purificado está libre de contaminantes de proteínas del cultivo celular y de ácidos nucleicos en al menos el 90,0%. En otras realizaciones, el VSV purificado está libre de contaminantes de proteínas de cultivo celular y de ácidos nucleicos en un 99,0%. En una realización particular, el VSV purificado está libre de contaminantes de proteínas del cultivo celular y de ácidos nucleicos en un 99,8%.

Se proporciona un VSV de mayor pureza, que se purifica y aísla de acuerdo con los nuevos procedimientos de purificación descritos en el presente documento.

40 El VSV purificado se caracteriza por una o más de las siguientes características: un serotipo de VSV seleccionado o una combinación de serotipos; una secuencia genómica que comprende, al menos, una mutación o, al menos, dos mutaciones, que atenúan la patogenicidad del VSV, una secuencia genómica que comprende una fase de lectura abierta (ORF) de una secuencia de polinucleótidos extraños, secuencia que codifica una o más variedades de proteínas (terapéuticas o inmunogénicas) enumeradas detalladamente en la parte detallada de la descripción de
45 la memoria descriptiva.

Otras características y ventajas de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se evidenciarán en la siguiente descripción detallada, en las realizaciones preferidas de los mismos y en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra los procedimientos de purificación (descrito en los recuadros negros) para la obtención del VSV de mayor pureza a partir del fluido de cultivo celular de mamíferos.

55 La Figura 2A es un gel de electroforesis que muestra la separación de las proteínas del VSV mediante tinción de plata tras la purificación con un adsorbente de membrana Mustang™ Q con un 2% de sacarosa añadida al tampón de la elución (fosfato sódico 10 mM, NaCl 1,0 M). Las calles 1-10 son: (1) precentrifugación (cultivo celular), (2) alimentación, (3) flujo continuo y lavado, (4) tampón B al 5% (fracciones 1-5), (5) tampón B al 60% (fracciones 6-7), (6) tampón B al 60% (fracciones 8-10), (7) tampón

B al 60% (fracciones 11-25), (8) tampón B al 100% (fracciones 26-35), (9) columna de regeneración y (10) estándares de Bio-Rad® Precision Plus Protein™. El caudal para la membrana Mustang™ Q fue 3,5 ml/minuto con un gradiente de elución lineal. El análisis con la electroforesis SDS-PAGE se hizo con un gel de tris-glicina del 4 al 20% y la detección de proteína se hizo mediante tinción de plata.

La Figura 2B es un gel electroforético que muestra la separación de las proteínas del VSV mediante transferencia de Western, de acuerdo con la descripción de la Figura 2A. La detección mediante transferencia de Western fue con anticuerpos policlonales anti-VSV.

La Figura 3A es un gel electroforético que muestra la separación de las proteínas del VSV mediante tinción de plata y transferencia de Western tras la purificación en un adsorbente de membrana Mustang™ Q sin sacarosa añadida al tampón de elución (fosfato sódico 10 mM, NaCl 1,0 M). Las calles 1-9 son: (1) alimentación, (2) flujo continuo y lavado, (3) tampón B al 5% (fracciones 1-5), (4) tampón B al 60% (fracciones 6-11), (5) tampón B al 60% (fracciones 12-25), (6) tampón B al 100% (fracciones 26-35), (7) estándares de Bio-Rad® Precision Plus Protein™, (8) VSV convencional (es decir, VSV purificado en gradiente de sacarosa) y (9) mezcla en la columna de regeneración. El caudal de la membrana Mustang™ Q fue 3,5 ml/minuto (10 CV/minuto) con una etapa de gradiente de elución. El análisis con electroforesis SDS-PAGE se hizo con gel de tris-glicina del 4 al 20% y la detección de proteína se hizo mediante tinción de plata.

La Figura 3B es un gel electroforético que muestra la separación de las proteínas del VSV mediante transferencia de Western tras la purificación como se describe en la Figura 3A. La detección mediante transferencia de Western se hizo con anticuerpos policlonales anti-VSV. El tampón B (también conocido como "tampón de elución") fue fosfato sódico 10 mM (pH 7,0) y NaCl 1M.

La Figura 4A es un análisis de SDS-PAGE (gel de tris-glicina del 4 al 20%) del VSV mediante la tinción de plata + coloidal en cada etapa del procedimiento de purificación descrito en la Figura 1. Las calles 1-12 son (1) precentrifugación, (2) post centrifugación (1º aclarado), (3) prefiltración de 0,2 µm, (4) post filtración de 0,2 µm (2º aclarado), (5) flujo continuo y mezcla de lavado a partir del adsorbente de membrana Mustang™ Q, (6) mezcla de las fracciones de elución del VSV a partir del adsorbente de membrana Mustang™ Q, (7) retenido del VSV a partir de la filtración de flujo tangencial (TFF) UF/DF, (8) mezcla de concentración y diafiltración, (9) prefiltración de 0,2 µm (final), (10) post filtración de 0,2 µm (final) (VSV concentrado a granel purificado), (11) estándares de Bio-Rad® Precision Plus Protein™ y (12) control del VSV (procedimiento N°3, concentrado a granel purificado).

La Figura 4B es un análisis de SDS-PAGE (gel de tris-glicina del 4 al 20%) del VSV mediante transferencia de Western de acuerdo con el procedimiento descrito en la Figura 4A.

La Figura 5A es una comparación de SDS-PAGE (gel de tris-glicina del 4 al 20%) mediante tinción de plata + coloidal del VSV purificado de acuerdo con el procedimiento expuesto en la Figura 1 frente al VSV purificado mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (calle 11). Las calles 1-12 son (1) fluido del cultivo celular, (2) post centrifugación (1º aclarado), (3) prefiltración de 0,2 µm, (4) post filtración de 0,2 µm (2º aclarado), (5) flujo continuo y mezcla de lavado a partir del adsorbente de membrana Mustang™ Q, (6) fracciones de elución del VSV a partir del adsorbente de membrana Mustang™ Q, (7) retenido del VSV a partir de la filtración de flujo tangencial TFF UF/DF, (8) prefiltración de 0,2 µm (final), (9) post filtración de 0,2 µm (final) (VSV concentrado a granel purificado), (10) estándares de Bio-Rad® Precision Plus Protein™, (11) VSV purificado mediante gradiente de sacarosa (solamente se añadió la mitad del volumen de la calle 9) y (12) control del VSV (procedimiento N°1, concentrado a granel purificado).

La Figura 5B es una comparación de SDS-PAGE (4-20% gel de tris-glicina) mediante transferencia de Western del VSV purificado de acuerdo con el procedimiento expuesto en la Figura 1 frente al VSV purificado mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (calle 11) como se describe en la Figura 5A.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de recuperación de título del VSV en la ejecución de los cuatro procedimientos a gran escala (4,5 l en volumen de cultivo celular). CR N°1 es el procedimiento experimental 1, CR N°2 es el procedimiento experimental 2, CR N°3 es el procedimiento experimental 3 y TT 01 es el procedimiento experimental 4.

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra la eliminación de la impureza de proteína en la etapa de purificación de Mustang™Q para el constructor VSV_{NJ}N4CT₁-gag1.

La Figura 8A es un gráfico de barras que muestra la recuperación del VSV_{NJ}N4CT₁-gag1 en la evaluación de las condiciones de TMAE a pH 6,5.

La Figura 8B es un gráfico de barras que muestra la recuperación del VSV_{NJ}N4CT₁-gag1 en la evaluación de las condiciones de TMAE a pH 7,0.

La Figura 8C es un gráfico de barras que muestra la recuperación del VSV_{NJ}N4CT₁-gag1 en la evaluación de las condiciones de TMAE a pH 7,5.

Descripción detallada de la invención

Ya que el virus de la estomatitis vesicular (VSV) tiene varias características que le hacen un vector atractivo para su uso en composiciones inmunogénicas y/o el transporte de proteínas terapéuticas para codificación de genes como se describe anteriormente, hay una necesidad de la técnica en desarrollo para los procedimientos de purificación que genere VSV recombinante de mayor pureza a partir de un cultivo celular de mamíferos. Las composiciones y procedimientos que se describen en lo sucesivo en el presente documento se dirigen esta necesidad. Como se establece más adelante en los Ejemplos 3-8, se describen de este modo procedimientos

mejorados para la purificación del VSV a partir de cultivo celular de mamíferos (por ejemplo, véase la Figura 1) y VSV purificado.

I. PRODUCCIÓN DEL VSV A PARTIR DE UN CULTIVO CELULAR DE MAMÍFEROS

5 La producción del VSV a partir un cultivo celular de mamíferos se conoce bien por los expertos en la materia, y generalmente incluye la infección del cultivo celular (célula huésped) con VSV recombinante, crecimiento del VSV en el cultivo celular y recolección del cultivo celular en el momento adecuado. Como el VSV se secreta desde la célula huésped a los medios, el producto del VSV se recoge del fluido del cultivo celular.

10 La producción del VSV a partir un cultivo celular de mamíferos, y de esta manera los nuevos procedimientos para la purificación del VSV derivado de los mismos como se describen en el presente documento, emplean cultivos celulares de mamíferos adecuados usados para la propagación (o crecimiento) del VSV (virus de ARN monocatenario no segmentado de sentido negativo), que se conocen en la técnica. Tales cultivos celulares incluyen, pero no se limitan a, las células embrionarias de riñón humano (HEK) tales como las células HEK 293, las células renales de mono verde africano (AGMK) tales como las células Vero, las células ováricas de hamster chino (CHO) y las células renales de cría de hamster (BHK).

15 Adicionalmente, alguien experto en la materia conoce bien los materiales, procedimientos y técnicas de cultivo celular. Por ejemplo, una reserva de semillas de VSV recombinante (por ejemplo, un VSV rescatado, véase la sección II más adelante) se usa para infectar una población confluyente de células huésped o una población de células huésped con una determinada densidad (por ejemplo, un cultivo celular de Vero) en un biorreactor con una multiplicidad de infección determinada, el VSV crece en un cultivo celular durante un tiempo y temperatura
20 determinados; y la progenie naciente del VSV se recolecta en el fluido del cultivo celular. Como se define en lo sucesivo en el presente documento, los términos "fluido del cultivo", "fluido del cultivo celular", "medios de cultivo celular", "medios," y/o "fluido del biorreactor" se usan indistintamente y se refieren a los medios o soluciones en los que crece el cultivo celular.

II. PURIFICACIÓN DEL VSV A PARTIR DE UN CULTIVO CÉLULAR DE MAMÍFERO

25 Los nuevos procedimientos de purificación del VSV a partir del fluido del cultivo celular de mamíferos infectado con VSV descritos en el presente documento comprenden determinadas etapas de purificación. El diagrama de flujo de la Figura 1 describe el esquema global de purificación, que incluye las etapas (a) aclarado primario, (b) aclarado secundario, (c) adsorción de membrana de intercambio aniónico, (d) filtración de flujo tangencial y (e)
30 filtración. Más concretamente, tales etapas comprenden (a) aclarado del fluido del cultivo celular mediante la centrifugación a baja velocidad, (b) aclarado adicional del sobrenadante por filtración a través de un filtro de 0,2 a 0,45 μm , (c) purificación de la solución filtrada del VSV sobre un adsorbente de membrana de intercambio aniónico, (d) intercambio del tampón y concentración del VSV mediante la filtración de flujo tangencial (TFF) y (e) una filtración final del retenido del VSV a través de un filtro de 0,2 a 0,22 μm . En otras realizaciones determinadas, las etapas del procedimiento de purificación (a) a (e) anteriores se llevan a cabo a temperatura ambiente. Tal y como se
35 define en lo sucesivo en el presente documento, "temperatura ambiente" es una temperatura o temperaturas de o alrededor de 15 °C a 25 °C. De esta manera, por ejemplo, una temperatura adecuada para llevar a cabo las etapas (a) a (e) incluye una temperatura de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e incluyendo 25 °C, o temperaturas fraccionarias entre las mismas. En una realización particular, las etapas del procedimiento de purificación (a) a (e) se llevan a cabo a 20 °C.

40 (a) Aclarado Primario

En determinadas realizaciones, el fluido del cultivo celular de un cultivo celular de mamífero infectado con el VSV se aclara mediante la centrifugación a baja velocidad (o alternativamente, mediante la filtración en profundidad) y el VSV se recupera del sobrenadante, también referido en el presente documento como "aclarado primario" (o 1^o)
45 del fluido del cultivo celular. En determinadas realizaciones, el aclarado primario del fluido del cultivo celular se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Un experto en la materia conoce bien los procedimientos y equipos de centrifugación usados en el aclarado primario del fluido del cultivo celular. Como se define en lo sucesivo en el presente documento, la centrifugación a "baja velocidad" es una velocidad de centrifugación por debajo de 10000 rpm. En determinadas realizaciones, la centrifugación a baja velocidad usada para aclarar el fluido del cultivo celular es una velocidad de centrifugación que
50 oscila en el intervalo entre 4000 x g (± 100 x g) y 8000 x g (± 100 x g). En otras realizaciones determinadas, la velocidad de la centrifugación a baja velocidad usada para aclarar el fluido del cultivo celular es una velocidad de centrifugación de al menos 4000 x g, 4500 x g, 5000 x g, 5500 x g, 6000 x g, 6500 x g, 7000 x g, 7500 x g y 8000 x g o rpms entre las mismas. En una realización particular, el aclarado primario del fluido del cultivo celular mediante centrifugación a baja velocidad es de 6238 x g durante treinta minutos a temperatura ambiente (Ejemplo 3, Tabla 2).

55 Como se indicó anteriormente, en determinadas realizaciones, el fluido del cultivo celular de un cultivo celular de mamífero infectado con el VSV se aclara alternativamente (1^o) mediante filtración en profundidad (es decir, en lugar de mediante centrifugación a baja velocidad). La filtración en profundidad se puede usar cuando la centrifugación a baja velocidad se omite en la etapa (a) de aclarado primario. La filtración en profundidad (a

diferencia de la filtración en superficie) se refiere generalmente a un filtro "grosso" que atrapa los contaminantes dentro de su estructura. Un experto en la materia conoce bien los materiales y procedimientos usados en la filtración en profundidad. Por ejemplo, el material usado como filtro se compone generalmente de una estructura de celulosa espesa y fibrosa con coadyuvantes de filtración inorgánicos tales como partículas de tierra de diatomeas incrustadas en las aberturas de las fibras. Este material usado como filtro tiene una gran área de superficie interna, que es clave en la captura de la partícula y en la capacidad de filtración. Tales módulos de filtración en profundidad contienen poros de tamaño de diámetro de o entre 1,0 μm y 4,5 μm , incluyendo tamaños de filtro de al menos 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 y 4,5 μm , y tamaños de filtro fraccionarios entre los mismos. Ejemplos de módulos de filtración en profundidad incluyen, pero no se limitan a, módulos HD Polycap™ de Whatman® (Whatman Inc.; Florham Park, NJ), módulos P Sartoclear™ de Sartorius (Sartorius Corp.; Edgewood, NY) y módulos HC Millistak+® de Millipore® (Millipore; Billerica, MA). En una realización particular, el fluido del cultivo celular se aclara mediante filtración en profundidad (llevada a cabo a temperatura ambiente) y el VSV se recupera en el filtrado (Ejemplo 3, Tabla 1).

(b) Aclarado Secundario

Después de un aclarado primario por medio de centrifugación (o filtración en profundidad), el VSV sobrenadante (o filtrado) se aclara adicionalmente (2°) mediante filtración o microfiltración a través de un filtro de 0,2 a 0,25 μm y se recupera el VSV en la solución filtrada. En una realización particular, la microfiltración se lleva a cabo a temperatura ambiente, como se definió anteriormente. Los medios de filtración/microfiltración están disponibles en una amplia variedad de materiales y procedimientos de fabricación, que son conocidos por alguien experto en la materia. Ejemplos de unidades de filtrado para microfiltración incluyen, pero no se limitan a, unidades de filtrado Millex®-GV de Millipore (Millipore; Billerica, MA), unidades de filtrado Millex®-GP de Millipore, unidades de filtrado Stupor® de Pall (Pall Corp.; East Hills, NY), unidades de filtrado Sartobran™ de Sartorius (Sartorius Corp.; Edgewood, NY) y unidades de filtrado Sartopore™ 2 de Sartorius. En determinadas realizaciones, estas unidades de filtración poseen filtros de un tamaño entre 0,2 y 0,45 μm . Estos filtros incluyen filtros con poros de al menos 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4 y 0,45 μm y tamaños de poro fraccionarios entre los mismos. En una realización particular, el filtro es una unidad de filtrado "Sartobran de Sartorius" de 0,2 μm . El VSV filtrado se recupera en la solución filtrada.

(c) Membrana de Adsorción de Intercambio Iónico

Una vez que el producto del VSV se ha recuperado mediante aclarado (*es decir*, 1° y 2° descritos anteriormente), el VSV se purifica adicionalmente con un adsorbente de membrana de intercambio aniónico. Los adsorbentes de membrana son conocidos por alguien experto en la materia y los comercializan proveedores como Sartorius Corp. (Edgewood, NY), Pall Corp. (East Hills, NY) y Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Ejemplos de adsorbente de membrana de intercambio aniónico incluyen, pero no se limitan a un adsorbente de membrana Sartobind™ Q (Sartorius Corp.) y un adsorbente de membrana Mustang™ Q (Pall Corp.). En una realización particular, el adsorbente de membrana de intercambio aniónico es un adsorbente de membrana Mustang™ Q de Pall. En general, los procedimientos y tampones conocidos en cromatografía de intercambio iónico convencional se pueden aplicar directamente a la cromatografía de adsorbente de membrana, los cuales son conocidos por alguien experto en la materia. En determinadas realizaciones, la cromatografía de adsorbente de membrana de intercambio aniónico se lleva a cabo a la temperatura ambiente, como se definió anteriormente.

De esta manera, en determinadas realizaciones, el VSV se purifica a través de un adsorbente de membrana de intercambio aniónico, en las que la solución filtrada del VSV en el aclarado secundario se carga sobre un adsorbente de membrana de intercambio aniónico equilibrado con una primera solución salina de pH tamponado (también citada como "tampón de equilibrado" o "tampón de unión" de VSV). El VSV se eluye en el adsorbente de membrana de intercambio aniónico con una segunda solución salina de pH tamponado ("tampón de elución") y se recuperan las fracciones del VSV eluidas (por ejemplo, véase ejemplo 6 más adelante).

En determinadas realizaciones, la primera solución salina de pH tamponado o tampón de equilibrado es una solución salina de NaCl o KCl. El NaCl o KCl está presente en la solución con una fuerza iónica entre al menos alrededor de 0,1 M y alrededor de 0,4 M. De esta manera, las fuerzas iónicas de las sales incluyen al menos 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 M incluyendo fuerzas iónicas fraccionarias entre las mismas. En una realización particular, la sal es NaCl y la fuerza iónica de la solución de NaCl es 0,3 M. La solución tampón puede ser un tampón fosfato, un tampón de ácido N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) o un tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS). En determinadas realizaciones, estos tampones tienen un pH entre alrededor de 6,0 y alrededor de 8,0, *es decir*, un pH de al menos 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, y 8,0 o valores de pH entre los mismos. En una realización particular, la primera solución salina de pH tamponado tiene un pH de 7,5. Aún en otras realizaciones, el primer tampón de la etapa de adsorción de la membrana de intercambio aniónico tiene un pKa entre 6,0 y 8,5, *es decir*, un pKa de al menos 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2, 8,4 y 8,5 o números de pKa entre los mismos.

En realizaciones particulares, el tampón de equilibrado comprende adicionalmente alrededor de un 1% de sacarosa hasta aproximadamente un 5% de sacarosa. En determinadas realizaciones, el tampón de equilibrado comprende aproximadamente un 1% de sacarosa. En una realización particular, la concentración de sacarosa es del 2%. En otra realización el tampón comprende aproximadamente un 3% de sacarosa. En otra realización el tampón

comprende aproximadamente un 4% de sacarosa. En otra realización el tampón comprende aproximadamente un 5% de sacarosa. Con todo, son útiles otros porcentajes de concentración de sacarosa entre los descritos anteriormente.

5 La segunda solución salina de pH tamponado (el "tampón de elución") puede comprender también los mismos componentes usados como tampón en el primer tampón (tampón de equilibrado). En determinadas realizaciones, la segunda solución salina de pH tamponado o tampón de equilibrado es una solución salina de NaCl o KCl. En una realización particular, la sal de la segunda solución salina de pH tamponado es NaCl. El NaCl o KCl está presente en la solución con una fuerza iónica entre al menos aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 0,4 M. De esta manera las fuerzas iónicas de las sales incluyen al menos 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 M incluyendo fuerzas iónicas fraccionarias entre las mismas. En una realización particular, la sal es NaCl y la fuerza iónica de la solución de NaCl es 0,3 M. La solución tampón puede ser un tampón fosfato, un tampón de ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) o un tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS). En determinadas realizaciones, estos tampones tienen un pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0, es decir, un pH de al menos 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, y 8,0 o valores de pH entre los mismos. En una realización particular, la segunda solución salina de pH tamponado tiene un pH de 7,5. Aún en otras realizaciones, el segundo tampón de la etapa de adsorción de la membrana de intercambio aniónico tiene un pKa entre 6,0 y 8,5, es decir, un pKa de al menos 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2, 8,4 y 8,5 o números de pKa entre los mismos.

20 En realizaciones particulares, el tampón de elución comprende adicionalmente alrededor de un 1% de sacarosa hasta aproximadamente un 5% de sacarosa. En determinadas realizaciones, el tampón de elución comprende aproximadamente un 1% de sacarosa. En una realización particular, la concentración de sacarosa es del 2%. En otra realización el tampón comprende aproximadamente un 3% de sacarosa. En otra realización el tampón comprende aproximadamente un 4% de sacarosa. En otra realización el tampón comprende aproximadamente un 5% de sacarosa. Con todo, son útiles otros porcentajes de concentración de sacarosa entre los descritos anteriormente.

25 Para la elución del VSV a través de la membrana, la concentración (fuerza iónica) de la sal (NaCl o KCl) del tampón de elución se incrementa mediante un gradiente lineal o con un procedimiento de elución en una única etapa (ejemplo 6). Ambas etapas son igualmente eficaces en la elución del VSV del adsorbente de membrana de intercambio aniónico. En una realización particular, la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado está entre 0,5 M y 0,75 M. En otra realización particular, la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado es 0,6 M. Aún en otras realizaciones, a fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado es 0,75 M.

30 En otras realizaciones determinadas, la segunda solución salina de pH tamponado tiene un caudal de elución de 10 volúmenes de cápsula/minuto (CV/minuto) a 30 CV/minuto. De esta manera, en determinadas realizaciones, el caudal de elución es al menos 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 a 30 CV/minuto, o cantidades entre los mismos. En una realización particular, el caudal de elución es 20 CV/minuto.

En otras realizaciones determinadas, la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado se aumenta linealmente de 0,001 M a 0,75 M con un caudal de elución de 10 CV/minuto a 30 CV/minuto como se describió anteriormente. En una realización particular, el caudal del gradiente de elución lineal es 20 CV/minuto.

(d) Filtración de Flujo Tangencial (TFF)

40 Tras la purificación del VSV mediante cromatografía de adsorción de membrana de intercambio aniónico, el VSV se purifica adicionalmente mediante la filtración de flujo tangencial (TFF). En general, la filtración de flujo tangencial TFF es un procedimiento dirigido por presión que usa una membrana o membranas para separar los componentes en una solución líquida (o suspensión), en el que un fluido (el flujo de alimentación) se bombea tangencialmente a lo largo de la superficie de la membrana y una presión aplicada sirve para forzar a una "parte" del fluido a través de la membrana hacia el lado del filtrado (de la membrana). En determinadas realizaciones, la filtración de flujo tangencial (TFF) se lleva a cabo a temperatura ambiente. En este procedimiento, el tampón se intercambia y se concentra el VSV. En una realización, la filtración de flujo tangencial (TFF) comprende la concentración del VSV recuperado en la etapa de adsorción de membrana de intercambio aniónico al menos 5 veces, seguido de, al menos, un intercambio de tampón. En otra realización, la filtración de flujo tangencial (TFF) comprende la concentración del VSV recuperado en la etapa de adsorción de membrana de intercambio aniónico al menos de cinco a diez veces, seguido de, al menos, cinco, o al menos seis, intercambios de tampón. Todavía otras realizaciones suponen al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis intercambios de tampón siguiendo a la concentración del VSV recuperado en la etapa de adsorción de membrana de intercambio aniónico.

55 Alguien experto en la materia conoce bien los materiales (por ejemplo, *fibra hueca*, espirales, placa plana) y los procedimientos (por ejemplo, ultrafiltración (UF), diafiltración (DF), microfiltración) para la filtración de flujo tangencial (TFF). En determinadas realizaciones, la membrana para la filtración de flujo tangencial (TFF) tiene un peso molecular límite de 300 kDa. En determinadas realizaciones, la membrana para la filtración de flujo tangencial (TFF) tiene un peso molecular límite de 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 o 700 kDa. Aún en otra

realización, la membrana para la filtración de flujo tangencial (TFF) tiene un peso molecular límite de 750 kDa. En una realización, la membrana para la filtración de flujo tangencial (TFF) es un módulo de membrana de fibra hueca.

5 En una realización particular, el tampón usado en el intercambio de tampón para la filtración de flujo tangencial (TFF) es un tampón fosfato, un tampón HEPES o un tampón TRIS como se describió anteriormente. Sin embargo, en determinadas realizaciones, el tampón tiene una concentración de 5 mM a 15 mM, incluyendo concentraciones de, al menos, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM, 10mM, 11mM, 12mM, 13mM, 14mM y 15mM, e incluyendo adicionalmente concentraciones en mM entre las mismas. En determinadas realizaciones, el tampón tiene un pH entre aproximadamente 7,2 y 7,5. De esta manera, en una realización, el tampón tiene un pH de 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5 o
10 valores fraccionarios de pH entre los mismos. En otra realización, el tampón de intercambio de tampón comprende adicionalmente una concentración entre 0,10 M y 0,20 M de NaCl y entre el 3.5% y 4.5% de sacarosa.

En una realización particular (véase el ejemplo 7), se mezclan fracciones del VSV por purificación del adsorbente de membrana de intercambio aniónico, y la solución mezclada se concentra y el tampón se intercambia mediante TFF usando un filtro de cartucho de membrana de TFF de fibra hueca con un peso molecular límite de 750 kDa
15 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.; Piscataway, NJ).

(e) Filtración

La última etapa del procedimiento de purificación es una microfiltración del retenido del VSV mediante la filtración de flujo tangencial (TFF), en la que el retenido se filtra a través de un filtro de 0,2 a 0,25 µm, como se describió anteriormente para el aclarado secundario mediante microfiltración y descrito adicionalmente más adelante en el Ejemplo 7. Por ejemplo, tal conjunto para filtración puede emplear un filtro de tamaños 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 o 0,25 µm, o tamaños fraccionarios entre los mismos.
20

La purificación del VSV de acuerdo con el nuevo procedimiento descrito en el presente documento, se describe posteriormente al detalle en los ejemplos, cuya descripción incluye el aclarado primario (Ejemplo 3) y secundario (Ejemplo 4) del líquido del cultivo, que comprende una centrifugación a baja velocidad (o filtración en profundidad) y una filtración entre 0,2-0,45 µm, respectivamente. Siguiendo a las etapas de aclarado, el VSV se purifica adicionalmente en modo secuencial mediante un adsorbente de membrana de intercambio aniónico (Ejemplo 6); filtración de flujo tangencial; ultrafiltración y diafiltración (Ejemplo 7) y una filtración entre 0,2-0,22 µm (Ejemplo 7). También se purificaron cuatro procedimientos (procedimientos a gran escala) de cultivo celular del VSV a gran escala (4,5 l) de acuerdo con el nuevo procedimiento descrito en el presente documento (Ejemplo 8), en el que se eliminaron durante la purificación impurezas de proteína (Tabla 11) y ADN (Tabla 13) mayores que el 99.9% y el 99.8%, respectivamente.
25
30

III. VIRUS RECOMBINANTE DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Como se describió en el presente documento, los virus VSV de mayor pureza se obtienen a partir del cultivo celular de mamíferos mediante el uso de los nuevos procedimientos de purificación descritos anteriormente. Por "mayor pureza" se quiere decir que el VSV purificado está libre de proteínas del cultivo celular y de contaminantes de ácidos nucleicos en, al menos, un 90,0%. En otras realizaciones, el VSV de mayor pureza está libre de proteínas del cultivo celular y de contaminantes de ácidos nucleicos en un 99,0%. En una realización particular, el VSV de mayor pureza está libre de proteínas del cultivo celular y de contaminantes de ácidos nucleicos en un 99,8%.
35

En realizaciones particulares, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) purificado a partir del fluido de cultivo celular del cultivo celular de mamíferos mediante el procedimiento descrito anteriormente es un virus VSV recombinante o genéticamente modificado. Los procedimientos para la producción de virus de ARN recombinante, tales como el VSV, se conocen bien y se mencionan en la técnica como procedimientos de "rescate" o de "genética inversa". Ejemplos de procedimientos de rescate del VSV incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.033.886 y en la Patente de Estados Unidos N° 6.168.943. Técnicas adicionales para dirigir el rescate de virus, tales como el VSV, se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.673.572 y en el Documento WO 2004/113517.
40
45

El VSV de mayor pureza, el cual se purifica y aísla de acuerdo con los nuevos procedimientos de purificación descritos en el presente documento, puede ser un VSV de un serotipo específico. En determinadas realizaciones, el virus del VSV purificado es un serotipo Indiana, un serotipo New Jersey, un serotipo San Juan, un serotipo Isfahan, un serotipo Glasgow o un serotipo Chandipura. En determinadas realizaciones, el virus VSV puede contener secuencias de más de un serotipo.
50

Los vectores del VSV (y las composiciones inmunogénicas del mismo) purificados de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento a menudo comprenden una o más mutaciones atenuadas dentro del genoma del virus VSV. En determinadas realizaciones, el VSV purificado tiene una secuencia genómica que comprende, al menos, una mutación que atenúa la patogenicidad del VSV. En otras realizaciones, el VSV purificado tiene una secuencia genómica que comprende, al menos, dos mutaciones que atenúan la patogenicidad del VSV. Por ejemplo, un virus VSV atenuado comprende dos o más mutaciones atenuantes
55

conocidas, tales como las mutaciones atenuantes expuestas en la Solicitud de Patente Internacional N°. PCT/US2005/011499 (Publicación de Patente Internacional N° WO 2005/098009). Por ejemplo, las mutaciones atenuantes del VSV conocidas incluyen, pero no se limitan a, mutaciones por combinación de genes (incluidas las combinaciones de los genes del VSV que forman el genoma del VSV y que se designan como N, P, M, G y L), mutaciones insercionales de la proteína G, mutaciones por truncamiento de la proteína G, mutaciones (ts) sensibles a la temperatura (y otras mutaciones puntuales), mutaciones no citopáticas del gen M, mutaciones G troncales, mutaciones de ARN en ambos sentidos y mutaciones con supresión de genes, cada una de las cuales se explican detalladamente en la Publicación Internacional N° WO 2005/098009. De esta manera, en determinadas realizaciones, el VSV purificado comprende una o más mutaciones atenuadas, incluyendo, sin limitación alguna, una mutación sensible a la temperatura (ts), una mutación puntual, una mutación por combinación de genes, una mutación G troncal, una mutación no citopática del gen M, una mutación de ARN en ambos sentidos, una mutación por truncamiento del gen G, una mutación insercional del gen G y una mutación por supresión genética.

En determinadas realizaciones, un virus VSV purificado mediante el procedimiento de purificación descrito en el presente documento tiene una secuencia genómica que comprende una o más secuencias de polinucleótidos extraños o heterólogos (o ajenos), tales como una fase de lectura abierta (ORF) del ARN ajeno. Las secuencias de polinucleótidos heterólogos pueden variar como se desee, e incluyen, pero no se limitan a, un gen que codifica un citoquina (como una interleuquina), un gen que codifica del epítipo de ayuda T, un gen que codifica el epítipo CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor, un gen que codifica un marcador de restricción, un gen que codifica una proteína terapéutica o una proteína de un patógeno microbiano diferente (por ejemplo, virus, bacteria, parásitos u hongos), especialmente proteínas capaces de provocar respuestas inmunes deseables. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos heterólogos que codifican una proteína de un patógeno microbiano diferente pueden ser uno o más genes del VIH, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen CMV, un gen del virus Epstein-Barr, un gen del virus Varicella-Zoster, un gen del virus de las paperas, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de la gripe, un gen del poliovirus, un gen del rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubeola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus Ebola, un gen del virus papiloma, un gen del virus polioma, un gen metaneumovirus, un gen coronavirus, un gen *Vibrio cholerae*, un gen de *Streptococcus pneumoniae*, genes de *Streptococcus pyogenes*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis* (llamado meningococo), un gen de *Neisseria gonorrhoeae* (llamado gonococo), un gen de *Corynebacteria diphtheriae*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, y un gen de *Escherichia coli*. En determinadas realizaciones, el VSV purificado comprende una secuencia genética del VIH, en la que la secuencia del VIH se selecciona del grupo que consiste en *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*. En una realización específica, el gen del VIH es *gag* o *env*.

En otras realizaciones determinadas, el VSV purificado contiene al menos una mutación atenuante y al menos un heterólogo ORF descrito anteriormente. Por ejemplo, la composición inmunogénica del VSV (es decir, VSV_{IN}N4CT₉-*gag*1) purificada de acuerdo con los nuevos procedimientos y que se ejemplifican posteriormente en la Sección V (Ejemplos 2-8), es un VSV recombinante que comprende dos mutaciones atenuantes y un ORF que codifica la proteína HIV-1 *gag*.

En otras realizaciones, el VSV purificado de acuerdo con los nuevos procedimientos descritos en el presente documento codifica el gen HIV *gag*, en el que el gen *gag* se inserta en el genoma del VSV en la posición uno (3'-*gag*₁-NPMGL-5'), posición dos (3'-N-*gag*₂-PMGL-5'), posición tres (3'-NP-*gag*₃-MGL-5'), posición cuatro (3'-NPM-*gag*₄-GL-5'), posición cinco (3'-NPMG-*gag*₅-L-5') o posición seis (3'-NPMGL-*gag*₆-5'). En otras realizaciones, el VSV purificado de acuerdo con los nuevos procedimientos descritos en el presente documento codifica el gen HIV *env*, en el que el gen *env* se inserta en el genoma del VSV en la posición uno (3'-*env*₁-NPMGL-5'), posición dos (3'-N-*env*₂-PMGL-5'), posición tres (3'-NP-*env*₃-MGL-5'), posición cuatro (3'-NPM-*env*₄-GL-5'), posición cinco (3'-NPMG-*env*₅-L-5') o posición seis (3'-NPMGL-*env*₆-5').

Alguien experto en la materia comprendería con la descripción anterior que se pueden diseñar y purificar una diversidad de VSV recombinante de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente.

50 IV. COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y FARMACÉUTICAS

Las composiciones inmunogénicas comprenden una dosis inmunogénica de un VSV modificado genéticamente y purificado de acuerdo con los procedimientos de purificación descritos en el presente documento. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un VSV recombinante purificado de acuerdo con los procedimientos de purificación descritos en el presente documento, en el que el VSV comprende una o más secuencias de ARN ajeno insertadas dentro o sustituyendo una región del genoma del VSV que no es esencial para la replicación. Cualquiera de las realizaciones del VSV recombinante descritas en la Sección III anterior se pueden emplear en estas composiciones inmunogénicas. De esta manera, una composición inmunogénica purificada del VSV se formula para su administración en un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano).

Tales composiciones comprenden generalmente el vector purificado del VSV y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en lo sucesivo en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente

aceptable" tiene por objeto incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores isotónicos y de absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Se conoce bien en la técnica el uso de tales medios y agentes en sustancias activas farmacéuticamente. Excepto desde el momento en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el vector del VSV, tales medios se usan en las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos adicionales.

De esta manera, una composición inmunogénica del VSV descrita en el presente documento se formula para que sea compatible con su pretendida vía de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen la parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal) y a través de la mucosa (por ejemplo, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal, respiratoria). Las soluciones o suspensiones usadas para su aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea incluyen los componentes siguientes: un diluyente estéril como el agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como el ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro sódico o la dextrosa. El pH se ajusta con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o el hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede presentar como ampollas, jeringas desechables o ampollas de dosis múltiples hechas de cristal o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero salino fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o tampón salino de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y se debe proteger de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo es un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se mantiene, por ejemplo, usando un recubrimiento como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se consigue con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y similares. En algunos casos, es preferible incluir en la composición, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como el manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato aluminico y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el vector del VSV en la cantidad requerida (o dosis) a un disolvente adecuado con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguido de una esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional que se desee de una solución estéril previamente filtrada de los mismos.

Para la administración por inhalación, los compuestos se presentan en forma de un aerosol nebulizador en un depósito a presión o dispensador que contenga un propelente adecuado (por ejemplo, un gas tal como el dióxido de carbono o un nebulizador). La administración sistémica también se puede hacer por medios mucosales o transdérmicos. Para la administración transdérmica o a través de la mucosa, se usan en la formulación agentes penetrantes adecuados para la barrera a permeabilizar. Tales agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración a través de la mucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácidos fusídicos. La administración a través de la mucosa se consigue con el uso de nebulizadores nasales o supositorios. Los compuestos también se preparan en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales de supositorio tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención de uso rectal.

Es ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en una forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en lo sucesivo en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas idóneas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéuticamente requerido. La memoria descriptiva para las formas de unidad de dosificación descritas en el presente documento se dictan y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes a la técnica de la composición tales como un compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia, y cuando sucede de otra manera se describen en detalle. Los ejemplos siguientes se presentan con propósitos ilustrativos, y no se deberían interpretar limitando de ninguna manera el ámbito de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento. Los ejemplos 1 y 2 conciernen a los tres constructores del VSV que se ejemplifican. Los ejemplos 3-9 se refieren específicamente al constructor VSV_{IN} N4CT₉-gag1. Los ejemplos 10 - 11 se refieren específicamente al constructor VSV N4CT₁-gag1. El ejemplo 12 se refiere específicamente al constructor VSV_{NJ} N4CT₁-gag1.

Un virus VSV recombinante (serotipo Indiana; rVSV_{IN}) purificado en los ejemplos siguientes comprende el gen gag del HIV en la primera posición del genoma del VSV (gag1), y el gen N combinado de modo aleatorio en la cuarta posición del genoma del VSV (N4). En una construcción, el VSV tiene un gen G con una cola citoplasmática truncada ("CT₉"), en la que este constructor se denominó como "VSV_{IN} N4CT₉-gag1". En otra construcción, el VSV tiene un gen G con una cola citoplasmática truncada ("CT₁"), en la que este constructor se denominó como "VSV_{IN} N4CT₁-gag1". En otros ejemplos, un VSV recombinante (serotipo New Jersey; rVSV_{NJ}) purificado en los ejemplos siguientes comprende el gen gag del virus VIH en la primera posición del genoma del VSV (gag1), el gen N combinado de modo aleatorio en la cuarta posición del genoma del VSV (N4) y un gen G con una cola citoplasmática truncada ("CT₁"), en los que este constructor se denominó como "VSV_{NJ} N4CT₁-gag1". Estas construcciones y mutaciones se detallan en la Publicación de la Patente Internacional N° WO 2005/098009.

Sin embargo, los nuevos procedimientos de purificación descritos en el presente documento no se limitan en modo alguno a una construcción específica o serotipo del rVSV (por ejemplo, Indiana, New Jersey, etc.), y como tal, estos procedimientos de purificación incluyen la purificación de los constructores del VSV que comprenden secuencias genómicas de tipo silvestre, secuencias genómicas atenuadas, secuencias de ácido nucleico "extraño" o cualquier combinación de las mismas (por ejemplo, véase la Sección III anterior para una visión de conjunto de tales constructores del VSV). Además, se conocen bien los procedimientos para producir virus de ARN "recombinante" y en la técnica hacen referencia a procedimientos de "rescate" o de "genética inversa". Se describen ejemplos de procedimientos de rescate del VSV recombinante posteriormente en la Sección III.

Los siguientes ejemplos describen la purificación del rVSV (como se ejemplifica con el constructor del VSV_{IN} N4CT₉-gag1, del VSV_{IN} N4CT₁-gag1 o del VSV_{NJ} N4CT₁-gag1) de las células Vero. Sin embargo, los procedimientos de purificación del VSV expuestos en el presente documento se aplican igualmente para la purificación del VSV a partir de cualquier cultivo celular adecuado de mamífero, incluyendo, pero no limitado a células renales embrionarias humanas (HEK) (por ejemplo, células HEK 293), células ováricas de hamster chino (CHO) y células renales de cría de hamster (BHK).

Ejemplo 1: ensayos de potencia para proteína, ADN y VSV

Los siguientes ensayos se utilizaron para evaluar los procedimientos de purificación descritos en el presente documento a continuación en los Ejemplos 2-12.

Concentración Total de Proteína. La concentración total de proteína se determinó usando el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA) con albúmina de suero bovino (BSA) como proteína convencional.

Análisis mediante SDS-PAGE y transferencia de Western. Para la separación y detección de las proteínas, se mezclaron muestras del VSV con una muestra de tampón de triglicina con una relación de 1:1 (para el constructor VSV_{IN} N4CT₉-gag1) o 3:1 (para el constructor VSV_{IN} N4CT₁-gag1), hervido durante diez minutos a 100 °C, y se resolvieron mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico y tris glicina entre el 4 y el 20%, seguido de una doble tinción de plata (Wako Chemicals USA, Inc.; Richmond, VA) y una tinta coloidal Coomassie® Blue (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA). La sensibilidad a la doble tinción hizo posible la fácil detección de impurezas de alto peso molecular en las muestras del VSV.

Tras la electroforesis en gel, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences Corp.; Piscataway, NJ). Tras el bloqueo durante una hora en una solución tampón tris salino (TBS) con un contenido del 3% de BSA, se incubó la membrana en una solución de anticuerpos (BSA al 1% en TBS con un 0,05% de Tween-20 (TTBS) que contenía anticuerpos anti-VSV policlonales de conejo producidos a partir de células BHK, 1:1000 v/v), y probado con anticuerpos anti-conejo, generados en cabra, conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, 1:1000 (v/v)) (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA). Tras un lavado con TTBS y TBS, se añadieron los reactivos de desarrollo de color HRP para la detección (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA), y la reacción se desactivó (mediante "quenching") con agua destilada. El gel teñido y la membrana desarrollada se capturaron mediante un sistema de formación de imágenes Alphamager® (Alpha Innotech Corp.; San Leandro, CA) con un software AlphaEaseFC®.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Exclusión Molecular (SE-HPLC). Se desarrolló un protocolo para la cromatografía de exclusión por tamaño molecular para separar rápidamente el VSV de las impurezas de proteínas, permitiendo de ese modo un análisis cualitativo del procedimiento de purificación del VSV. De esta

manera, las muestras del VSV "en procedimiento" (100 μ l) y la mayor parte del VSV concentrado a granel purificado (100 μ l) se cargó en una columna analítica de exclusión molecular (columna TSK-Gel PW G6000PW_{XL}, tamaño de partícula 17 μ , tamaño de poro 1000 Å) (Tosho Biosciences LLC; Montgomeryville, PA), equilibrado con una disolución tampón PBS (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺) y se desarrolló con un caudal de un ml por minuto. El sistema
5 funcionaba con una bomba de liberación del disolvente Agilent 1100™ controlada con un software ChemStation™ (Agilent Technologies Inc.; Palo Alto, CA). Los espectros UV se registraron mediante un ensayo por detección con fotiodo y se obtuvieron los cromatogramas por monitorización de los cambios en la absorbancia UV a 215 nm.

Ensayos de Potencia para el virus VSV. Se cuantificó la potencia del VSV mediante dos procedimientos distintos, un ensayo de placa tradicional y un ensayo como la inmunofluorescencia de placa. Para el ensayo de placa
10 tradicional, se sembraron las células Vero en un Medio Basal de Eagle o DMEM + FBS al 10% (Suero fetal bovino), en placas de seis pocillos, con una concentración de 1×10^6 células/pocillo (con dos ml de cultivo celular/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37 °C. Se comprobaron las células a la mañana siguiente para asegurarse de la formación de monofases confluentes. Muestras de virus de titulación desconocida con controles positivos y negativos, se diluyeron 1:10 en serie hasta los intervalos de titulación esperados en DMEM + 10 ml/l de piruvato sódico + 0.5 ml/l de gentamicina. El control positivo fue un VSV estándar de titulación conocida. El control negativo (o blanco) contenía sólo los medios. Se aspiraron los medios celulares de las placas de seis pocillos y entonces el virus diluido (0.5 ml de solución virus/pocillo) se añadió a los pocillos, por duplicado. Se adsorbió el virus a temperatura ambiente durante quince minutos y entonces se incubó a 32 °C durante treinta minutos. Las
15 placas se agitaron a mano cada cinco a diez minutos para mantener humedecidas las monofases. Se combinaron agarosa (a 50 °C) y DMEM (a 37 °C, 10 ml/l de piruvato sódico + 0.5 ml/l de gentamicina) en una relación de 1:4 para crear medios superpuestos de agar. Se aspiró el virus de las placas, y se añadieron 3 ml del superpuesto por pocillo usando una pipeta de repetición. Las placas superpuestas se enfriaron bajo campana a temperatura ambiente y se transfirieron entonces a incubación a 32 °C durante setenta y dos horas o hasta que las placas fueran claramente visibles (aproximadamente un mm de diámetro o superior). Se contaron las placas elevándolas a una fuente luminosa. Las titulaciones para cada muestra se determinaron por recuentos de la placa resultante y se expresó en términos de unidades formadoras de placa (PFU) por ml.
20
25

El segundo ensayo (ensayo de inmunofluorescencia de placa) se llevó a cabo por la infección de monofases de células Vero (en placas de 48 pocillos) con el virus VSV. Después de veinticuatro a treinta y seis horas, las células Vero se fijaron y se sondaron primero con un anticuerpo monoclonal contra ambos VSV_N o VSV_{NJ},
30 dependiendo del constructor usado y entonces se sondaron con un tinte fluorescente conjugado a un anticuerpo secundario. Se cuantificaron las partículas infecciosas usando microscopía de fluorescencia para detectar focos fluorescentes dentro de la monofase de la célula Vero. Se contaron los focos fluorescentes y la titulación de la muestra se expresó como unidades infecciosas (IU) o unidades formadoras de placa (PFU) por mL.

Ensayo de ADN Residual. El ADN de la célula huésped se ensayó y cuantificó usando el kit de microensayo de
35 ADN Quant-iT™ de PicoGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA). El microensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando ADN lambda como estándar.

Ejemplo 2: producción de VSV en cultivo de células Vero

Los procedimientos experimentales de VSV se produjeron en un biorreactor de 10 litros usando cultivos en microportadores de células Vero (Células Renales de Mono Africano). Las células Vero usadas se obtuvieron de
40 un Banco de Células Madre de cGMP. Las células Vero crecieron en microportadores Cytodex™ (Amersham Biosciences Corp.; Piscataway, NJ) con una densidad de 7,5 gramos de perlas secas/litro. El volumen de trabajo del cultivo en el biorreactor fue de 5,5 a 6,5 litros. Para su inoculación, las células Vero se combinaron con microportadores Cytodex™ I con un volumen total de 2 litros aproximadamente. La densidad objetivo de siembra del cultivo fue de 5×10^5 células/ml. Se llevó a cabo un ciclo de agitación intermitente de dos horas con este reducido volumen para promover la unión de las células a los microportadores. Se agitó el cultivo durante 5
45 minutos a 40 rpm permitiendo entonces la sedimentación durante 20 minutos a cero rpm durante cuatro ciclos completos.

El cultivo se muestreó siguiendo una agitación intermitente, y si la unión era satisfactoria, el Medio Libre sin Suero para la Producción de Virus (VP-SFM) se añadía al cultivo, por encima de los 5,5 o 6,5 litros de volumen de
50 trabajo. Las células crecieron hasta $2-4 \times 10^6$ células/ml a 37 °C y 40 rpm. Se abastecía constantemente de aire a 50 cm³/minuto al recubrimiento. El recubrimiento se abastecía de dióxido de carbono y oxígeno a demanda, a 50 cm³/minuto. Cuando la demanda de oxígeno del cultivo excedía la suministrada por el recubrimiento, se añadía oxígeno al cultivo a través de un rociador aglomerado con una tasa inicial de 6 cm³/minuto. La tasa se aumentó manualmente mientras la demanda de oxígeno aumentaba. Para controlar el pH se usaron dióxido de carbono
55 (ácido) y una solución de bicarbonato sódico (básica) al 7,5% en peso/volumen, usando un punto de referencia de cultivo de pH 7,30. El cultivo se sometió a una perfusión añadiendo medios frescos a la mitad de volumen de cultivo por día comenzando aproximadamente transcurridas 48 horas del tiempo de cultivo. La infección de las células Vero con el rVSV sucedió a 32 °C y una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Para promover la adsorción del virus a las células, se llevó a cabo un ciclo de agitación intermitente de una hora inmediatamente después de la
60 adición del virus al cultivo del biorreactor. Se agitó el cultivo durante seis minutos a 40 rpm permitiendo entonces la sedimentación durante veinticuatro minutos a cero rpm durante dos ciclos completos. Siguiendo a una hora de

agitación intermitente, el resto de la infección transcurrió en modo discontinuo a 40 rpm. El cultivo infectado se muestreó cada 6-16 horas para observar el efecto citopático (CPE), recuento de células y recogida de muestras virales sobrenadantes para determinar su cinética de crecimiento.

- 5 El cultivo celular se recolectó aproximadamente a las 44 horas de la infección para el VSV_{IN}N4CT₉-gag1, aproximadamente a las 48 horas de la infección para el VSV_{IN}N4CT₁-gag1, y aproximadamente a las 60 horas de la infección para el VSV_{NJ}N4CT₁-gag1, al permitir a los microportadores la sedimentación y recogida del fluido del cultivo sobrenadante. Para la última construcción, se combinó el fluido del cultivo celular de los dos biorreactores.

Ejemplo 3: procedimiento de purificación del VSV: aclarado primario del fluido del cultivo celular de uso para el VSV_{IN}N4CT₉-gag1

- 10 Tras la recolección del cultivo celular del biorreactor, se eliminaron las células, los residuos celulares y otras impurezas, en el procedimiento conocido como "recuperación del producto". El VSV se recuperó en el fluido de cultivo dado que el VSV se secretó desde las células Vero en el fluido de cultivo celular. De esta manera, el VSV sobrenadante en el fluido de cultivo celular (por ejemplo, alrededor de 4,0-4,5 l a partir de un procedimiento de biorreactor de 10 l) se aclaró tanto por filtración de profundidad como por centrifugación a baja velocidad.

- 15 El aclarado mediante filtración de profundidad se llevó a cabo a temperatura ambiente y el VSV se recuperó en el filtrado. Se hicieron ensayos con los siguientes módulos de filtración de profundidad: un módulo HD Polycap™ de Whatman® (Whatman Inc.; Florham Park, NJ), un módulo P Sartoclear™ de Sartorius (Sartorius Corp.; Edgewood, NY), un módulo HC Millistak+® de Millipore® (Millipore; Billerica, MA) y un módulo 05/60HP de CUNO (CUNO Inc, a 3M® company, Meriden, CT). Se cargaron los filtros de profundidad con el filtrado hasta la saturación del filtro
20 (aproximadamente 100-500 ml de filtrado).

La eficacia de aclarado de los módulos de filtración de profundidad se determinó con un turbidímetro, mientras que la recuperación del virus se evaluó con un ensayo de placa viral. La Tabla 1 resume más adelante el rendimiento de los diferentes filtros de profundidad.

- 25 Se puede conseguir una alta recuperación del virus usando un módulo HD 75 Polycap de Whatman. Sin embargo se observó, en producción a gran escala, baja eficacia en la eliminación de la turbidez y baja capacidad de filtrado. Se pueden seleccionar otros filtros de otros vendedores para su uso en el procedimiento de aclarado basado en una evaluación de la recuperación de sus virus.

Tabla 1. Rendimiento en el aclarado del cultivo celular con diferentes filtros de profundidad

Filtros	Turbidez del Filtrado	Eliminación de la Turbidez	Capacidad del Filtro ²	Recuperación de Título
Millipore Co HC	1,24	96,3%	>6,5	4,4%
Sartorius SarloDear™ P (1,5 µm)	4,0	94,0%	>8,0	19,3%
Sartorius Sartoclear™ P (4,0 µm)	7,0	89,6%	>8,7	8,4%
Whatman PolyCap™ HD75	13,8	79,4%	1,25	82,0%
CUNO™ 05/60HP	6,4	96,9%	9,0	33,9%
CUNO™ 05/60HP	6,7	85,4%	>32	41,1%

Turbidez del Filtrado¹ = NTU (Unidades de Turbidez Nefelométrica)
Capacidad del Filtro= (L-cultivo/ft²)

- 30 El aclarado mediante centrifugación a baja velocidad se llevó a cabo a 6238 x g (5000 rpm) durante treinta minutos a temperatura ambiente en una centrifugadora Beckman (frascos de centrifugación de 5 x 1 l con un volumen total de 4,5 l), en el que el VSV se recuperó en el sobrenadante. Como se muestra más adelante en la Tabla 2, se consiguió una alta eficacia en la eliminación de la turbidez y una recuperación de producto equivalente mediante centrifugación a baja velocidad comparada con la filtración de profundidad mediante el módulo HD75 PolyCap™ de Whatman.

Tabla 2. Comparación del aclarado primario de fluido de cultivo celular mediante centrifugación a baja velocidad y filtración de profundidad

Procedimiento de aclarado	Turbidez ¹	Eliminación de la turbidez	Recuperación de título
Procedimiento experimental de centrifugación 1	8,45	74,4%	67,8%
Procedimiento experimental 1 Whatman PolyCap™ HD75	8,13	45,5%	66,6%
Procedimiento experimental de centrifugación 2	9,03	86,5%	55,7%
Procedimiento experimental 2 Whatman PolyCap™ HD75	13,8	79,4%	82,0%
Procedimiento experimental de centrifugación 3	10,13	77,6%	68,3%
Procedimiento experimental de centrifugación 4	10,80	85,5%	77,0%

Turbidez¹ = Turbidez del filtrado o sobrenadante en NTU

Ejemplo 4: procedimiento de purificación de VSV: aclarado secundario del fluido de cultivo celular de VSV

Tras el aclarado primario descrito anteriormente en el Ejemplo 3, el sobrenadante (o filtrado) se procesó adicionalmente (aclarado secundario) para reducir el nivel de turbidez. Se evaluaron varios filtros estériles (Tabla 3) para la microfiltración (entre 0,2 y 0,25 µm) que incluían una unidad de filtrado Millex®-GV de Millipore (Millipore; Billerica, MA), una unidad de filtrado Millex®-GP de Millipore, una unidad de filtrado Supor® de Pall (Pall Corp.; East Hills, NY), una unidad de filtrado Sartobran™ de Sartorius (Sartorius Corp.; Edgewood, NY) y una unidad de filtrado Sartopore™ 2 de Sartorius. El filtro óptimo tendría una capacidad de unión del VSV limitada (o no) eliminando así tantas partículas de contaminación como sea posible.

El VSV de la producción de presiembra se usó como la alimentación (material de partida) para los filtros de microfiltración escogidos, que se hizo con adiciones de 1 x sacarosa fosfato glutamato (SPG). La misma alimentación se filtró siguiendo el protocolo suministrado por los vendedores. Ya que la cantidad de material de cultivo celular aclarado era limitada, se usó una jeringa o filtro de disco en vez de un filtro a gran escala. Como se muestra en la Tabla 3, la mayor recuperación de título del VSV se consiguió con los filtros estériles Supor® de Pall y Sartobran™ de Sartorius.

Tabla 3. Evaluación del filtro de aclarado secundario

Unidad de Filtrado	Recuperación*
Millipore Millex®-GV	66,13%
Millipore Millex®-GP	87,08%
Pall Acrodisc™ Supor™	96,08%
Sartorius Sartobran™	94,61%
Sartorius Sartopore™ 2	82,84%

Recuperación*: se añadió 1 x solución SPG a la solución de suministro. SPG es sacarosa fosfato glutamato.

El aclarado secundario del VSV se evaluó adicionalmente usando una unidad de filtrado Sartobran™ de Sartorius, cuyos resultados se resumen más adelante en la Tabla 4.

Tabla 4. Aclarado secundario usando un filtro Sartobran™ de Sartorius

Filtración con Sartobran™	Turbidez del Sobrenadante ¹	Eliminación de la Turbidez	Recuperación de Título
Experimento 1	0,62	50,8%	65,8%
Experimento 2 (con 1x SPG)	4,45	NA	85,9%
Experimento 3 (con 1x SPG)	6,27	54,6%	110,0%

Turbidez del Sobrenadante = NTU
0,62 : la baja turbidez del filtrado se debe a la baja turbidez de la alimentación
NA = No disponible:
SPG es sacarosa fosfato glutamato

Los datos de la Tabla 4 muestran que la turbidez de la solución del Experimento 2 y el Experimento 3 se redujo adicionalmente, con un nivel de recuperación aceptable. En estos experimentos, también se estableció que la

adición de 1x SPG a la solución de alimentación (*es decir*, el Experimento 2: 85,9% de recuperación del título y el Experimento 3: 110% de recuperación del título) mejora significativamente el rendimiento en la recuperación del producto del VSV con relación al Experimento 1, que no tenía SPG añadido (65,8% de recuperación del título).

Ejemplo 5: procedimiento de purificación del VSV: cromatografía en columna

- 5 Tras la etapa del segundo aclarado descrito en el Ejemplo 4, se hizo un ensayo/evaluación para la purificación del filtrado del VSV usando varias resinas cromatográficas. Ya que la partícula del VSV es de gran tamaño con relación a las proteínas contaminantes, sólo se evaluaron las resinas de gran tamaño de poro, que incluían una resina de intercambio aniónico UNOsphere™ Q (Bio-Rad Laboratories Inc.), una resina de intercambio catiónico UNOsphere™ S (Bio-Rad Laboratories Inc.), una resina de tipo I de hidroxiapatita cerámica CHT (Bio-Rad Laboratories Inc.), una resina de tipo I de fluorapatito cerámico CFT (Bio-Rad Laboratories Inc.) y una resina de modo mixto I CST (GE Healthcare). Para la comparación, también se evaluaron dos resinas de afinidad, una resina de sulfato de Matrex™ Cellufine® (Millipore) y una resina de heparina y sefarosa (GE Healthcare). Los experimentos se llevaron a cabo en modo discontinuo a temperatura ambiente. Se recogieron las muestras de las diferentes condiciones de lavado y elución por electroforesis SDS-PAGE y ensayo de placa.
- 10
- 15 Se observó en los experimentos iniciales con las resinas de intercambio aniónico UNOsphere™ Q y de intercambio catiónico UNOsphere™ S, que el VSV sólo se unió a la resina de intercambio aniónico UNOsphere™ Q a pH neutro, indicando que el VSV, a pH neutro, está cargado negativamente.

20 Evaluación de la purificación del VSV en una Resina de Intercambio Aniónico UNOsphere™ Q de Bio-Rad®. El VSV aclarado se cargó en una columna rellena con la resina UNOsphere™ Q. No hubo separación distinguible entre el producto de VSV y las impurezas de proteína en la columna y una gran cantidad de virus todavía estaba unida a la columna, incluso tras la elución con una solución de NaCl de concentración 2 M en una solución tampón de fosfato sódico de concentración 10 mM (no se muestran los datos).

25 Evaluación de la purificación del VSV en una resina de tipo I de hidroxiapatito cerámico (CHT I) de Bio-Rad®. El VSV se absorbió de modo eficaz en la columna de hidroxiapatito. Se observó alguna separación del VSV de las proteínas contaminantes mediante SDS-PAGE (no se muestran los datos), pero una cantidad significativa del VSV permaneció unida en la columna incluso tras la elución con una solución de fosfato sódico de concentración 0,8 M, con pH 6,88, en la que el VSV unido finalmente se eluyó fuera de la columna durante una etapa de limpieza con NaOH de concentración 1 M.

30 En otro experimento, se usó como tampón de elución un tampón de fosfato potásico 0,9 M. Se consiguió una pequeña separación entre el VSV y las impurezas de proteína (no se muestran los datos). Una gran cantidad del VSV permaneció unida a la columna y requirió NaOH 1,0 M para ser eluida fuera de la columna. Se observaron resultados similares (*es decir*, escasa separación de proteína contaminante del VSV y fuerte unión entre el VSV y la resina) con la resina de fluorapatito cerámico (CFT) de tipo I y la resina CST I.

35 Evaluación de la purificación del VSV en una resina de afinidad de Sulfato de Matrex® Cellufine™. Una solución de alimentación del VSV aclarada se cargó en una columna previamente equilibrada (fosfato sódico 1,47 mM, fosfato sódico 8,06 mM, NaCl 140 mM, pH 7,0) con Sulfato de Cellufine™ (volumen de cápsula (CV) = 2 ml) con un caudal de 3 ml/minuto. La columna se lavó con 10 CV de tampón de equilibrado, que era fosfato salino tamponado (fosfato potásico 1,47 mM, fosfato sódico 8,06 mM, NaCl 140 mM, pH 7,0). Se mezclaron el flujo continuo y el lavado. Entonces los materiales adsorbidos se eluyeron en un gradiente lineal de 30 CV en fosfato potásico 10 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,0. El análisis SDS-PAGE mostró que la separación entre las impurezas de la proteína y el virus durante la elución no era eficaz y se observó al VSV en todas las fracciones de elución de la columna (no se muestran los datos). Una gran cantidad del VSV también permaneció en la columna. La recuperación total de producto del VSV (*es decir*, de todas las fracciones de elución recogidas; F3-F25) fue solamente del 45,2 % (Tabla 5). Se observaron resultados similares (*es decir*, baja recuperación del VSV) con la resina de heparina sefarosa.

40

Tabla 5. Purificación de VSV en una columna Sulfato de Matrex® Cellufine®

Muestras	Volumen (ml)	Título de virus (pfu/ml)	(pfu)	Recuperación
Alimentación	22	$1,39 \times 10^6$	$3,06 \times 10^7$	--
FT & W	32	$4,40 \times 10^4$	$1,41 \times 10^6$	4,6%
F3-4	4	$1,00 \times 10^4$	$4,00 \times 10^4$	0,1%
F5	2	$1,00 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$	0,7%
F6-9	8	$1,00 \times 10^5$	$8,00 \times 10^5$	2,6%
F10-25	32	$4,00 \times 10^5$	$1,28 \times 10^7$	41,9%
				Total 45,2%
FT & W = Mezcla de Flujo continuo y lavado				
F3-F25 son las fracciones de elución 3-25.				

Ejemplo 6: procedimiento de purificación del VSV: adsorbente de membrana de intercambio aniónico

Como se describió anteriormente en el Ejemplo 5, la recuperación del VSV fue relativamente baja cuando el filtrado de la etapa del aclarado secundario (*es decir*, el filtro Sartobran™ de 0,2 µm) se purificó con la resina UNOsphere™ Q, con la resina UNOsphere™ S, con la resina CHT I, con la resina CFT I, con la resina CST I, con la resina Cellufine® o con la resina de heparina sefarosa. De esta manera, la purificación del filtrado del VSV del Ejemplo 4 se evaluó adicionalmente usando dos adsorbentes de membrana de intercambio aniónico; un adsorbente de membrana Sartobind™ Q (Sartorius Corp.; Edgewood, NY) y un adsorbente de membrana Mustang™ Q (Pall Corp.; East Hills, NY).

Purificación del VSV en un Adsorbente de Membrana Sartobind™ Q

La alimentación de VSV (material de partida) para la purificación del adsorbente de membrana se retuvo mediante separación por filtración de flujo tangencial (TFF) (usando una membrana para la TFF con un peso molecular límite de 750 kDa). El VSV retenido en la separación por filtración TFF (que comprende el VSV y las impurezas/contaminantes de proteína y ADN) se almacenó después a cualquiera de las temperaturas 4 °C o -70 °C.

Se llevaron a cabo estudios iniciales del adsorbente de membrana Sartobind™ Q con el VSV retenido almacenado a 4 °C, en los que se usó HEPES 20 mM (pH 7,1) como tampón de equilibrado y el retenido se adsorbió en el adsorbente de membrana Sartobind™ Q (volumen de membrana 2,1 ml). Las impurezas de proteína se eluyeron de modo eficaz con un tampón de elución HEPES 20 mM (pH 7,1) y NaCl 1,0 M (no se muestran los datos). Sin embargo, no se recuperó ningún título del VSV en ninguna de las fracciones de elución. El tampón se cambió de HEPES a tampón de fosfato sódico, pero se observaron resultados similares (*es decir*, sin titulación del VSV en las fracciones recogidas), incluso a altas concentraciones (1,5 M) de NaCl en el tampón fosfato de elución.

Por el contrario, cuando se usó el VSV retenido almacenado a -70°C como material de partida y se adsorbió en un adsorbente de membrana Sartobind™ Q (equilibrado con HEPES 20 mM, a pH 7,1), se observó VSV en las fracciones de elución (tampón de elución HEPES 20 mM y NaCl 1,0 M), en las que se observaron un 74,2% de impurezas de proteína en la mezcla de flujo continuo y lavado basándose en los resultados de BCA (no se muestran los datos). El análisis del balance de masa para las proteínas totales se muestra posteriormente en la Tabla 6.

Usando un gradiente de elución lineal con una composición del 30% de tampón B para el material de partida con el VSV a -70°C, se observaron en el cromatograma dos picos principales (no se muestran los datos). El tampón A (tampón de equilibrado) fue fosfato sódico 10 mM (pH 7,0) y NaCl 0,3 M. El tampón B (tampón de elución) fue fosfato sódico 10 mM (pH 7,0), NaCl 2,0 M y sacarosa 10 mM, en el que el 30% de B fue aproximadamente NaCl 0,81 M.

El primer pico era VSV (fracciones 4-10) de una pureza relativamente alta. El segundo pico eran contaminantes de ADN huésped (fracciones 11-20). Los resultados del ensayo mediante PicoGreen® (no se muestran los datos) indicaron que el 97,3% del ADN huésped residual se eliminó con el adsorbente de membrana Sartobind™ Q. De esta manera, estos datos indican que el adsorbente de membrana Sartobind™ Q proporciona una manera eficaz para eliminar los contaminantes de ADN huésped del producto de VSV. Sin embargo, los resultados del ensayo de titulación del VSV (no se muestran los datos) indicaban que la recuperación del VSV con el procedimiento de purificación mediante Sartobind™ Q era menor del 30% que el obtenido con la titulación del virus. Se observó una mayor recuperación del VSV usando el adsorbente de membrana Mustang™ Q con los mismos materiales de partida.

Tabla 6: Balance de masa de proteínas totales para el adsorbente de membrana Sartobind Q

Muestras procesadas	Volumen (ml)	Proteínas totales		Recuperación
		(µg/ml)	(µg)	
Alimentación	15	115,8	1737	100%
FT & W	32,5	39,68	1289,6	74,2%
F3	2	3,79	7,58	0,4%
F4-5	4	24,86	99,44	5,7%
F6-10	10	12,27	122,7	7,1%
F11-20	20	6,17	123,4	7,1%
F22-24	6	4,27	25,62	1,5%
F36	2	0	0	0,0%
F37	2	17,86	35,72	2,1%
P38-40	6	7,38	44,28	2,5%
				Total 94,6%

FT&W = Mezcla de Flujo continuo y lavado
F3-F40 son las fracciones de elución 3-40.

Purificación del VSV en un Adsorbente de Membrana Mustang™ Q

También se investigó el adsorbente de membrana Mustang™ Q como medio de purificación del VSV. Se optimizaron las condiciones de operación del adsorbente Mustang™ Q y se describen posteriormente.

5 **La sacarosa mejora el rendimiento de recuperación del VSV eluido en una membrana Mustang™ Q.** Una observación inicial al optimizar las condiciones de la membrana Mustang™ Q fue la importancia de incluir sacarosa en los tampones cromatográficos. Por ejemplo, se llevaron a cabo experimentos de purificación paralelos con un tampón formulado con sacarosa (Figuras 2A y 2B) y sin sacarosa (Figuras 3A y 3B). Se usaron los siguientes tampones cromatográficos: el Tampón A (tampón de equilibrado) fue fosfato sódico 10 mM (pH 7,0) y NaCl 300 mM. El Tampón B (tampón de elución) fue fosfato sódico 10 mM (pH 7,0), NaCl 1 M, con y sin sacarosa
10 (es decir, +/- sacarosa al 2%).

En ambos experimentos (es decir, +/- sacarosa al 2%), se obtuvo un VSV producto de alta pureza. Los ensayos de placa (no se muestran los datos) indicaban que la recuperación del VSV fue significativamente mayor (32,8% contra 19,0%) cuando se incluía la sacarosa en el tampón.

15 **Tampón de pH y unión del VSV a la membrana Mustang™ Q.** Se evaluaron tres intervalos de pH diferentes (pH 6,5, 7,0 y 7,5) para determinar el tampón de pH óptimo para la unión del VSV a la membrana Mustang™ Q. En estos experimentos, el cultivo celular fresco acondicionado se cargó, tras el aclarado, en una membrana Mustang Q equilibrada tanto con un tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 6,5, 10 mM un tampón de fosfato sódico a pH 7,0 como con un tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 7,5 (cada tampón comprendía también NaCl 300 mM y sacarosa al 2%).

20 El VSV se eluyó de la membrana tras la etapa de elución (tampón de elución: fosfato sódico 10 mM (pH 6,5, 7,0 o 7,5), NaCl 720 mM y sacarosa al 2%) con un caudal de 3,5 ml por minuto (10 CV/min). La pureza del VSV eluido en la membrana Mustang™ Q (determinado mediante SDS-PAGE y transferencia de Western; no se muestran los datos) se pudo comparar para cada ensayo del tampón de pH. Sin embargo, a pH 6,5, se dispersó una cantidad significativa del VSV en las etapas de flujo continuo, lavado y elución durante el procedimiento cromatográfico, y como tal, se observó una recuperación inferior del título del VSV en la mezcla de elución a este pH (véase Tabla 7).
25

pH de unión	Recuperación de VSV (ensayo de titulación)
6,5	15%
7,0	33%
7,5	28%

30 **Fuerza iónica y unión del VSV a una Membrana Mustang Q.** Se ensayaron dos concentraciones diferentes de NaCl (NaCl 0,15 M y NaCl 0,3 M) en un tampón de unión con fosfato sódico 10 mM (equilibrado) en la adsorción del VSV en la membrana Mustang™ Q. La mejor separación entre el VSV y las impurezas de proteína se observó con NaCl 0,3 M. Por ejemplo, cuando el NaCl 0,3 M se usó en un tampón de unión con fosfato sódico, los contaminantes de alto peso molecular se eliminaron de la mezcla de flujo continuo, en la que el VSV permaneció unido a la membrana (no se muestran los datos).

35 **Fuerza iónica y Elución del VSV en la Membrana Mustang™ Q.** La fuerza iónica del tampón de elución (Tampón B) (es decir, la concentración de NaCl en el tampón de elución) se determinó mediante gradiente lineal de elución, en el que la concentración del tampón de elución (Tampón B) se aumentó del 0% al 60% en 30 CV con un caudal de 3,5 ml/minuto. El tampón de equilibrado (Tampón A) fue fosfato sódico 10 mM, pH 7,1, NaCl 300 mM y el tampón de elución (Tampón B) fue fosfato sódico 10 mM, pH 7,1, NaCl 2 M, sacarosa 10 mM. Se observó en el cromatograma (no se muestran los datos), que se requirió una concentración 0,6 M de NaCl para la elución del
40 73,3% del VSV en el adsorbente de membrana Mustang™ Q.

45 **Elución en Gradiente Lineal contra Elución en una Etapa Única.** Se obtuvo un producto VSV de alta calidad tanto en la elución en gradiente lineal (descrita anteriormente) como con la estrategia de elución en una "etapa única" (no se muestran los datos). El procedimiento de elución en una etapa única comprende un tampón de equilibrado (Tampón A; por ejemplo, fosfato sódico 10 mM, pH 7,1, NaCl 300 mM) y un tampón de elución (Tampón B; por ejemplo, fosfato sódico 10 mM, pH 7,1, NaCl 2 mM, sacarosa 10 mM). A diferencia de la elución de gradiente lineal, el procedimiento de elución en una etapa única eluye el VSV del adsorbente de membrana mediante la adición instantánea de Tampón B con una concentración final de sal específica (por ejemplo, adición instantánea de Tampón B con una concentración final de NaCl 0,6 M). El procedimiento de elución en una etapa única eliminó más del 99% de la impureza de proteína (ensayo BCA; no se muestran los datos), en el que se recuperó del 70-95% del
50 VSV en las fracciones eluidas (ensayo de placa; no se muestran los datos). De esta manera, en el presente documento se utilizará el procedimiento de elución en una etapa única, dado que se obtuvo una elevada titulación de VSV utilizando esta sencilla estrategia de elución en una sola etapa.

Caudal de operación. Se investigaron dos caudales diferentes, es decir, 10 volúmenes de cápsula (CV)/minuto

y 20 CV/minuto. No se observaron cambios en el rendimiento del procedimiento de purificación en ninguno de los dos caudales.

Tratamiento con Benzonase®. La Nucleasa Benzonase® es una endonucleasa producto de ingeniería genética. Degrada todas las formas de ADN y ARN (cadena sencilla, cadena doble, lineal y circular) mientras que no posee actividad proteolítica. Es eficaz en un rango muy amplio de condiciones, con una elevada actividad específica. De esta manera, la nucleasa Benzonase® es ideal para la eliminación de los ácidos nucleicos de los productos recombinantes, permitiendo el cumplimiento de las directrices para la contaminación de ácidos nucleicos de la FDA.

En el presente documento se observó que la nucleasa Benzonase® redujo de forma significativa el nivel de ADN en el procedimiento de purificación del VSV y en el concentrado a granel purificado final de VSV. Sin embargo, la adición de nucleasa Benzonase® antes de la purificación en el adsorbente de membrana Mustang™ Q dio como resultado la disminución del título de virus (no se muestran los datos). Por el contrario, el tratamiento con nucleasa Benzonase® después de la etapa de purificación por cromatografía de membrana no tuvo el mismo efecto (es decir, no se observó disminución en el título).

Sin embargo, a causa de que el procedimiento de purificación del VSV descrito en el presente documento (por ejemplo, véase la Figura 1) eliminó más del 99% de los contaminantes del cultivo celular, la concentración de ADN en el concentrado a granel purificado final de VSV estaba por debajo de las especificaciones (por ejemplo, especificación de WHO < 10 ng/dosis) sin el tratamiento con nucleasa Benzonase®. De esta manera, el tratamiento con nucleasa Benzonase® no se ha usado en el procedimiento de purificación del VSV, lo que fue una mejora significativa en comparación con el procedimiento tradicional de purificación del producto viral/vacuna viral (que requiere tratamiento con nucleasa Benzonase®).

Capacidad de unión del Mustang™ Q. La capacidad de unión del adsorbente de membrana Mustang™ Q se determinó mediante el avance de VSV utilizando una pequeña cantidad (un volumen de 0,35 ml) de adsorbente de membrana Mustang™ Q (es decir, una moneda de Mustang™ Q). Cuando se carga y purifica el fluido del cultivo celular acondicionado sobre la moneda de Mustang™ Q, se observa inicialmente que el avance de VSV no se puede medir por absorbancia UV a causa del flujo continuo de impurezas que absorben en el UV. De esta manera, en este ejemplo, se recogieron las fracciones de flujo continuo de VSV y se detectó el VSV mediante SDS-PAGE y ensayo de titulación del VSV. El tampón de equilibrado del Mustang™ Q fue HEPES 10 mM a pH 7,5, NaCl 0,3 mM y sacarosa al 2%.

Sorprendentemente, no se alcanzó un avance del 1% en cromatografía convencional (véase tabla 8 posteriormente) incluso después de cargar 400 ml de fluido de cultivo celular en la moneda de Mustang™ Q (el título del fluido de cultivo celular de VSV fue $6,9 \times 10^6$ /ml). Sin embargo, como se muestra en la tabla 8, se observó un título más alto de VSV en el flujo continuo cuando la moneda de Mustang™ Q se cargó con los 400 ml de la muestra de fluido de cultivo. Además, cuando el volumen de carga alcanzó los 400 ml, la presión diferencial en la moneda aumentó a 1,8 bar. De esta manera, se concluye de este experimento que la capacidad de carga del filtro era de 350 ml de fluido de cultivo acondicionado por cada 0,35 ml de adsorbente de membrana Mustang™ Q, que era equivalente a 500 ml de cultivo celular por ml de adsorbente de membrana. Alternativamente, la capacidad de unión del Mustang™ Q también se pudo describir como $6,9 \times 10^9$ pfu/ml de membrana. En tres ensayos de consistencia, la capacidad de carga real (en título del virus) era ligeramente superior a esta capacidad de unión, lo que no afecta al rendimiento del procedimiento. De esta manera, estos datos indican que la capacidad de unión determinada era un valor conservador de la capacidad, y como tal, se podría utilizar fácilmente en procedimientos de manufactura a gran escala.

Tabla 8. Estudio de la capacidad de carga del MUSTANG™ Q

Volumen de carga ¹ (ml)	Título de VSV ² en el flujo continuo (pfu/ml)
0-200 (FC1)	ND*
200-300 (FC2)	$6,80 \times 10^3$
300-350 (FC3)	$8,80 \times 10^3$
350-400 (FC4)	$1,30 \times 10^4$

ND = no determinado

Volumen de carga¹ se basa en el volumen de cultivo

Título de VSV²: el título de alimentación de VSV fue $6,9E+06$ /mL

El volumen de filtro de membrana de Mustang™ Q fue 0,35 ml

FC1-FC4 son los flujos continuos 1 a 4, respectivamente

Conclusiones del adsorbente de membrana Mustang™ Q. Se consiguió un producto de VSV de alta calidad y con una elevada recuperación con el adsorbente de membrana Mustang™ Q. Comparado con los procedimientos de cromatografía "tradicionales", el procedimiento de purificación con Mustang™ Q (además de ser un procedimiento eficaz y sencillo) posee varias ventajas. Por ejemplo, el procedimiento rinde un producto de VSV de mayor calidad que la purificación por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (por ejemplo, véanse las Figuras 5A y 5B). Además, (a) la alta capacidad de unión del adsorbente de membrana Mustang™ Q significa

un menor equipamiento de procedimiento y un menor coste de producción, (b) el mayor caudal, relativo a otras resinas de cromatografía ensayadas, da como resultado un incremento de la capacidad de producción y de la productividad y (c) las unidades desechables de adsorbente de membrana Mustang™ Q eliminan la necesidad de la validación de limpieza y la validación de vida media.

5 A continuación se resumen las condiciones de operación desarrolladas y descritas anteriormente: (a) capacidad de carga = 0,5 l de cultivo celular por mililitro de adsorbente de membrana Mustang™ Q, (b) caudal = 20 volúmenes de cápsula (CV) por minuto, (c) pH de unión del VSV = pH 7,5 ± 0,1 unidades de pH, (d) fuerza iónica de unión de VSV = sal 0,3 ± 0,2 M; (e) elución de VSV = gradiente de etapa en 15 CV y (f) fuerza iónica de elución de VSV = sal 0,7 M.

10 **Ejemplo 7: procedimiento de purificación del VSV: filtración de flujo tangencial, limpieza, intercambio de tampón**

15 La concentración de VSV e intercambio de tampón se realizó usando un sistema ultrafiltración / diafiltración (UF/DF) de filtración de flujo tangencial (TFF). La mezcla de elución del adsorbente de membrana Mustang™ Q fue en tampón HEPES 10 mM con una elevada concentración de sal (NaCl 0,7 M) y aún presentaba cantidades traza de impurezas. De esta manera, fue necesario un paso de UF/DF para eliminar las impurezas residuales y obtener un producto final de VSV con un tampón de formulación de producto apropiada.

20 Se combinaron las mezclas de elución de cinco procedimientos experimentales de Mustang™ Q en este experimento. Se utilizó un cartucho de membrana TFF hueco de 16 cm² con un peso molecular límite de 750 kDa (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). Primero se concentró la solución mezclada a 10 ml. Se realizaron cinco (5x) intercambios de tampón en tampón fosfato salino (tampón fosfato potásico (PBS) 10 mM a pH 7,1 y NaCl 138 mM).

25 El análisis SDS-PAGE para las muestras procesadas indicó que el VSV purificado solo estaba presente en el retenido y aclarado, y el VSV perdido en el permeado no se detectó ni por tinción de plata ni por análisis de transferencia de Western (no se muestran los datos). Los datos SDS-PAGE demostraron que el procedimiento de recuperación del VSV era aceptable y las impurezas se eliminaban gradualmente después de cada intercambio de tampón (no se muestran los datos). Para eliminar completamente las impurezas residuales, se necesitaron un total de cinco a seis intercambios de tampón.

30 Optimización de las condiciones de operación UF/DF. Se investigó el efecto de la composición del tampón en la realización de la UF/DF TFF. Se utilizó la misma mezcla de elución de Mustang™ Q en todos los experimentos (Tabla 9). Los tres primeros experimentos se realizaron en una membrana TFF de fibra hueca de 16 cm² (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) mientras que el último experimento se finalizó con una membrana TFF de 420cm² (GE Healthcare Bio-Sciences Corp). Para todos los experimentos, la calidad del producto resultó similar (basado en análisis SDS-PAGE y SE-HPLC).

Tabla 9. Experimento de composición del tampón de TFF

Procedimientos experimentales	Tampón	Recuperación (%)
Experimento 1	HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4, Sacarosa al 4%	100,5
Experimento 2	NaPi 10 mM, pH 7, Sacarosa al 4%	88,8
Experimento 3	NaPi 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4, Sacarosa al 4%	80,6
Experimento 4	PBS, pH 7,2, Sacarosa al 4%	80,0

35 Independientemente del tampón usado, no se observó VSV en los permeados por diafiltración (basado en SDS-PAGE / tinción de plata; no se muestran los datos). Sin embargo, los ensayos de ADN y proteínas totales indicaron que alrededor del 34 al 41% de las proteínas totales cargadas y alrededor del 33 al 40% del ADN cargado se eliminaron en los volúmenes de las tres primeras diafiltraciones. Con respecto al intercambio de tampón, cinco volúmenes de diafiltración (DV) fueron suficientes para reducir la conductividad del permeado a un nivel satisfactorio.

40 De esta manera, las siguientes condiciones de operación de la UD/DF TFF se desarrollan como sigue:

- a) Cartucho de membrana TFF: Cartucho TFF de fibra hueca (750 kDa),
- b) Capacidad de membrana TFF: 95 l cultivo celular/m²,
- c) Presión de operación: p1 = 3-4 psig; p2 = 1-2 psig; TMP = 1.5-2.5 psig,
- d) Temperatura de operación: temperatura ambiente,
- e) Caudal de cruce: 700 LMH,

45

f) Flujo permeado: > 30 LMH, y

g) Concentración 5x y Diafiltración 6x en PBS + sacarosa al 4% (fosfato potásico 10 mM, NaCl 138 mM, pH 7,2);

en las que p1 es la presión de entrada, p2 es la presión de salida, TMP es la presión transmembrana y LMH es litros/m² hora.

5 **Ejemplo 8: procedimiento de purificación de VSV: filtración final**

La última etapa en el procedimiento de purificación del VSV fue la filtración final del material purificado por TFF descrito anteriormente. Se utilizó una unidad de filtrado Sartobran™ de Sartorius (Sartorius Corp.; Edgewood, NY) de 0,2 µm (0,45/0,2 µm) a un caudal de 100 ml por minuto para eliminar la posible carga biológica con pérdida mínima de producto de VSV. El tampón fue fosfato potásico 10 mM (pH 7,1-7,3), NaCl 138 mM y sacarosa al 7%.

10 **Ejemplo 9: purificación a gran escala de VSV para el constructor VSV_{IN} N4CT₈-gag1**

Se realizaron cuatro procedimientos a gran escala (es decir, volumen de cultivo celular) de 4,5 l. Los resúmenes de estos procedimientos a gran escala se muestran posteriormente en la Tabla 10 y en la Tabla 11, y en la Figura 6. Se realizaron ensayos que incluyeron SDS-PAGE (no se muestran los datos), proteínas totales (Tabla 11), titulación de virus (Tabla 10 y Figura 6) y SE-HPLC (no se muestran los datos). Se consiguieron rendimientos de procedimiento consistentes (es decir, calidad de producto de VSV) y la eliminación de impurezas en cada procedimiento a gran escala, usando el procedimiento que se establece más adelante en la Figura 1.

Tabla 10. Procedimientos a gran escala

Procedimiento	Alimentación		Concentrado a granel purificado	
	Volumen (ml)	Título (pfu/ml)	Volumen (ml)	Título (pfu/ml)
1	4192	5,60 x 10 ⁷	475	2,40 x 10 ⁸
2	4392	9,10 x 10 ⁷	440	3,40 x 10 ⁸
3	4425	520 x 10 ⁷	475	1,10 x 10 ⁸
4	4450	5,01 x 10 ⁷	435	2,00 x 10 ⁸

Tabla 11. Eliminación de impurezas de proteína en procedimientos a gran escala de VSV

Etapa del procedimiento	Recuperación total de proteína (%)			
	Procedimiento 1	Procedimiento 2	Procedimiento 3	Procedimiento 4
Centrifugación a baja velocidad	ND	91,0	73,2	91,5
Prefiltración a 0.2 µm (Dilución)	89,9	75,2	71,3	68,0
Postfiltración a 0.2 µm (Sartobran™)	100,6	97,3	102,6	98,1
Mustang™ Q	0,43	0,39	0,33	0,41
UF/DF	42,7	52,0	48,7	47,5
Prefiltración a 0.2 µm	95,7	106,8	104,5	99,4
Postfiltración a 0.2 µm (Sartobran™)	87,7	82,7	81,5	93,8
Eliminación total de proteína (%)	ND	99,9	99,9	99,9
ND = No determinado				

Análisis de los procedimientos de purificación a gran escala de VSV

20 El objetivo de desarrollar el nuevo procedimiento de purificación de VSV descrito en el presente documento (por ejemplo, véase Figura 1) fue para producir VSV de alta pureza con una elevada recuperación del producto de VSV purificado. El siguiente análisis describe la estabilidad y purificación del VSV basado en cuatro procedimientos a gran escala de cultivos celulares de 4,5 l.

25 **Análisis SDS-PAGE y eliminación de las impurezas de proteína.** Un aspecto importante en los procedimientos de purificación era deplecionar (o eliminar) las impurezas de proteína del cultivo celular del producto de VSV. Como se estableció con anterioridad en el Ejemplo 1, el constructor rVSV_{IN} ejemplificado en el presente documento era el constructor rVSV_{IN} N4CT₉-gag1. El producto de VSV se monitorizó mediante detección de sus proteínas virales más importantes, M (27 kDa), N/P (49 kDa), G (55 kDa) y L (250 kDa). Entre las proteínas del VSV, las proteínas M y N/P se expresaron a mayores niveles que las proteínas G (CT₉) y L, en los que el nivel de la proteína L era el más bajo. Por consiguiente las proteínas M y N/P se observaron con bandas mucho más intensas en el análisis de gel SDS-PAGE en relación a las proteínas G y L. En todos los experimentos, se cargaron los mismos volúmenes de muestra en el gel (a menos que se indique lo contrario). Además, en lugar de un procedimiento único de detección de proteínas tal como tinción de plata o tinción de Coomassie®, se utilizó doble tinción con Azul de Coomassie® y plata, proporcionando de ese modo una mayor sensibilidad para la

detección de proteínas.

El análisis SDS-PAGE para el procedimiento a gran escala número 4 (Figuras 4A y 4B) reveló que la mayoría de las proteínas huésped se eliminaban en la etapa de aclarado primario de centrifugación a baja velocidad (Figuras 4A, 4B, calles 1 y 2) a través de la eliminación de los residuos celulares. Basado en análisis BCA, se eliminaron el 91,5% de las proteínas totales, indicando que la centrifugación a baja velocidad era una etapa significativa en la eliminación de impurezas.

El sobrenadante de la centrifugación se diluyó con tampón HEPES 10 mM (pH 7,5 después de la adición de 1x sacarosa fosfato glutamato (SPG; sacarosa al 7.5%, fosfato potásico 10 mM, glutamato 5 mM)), NaCl 0.465 M y sacarosa al 2% (Figuras 4A, 4B, calle 3), en el que se observó una banda ligeramente teñida debido a la dilución. La solución diluida se bombeó a través de un filtro de 0,2 μ m para eliminar cualquier partícula contaminante remanente (no se eliminaron impurezas de proteína en esta etapa; Figuras 4A y 4B, calle 4). El filtrado de VSV se recogió como alimentación para la etapa del Mustang™ Q y se cargó en el adsorbente de membrana.

Se eliminaron más del 99,5% de las impurezas de proteína remanentes en el adsorbente de membrana Mustang™ Q (Tabla 11). La eliminación de las impurezas de proteína se observó mediante análisis SDS-PAGE (Figuras 4A, 4B, calles 5 y 6), en el que se eluyó un producto de VSV de alta calidad de la membrana de Mustang™ Q (Figuras 4A, 4B, calle 6).

El VSV eluido se concentró y diafiltró en tampón PBS (+ sacarosa al 7%). Se eliminaron más del 48% de las impurezas de proteína remanentes en la etapa de purificación UF/DF (Tabla 11), en la que se detectaron bandas de proteínas de VSV muy intensas (Figuras 4A, 4B, calle 8). Antes y después de la filtración final a 0,2 μ m, no hubo cambios detectables en relación a la calidad de la proteína VSV o el perfil de impurezas de proteínas (Figuras 4A, 4B, calles 9 y 10).

El concentrado a granel purificado de VSV del procedimiento desarrollado recientemente también demostró mayor pureza y menor nivel residual comparado con la purificación mediante centrifugación con gradiente de sacarosa. Por ejemplo, las bandas teñidas de las proteínas del VSV (M, N, P, G y L) del procedimiento recientemente desarrollado (Figuras 5A, 5B, calle 9) eran más intensas que las bandas teñidas del VSV purificado mediante centrifugación con gradiente de sacarosa (Figuras 5A, 5B, calle 11) (con bandas de tinción menos intensas de impureza de proteínas), indicando que se consiguió un producto de VSV de mayor calidad mediante el nuevo procedimiento de purificación que se establece posteriormente en la Figura 1. En los cuatro procedimientos a gran escala, se consiguió una calidad de producto similar (no se muestran los datos) basados en el perfil de impureza de proteínas y en la intensidad de las bandas de proteínas de VSV.

Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución - Exclusión de tamaño (SE-HPLC). Se desarrolló un análisis SE-HPLC para el VSV (véase el Ejemplo 1), que proporciona un procedimiento simple y conveniente para separar el VSV de la impureza de proteínas y analizar cualitativamente el procedimiento de purificación del VSV. Para proteger la columna, sólo se inyectaron muestras clarificadas en la columna. El VSV fluye fuera de la columna con un tiempo de retención de 7,5 minutos (no se muestran los datos). Los picos de contaminación / impureza de proteínas (que tienen un tiempo de retención en la columna mayor) eluyen de la columna después del pico de VSV y por consiguiente necesitan ser eliminados del producto de VSV. La mayoría de las impurezas se eliminaron en el flujo continuo y lavado con Mustang™ Q, que confirma los resultados del análisis SDS-PAGE. En la etapa de UF/DF, se eliminaron las impurezas relacionadas con el tampón y no se perdió VSV en ninguno de los permeados (no se muestran los datos). A continuación de la filtración final a 0,2 μ m, el producto de VSV eluyó de la columna de SE-HPLC como un único pico principal con un tiempo de retención de 7,5 minutos, seguido de dos picos más pequeños correspondientes al blanco del tampón (no se muestran los datos).

La eliminación del ADN huésped residual. El cultivo celular (célula huésped) de ADN es uno de los mayores contaminantes en los procedimientos de purificación que usan tecnología recombinante. El nivel de ADN residual en el concentrado a granel purificado de VSV debería ser inferior a 10 ng/dosis (10^7 pfu). Los perfiles de eliminación de ADN para los cuatro procedimientos a gran escala se resumen más adelante en la Tabla 12, en los que se consiguió una eliminación de ADN consistente en cada etapa de purificación. El aclarado de ADN más importante se observó en la etapa de recuperación de producto (es decir, primer aclarado mediante centrifugación a baja velocidad seguido por un segundo aclarado por filtración a 0,2 μ m) y la etapa del adsorbente de membrana Mustang™ Q. Se eliminó más del 80% del ADN residual en la etapa de Mustang™ Q y se consiguió un aclarado de ADN mayor del 60% en la etapa de UF/DF. El porcentaje global de eliminación de ADN fue de $99.89 \pm 0.03\%$ en los cuatro procedimientos a gran escala. Además, el nivel de ADN residual estaba muy por debajo de 10ng/dosis (Tabla 13).

Tabla 12. Resumen de la eliminación (%) de ADN huésped

Etapa del procedimiento	Procedimiento 1	Procedimiento 2	Procedimiento 3	Procedimiento 4	Promedio	Desviación estándar
Recuperación de producto ¹	95,70	93,97	96,1	93,62	94,85	1,23
Mustang™ Q	82,69	84,7	85,43	84,61	84,36	1,17
TFF	74,51	66,63	64,62	61,80	66,89	5,45
Filtración	44,81	64,23	55,34	57,73	55,53	8,07
Total	99,90	99,89	99,91	99,84	99,89	0,03

Recuperación de producto¹ es la etapa de clarificación del fluido de cultivo mediante centrifugación a baja velocidad seguida por filtración a 0,2 µm.

Tabla 13. Resumen del nivel de ADN en el concentrado en a granel purificado de VSV

	Nivel de ADN residual (ng/10 ⁷ pfu-dosis)
Procedimiento 1	1,46
Procedimiento 2	0,97
Procedimiento 3	3,00
Procedimiento 4	1,93

5 **La eliminación de la proteína Gag.** La concentración de la proteína Gag se determinó por ELISA, que proporcionó los datos para definir el nivel de Gag residual en el producto de VSV. El perfil de la proteína Gag en el procedimiento de purificación se resume más adelante en la Tabla 14. La mayoría de la proteína Gag se eliminó en la etapa de aclarado secundario (es decir, filtración a 0,2 µm) y en la etapa de adsorbente de membrana Mustang™ Q. El nivel de proteína Gag residual esta en un rango entre 0,08 y 8,93 ng/dosis (10⁷ pfu) en el purificado a granel concentrado final, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 14. Resumen de la eliminación de Gag residual

PROCEDIMIENTO	VOLUMEN (ML)	GAG RESIDUAL		ELIMINACIÓN DE GAG GLOBAL
		NG/ML	NG	
Cultivo no aclarado	4425	4,330	19160,3	-----
Post Centrifugación	4373	3,530	15436,7	19,43%
Pre Filtración a 0,2 µm	9272	0,750	6954,0	63,71%
Post Filtración a 0,2 µm	9200	0,690	6348,0	66,87%
Lavado + flujo continuo	9800	0,660	6468,0	-----
Elución Mustang™ Q	1600	0,680	1088,0	94,32%
Retenido TFF	450	4,100	1845,0	90,37%
Pre Filtración a 0,2 µm	495	3,410	1688,0	91,19%
Conc. a granel purificado	475	0,930	441,8	97,69%

10

Tabla 15. Resumen del nivel de Gag residual en el concentrado a granel purificado de VSV

	Eliminación de Gag (%)	Nivel de Gag Residual (ng/10 ⁷ pfu-dosis)
Procedimiento 1	80,0	8,93
Procedimiento 2	87,1	6,76
Procedimiento 3	97,7	0,08
Procedimiento 4	87,1	8,50

Ejemplo 10: Purificación a gran escala de VSV para el constructor VSV_{IN} N4CT1-gag1

15 El desarrollo de un procedimiento de purificación para el constructor VSV_{IN} N4CT₁-gag1 se abordó inicialmente con un bajo título de producto en el fluido del cultivo celular (<10⁶ pfu/ml), que resultaba un bajo título de producto y una alta contaminación de ADN en el concentrado a granel purificado final. Sin embargo, el procedimiento de purificación tal y como se describe en el Ejemplo 9 para el VSV_{IN} N4CT₉-gag1 se aplicó satisfactoriamente a este constructor de VSV y a una escala de 10 l (en volumen de cultivo celular). Se ha producido un producto de VSV de gran calidad mediante este procedimiento de purificación.

En el procedimiento de purificación, las etapas de aclarado primario y secundario fueron básicamente similares a

las descritas en los Ejemplos 3 y 4. La etapa de adsorción de membrana de intercambio aniónico utilizando el adsorbente Mustang™ Q se optimizó de la siguiente manera. La filtración de flujo tangencial se realizó utilizando sistemas Quixstand™ o Flexstand™ con cartuchos de membrana de fibra hueca (GE Healthcare; Piscataway, NJ). También se ensayaron en este estudio las membranas de ultrafiltración de polietersulfona de GE con valores de peso molecular límite (MWCO) de 750 kDa. Todas las membranas tenían un área superficial de filtración nominal de 420 cm² o 1200 cm². Los experimentos de cromatografía de membrana se realizaron usando sistemas AKTA™ explorer y AKTAPilot™ (GE Healthcare; Piscataway, NJ) con adsorbentes de membrana Mustang™ Q de Pall (Pall Corporation; East Hills, NY).

Primer ensayo de purificación con Mustang™ Q para VSV_{IN} N4CT₁-gag1

- La etapa de adsorción con Mustang™ Q se realizó utilizando los mismos tampones y las mismas condiciones operativas que se describieron en el procedimiento de purificación de VSV_{IN} N4CT₉-gag1. Como resumen, primero se eliminaron las células y los residuos por centrifugación. Después de la adición de sacarosa fosfato glutamato (SPG) en relación 1/9 (v/v) y diluir dos veces con HEPES 10mM, NaCl 0.465 M, pH 7,5, sacarosa al 2%, la solución se bombeó a través de un filtro de 0,2 µm. El filtrado se cargó en un adsorbente de membrana Mustang™ Q de Pall equilibrado previamente (volumen de cápsula de 0,35 ml), y se recogió la mezcla tras flujo continuo y lavado (FT&W). El producto de VSV se recuperó en la mezcla de elución utilizando las mismas condiciones de elución descritas en el procedimiento del VSV_{IN} N4CT₉-gag1. Se obtuvo un producto viral de alta calidad (no se muestran los datos). Sin embargo, se observó un tercio del producto viral en la mezcla FT&W (Tabla 16), y el título del virus en la mezcla de elución de Mustang™ Q fue muy bajo debido al bajo título de la producción de virus en los biorreactores (4,6 x 10⁵ pfu/ml para VSV_{IN} N4CT₁ -gag1 frente a >1,0 x 10⁷ pfu/ml para VSV_{IN} N4CT₁ -gag1).

Tabla 16. Análisis del Procedimiento – Recuperación de título en la primera etapa de Mustang™ Q

Procedimiento	Volumen (ml)	Título viral (pfu/ml)	Título viral (pfu)	Recuperación (%)
Alimentación	250	9,90 x 10 ⁴	2,48 x 10 ⁷	100
FT&W	300	3,20 x 10 ⁴	9,60 x 10 ⁶	38,8
Elución	35	5,70 x 10 ⁵	2,00 x 10 ⁷	80,6
Regeneración	15	1,44 x 10 ⁵	2,16 x 10 ⁶	8,7

- Las condiciones de unión para este constructor en el adsorbente Mustang™ Q se optimizaron adicionalmente de la siguiente manera. El diseño experimental se resume en la Tabla 17. En todos los experimentos, se seleccionó el pH de carga y elución entre 6,5 y 7,5 basado en experiencias previas del VSV_{IN} N4CT₉-gag1. Se eligieron para los experimentos las concentraciones de NaCl, en el tampón de carga, en el rango entre 0,28 y 0,32 M, mientras que en el tampón de elución estaba en el rango entre 0,6 y 0,7 M. El caudal era 3,5-10,5 ml/min, que era equivalente a 10-30 volúmenes de cápsula (CV)/min.

Tabla 17. Diseño optimizado para la etapa de Mustang™ Q

Exp N°	pH de carga	NaCl de carga (M)	pH de elución	NaCl de elución (M)	Caudal (ml/min)
1	7,0	0,30	7,0	0,6	7,0
2	6,5	0,32	6,5	0,7	3,5
3	7,5	0,32	6,5	0,5	3,5
4	7,5	0,32	7,5	0,7	10,5
5	6,5	0,28	6,5	0,5	10,5
6	7,5	0,28	6,5	0,7	10,5
7	7,5	0,28	7,5	0,5	3,5
8	7,0	0,30	7,0	0,6	7,0
9	6,5	0,28	7,5	0,7	3,5
10	6,5	0,32	7,5	0,5	10,5

- Se observó un producto de VSV de alta calidad en todas las mezclas de elución con Mustang™Q, basado en análisis SDS-PAGE (no se muestran los datos). Los resultados de la eliminación de impureza de proteínas en esta etapa se muestran en la Figura 7. Se eliminaron más del 99% de las impurezas de proteínas en esta etapa única, que fue más alta que en el procedimiento de purificación del VSV_{IN} N4CT₉-gag1. El procedimiento de recuperación y los resultados del ensayo de ADN huésped residual en las mezclas de elución se resumen en la Tabla 18. El nivel de ADN en las mezclas de elución fue muy bajo en todos los experimentos, lo que indica que el aclarado de ADN no fue un problema en este procedimiento. Sin embargo, la recuperación de título varió dependiendo de las condiciones experimentales.

Tabla 18. Recuperación de título y nivel de ADN residual en la mezclas de elución de Mustang™ Q.

Exp Nº	Recuperación de título (%)	ADN Residual (ng/ml)
1	78,1	1
2	32,2	BD*
3	23,9	1
4	35,7	1
5	39,1	BD
6	58,3	BD
7	52,2	3
8	87,5	BD
9	55,1	BD
10	23,7	BD

* BD indica que el nivel de ADN es inferior al nivel de detección

El procedimiento de recuperación se calculó a partir del título del virus determinado mediante ensayo de placa. Cuando el pH del tampón de carga estaba en un rango entre 6,6 y 7,5, y la concentración de NaCl estaba entre 0,28 y 0,30 M, se conseguía un procedimiento de recuperación aceptable como se muestra en un gráfico de contorno (no se muestran los datos). Las condiciones óptimas del tampón de carga fueron NaCl 0,29 M en HEPES 10mM, sacarosa al 2%, pH 7,0. Considerando que el ajuste de pH no era preferente en las condiciones de alimentación, se consideró aceptable un pH de 7,5 para el pH del tampón de equilibrado del Mustang™ Q. Al mismo tiempo, NaCl 0,60-0,70 M y pH de 6,75-7,25 se determinaron como las condiciones del tampón de elución del Mustang™ Q. Las condiciones óptimas del tampón de elución fueron HEPES 10 mM, NaCl 0,65 M, sacarosa al 2%, pH 7,0. Las condiciones del tampón del Mustang™ Q se resumen en la Tabla 19. Con estas condiciones desarrolladas, los contaminantes del ADN en las mezclas de elución se redujeron a un nivel aceptable (no se muestran los datos).

Tabla 19. Condiciones del tampón de Mustang™ Q

Procedimiento	pH	Concentración de NaCl (M)
Equilibrado	6,6 -7,5	0,28-0,30
Elución	6,75-7,25	0,60-0,70

Los experimentos adicionales fueron consistentes con estos resultados y demostraron que en determinadas realizaciones concentraciones de NaCl de 0,28M a 0,30 M y pH 7,2-7,5 fueron las condiciones preferentes del tampón de unión para asegurar una elevada recuperación de producto, y una reducción aceptable de los contaminantes de ADN en las mezclas de elución.

Ejemplo 11: purificación a gran escala del VSV para el constructor VSV_{IN} N4CT₁-gag₁

Se completaron tres procedimientos de confirmación a pequeña escala con la misma alimentación de materiales usando las condiciones de Mustang™ Q desarrolladas anteriormente. El tampón de equilibrado fue HEPES 10 mM, NaCl 0,29 M, pH 7,5, sacarosa al 2%; mientras que el tampón de elución fue HEPES 10 mM, NaCl 0,65 M, pH 7,0, sacarosa al 2%. Se mantuvieron las mismas condiciones operativas para todos los procedimientos: el mismo caudal, el mismo volumen de carga y el mismo volumen de elución. Los resultados experimentales se resumen en la Tabla 20. Se consiguió un rendimiento del procedimiento muy consistente basado en la recuperación de producto calculada a partir de los resultados del ensayo de titulación.

Tabla 20. Procedimientos de confirmación de Mustang™ Q

Procedimiento Experimental	Recuperación (%)
A	73,0
B	81,4
C	70,8

Transferencia de tecnología, procedimientos de consistencia y procedimiento de purificación a gran escala de VSV_{IN} N4CT₁-gag₁

El fluido del cultivo celular que contiene VSV_{IN} N4CT₁-gag₁ después de la eliminación de los microportadores se usó como material de partida para el procedimiento de purificación completo. El procedimiento comprendió el aclarado del fluido del cultivo celular mediante centrifugación a baja velocidad y la recuperación del VSV en el sobrenadante; el filtrado del sobrenadante a través de un filtro de 0,45/0,2 µm y la recuperación del VSV en la

solución filtrada ; la carga de la solución filtrada de VSV en un adsorbente de membrana de intercambio aniónico, la recuperación del producto de VSV en las mezclas de elución; la purificación del VSV recuperado mediante filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana de peso molecular límite de 750 kDa y la recuperación del VSV en el retenido, y finalmente la filtración del retenido de VSV a través de un filtro de 0,2 µm y la recuperación del VSV en la solución filtrada. Se completaron con éxito tres procedimientos de consistencia a gran escala de 6 l (CR) y un procedimiento de 10 l (TTR).

Tabla 21. Condiciones del procedimiento de los procedimientos de consistencia a gran escala del VSV_{IN} N4CT1-gag1

Procedimiento	Condiciones del Procedimiento
Recuperación del producto por centrifugación	Centrífuga Batch 6238 x g, 30 min, 20-24°C
Recuperación del producto por filtración	Sartorius Sartobran™ 300 (para escala de 6 l), 500 (para escala de 10 l); Caudal: 200 ml/min (para escala de 6 l) y 300 ml/min (para escala de 10 l)
Cromatografía con Mustang™ Q	Cápsula Pall Mustang™ Q 10 ml, Caudal: 200 ml/min; Cápsula Pall Mustang™ Q 60 ml, Caudal: 600 ml/min
Ultrafiltración/diafiltración	GE Healthcare, MWCO: 750 kDa; Cinco intercambios de tampón; CR: 420 cm ² , CFR: 500-550 ml/min, TMP = 6,9-13,8 kPa; TTR: 1200 cm ² , CFR: 1800 ml/min, TMP = 13,8 kPa
Filtración Final	Sartorius Sartobran™ 150; 100 ml/min

Los resultados experimentales se resumen en las Tablas 22 y 23. Se realizó un análisis SDS-PAGE típico para el procedimiento (no se muestran los datos). La variación de la etapa de recuperación entre los diferentes procedimientos se debió a la variación del ensayo de potencia (ensayo de placa). El rendimiento global del procedimiento fue consistente para los procedimientos realizados. Se observó una eliminación consistente de impurezas de proteína y de ADN. Para todos los procedimientos, se obtuvo un producto vírico de alta calidad.

Tabla 22. Resumen de los procedimientos de consistencia de VSV_{IN} N4CT1-gag1

	Gran escala	CR Nº1	CR Nº2	TTR Nº1
Lote Nº	VSV060405	VSV060816	VSV060831	LP Nº1
Cultivo celular recolectado: Volumen (ml)	6612	5696	5692	8000
Cultivo celular recolectado: Título (pfu/ml)	5,55 x 10 ⁵	2,15 x 10 ⁵	1,69 x 10 ⁶	8,14 x 10 ⁵
Concentrado a granel purificado Vol. (ml)	280	530	280	850
Concentrado a granel purificado Título (pfu/ml)	1,45 x 10 ⁶	2,08 x 10 ⁵	3,00 x 10 ⁶	7,81 x 10 ⁶
Rendimiento del procedimiento (%)	11,7	9,1	8,7	10,2
ADN Residual (ng/ml)	32	12	13	6
Eliminación de impureza de proteína (%)	N/D	99,97	99,98	99,92

N/D: no determinado

Tabla 23. Análisis del procedimiento basado en la recuperación de producto

Etapas del procedimiento	CR Nº1	CR Nº2	Gran escala	Promedio ¹	DEVST ²	TTR Nº1
Recolección	100,0	100,0	100,0			100
Centrifugación	56,6	70,0	79,3	68,6	11,4	N/D
Dilución Pre SB	137,0	112,5	N/D	124,8	17,3	23,7
Filtración con Sartobran	96,5	71,8	98,1	88,8	14,7	257,2
Almacenamiento nocturno	89,8	41,9	N/D	65,9	33,9	48,6
Mustang Q	43,4	100,1	32,9	58,8	36,2	93,0
UF/DF	58,4	99,2	110,0	89,2	27,2	26,4
Filtración 0.2 mm	53,6	37,0	39,4	43,3	9,0	139,7
Rendimiento global	9,1	8,7	11,7	9,8	1,6	10,2

1, 2: Promedio y desviación estándar de CR Nº1-3; N/D: no determinado.

El procedimiento de purificación para VSV_{IN} N4CT1-gag1 tuvo éxito en la obtención de un producto de alta calidad. Las condiciones de producción fueron adaptadas a una escala de 10 l (en volumen de cultivo celular) con un rendimiento consistente del procedimiento. El rendimiento global del procedimiento basado en el título de VSV del ensayo en placa fue menor que el obtenido para VSV_{IN} N4CT9-gag1 y VSV_{NJ} N4CT1-gag1. La pérdida de título mayoritaria se observó en la filtración final a 0,2 µm y, posiblemente, también en la etapa de Mustang™ Q. La unión no específica podría explicar la pérdida, especialmente a causa de que el estudio se abordó con unos materiales de partida de bajo título. Cuanto menor sea el título, una mayor cantidad del virus se perderá en los filtrados. El

5 aumento del título de VSV en el cultivo celular fue una buena resolución. Los diferentes componentes, excipientes y condiciones operativas del tampón que se usan para reducir la pérdida de título del virus en el procedimiento de purificación y la selección de un sistema de tampones adecuado para el producto vírico son modificaciones de este sistema de purificación, que se cree que forman parte de la experiencia de la técnica y no hace necesario recurrir a experimentaciones adicionales.

Ejemplo 12: purificación del VSV a gran escala para el constructor VSV_{NJ} N4CT₁-gag1

El procedimiento de purificación según se describe en el Ejemplo 9 para el VSV_{IN} N4CT₉-gag1 se aplicó con éxito a este constructor y se adaptó a una escala de 10 l (en volumen de cultivo celular). Se ha obtenido un producto de alta calidad a través de este procedimiento de purificación.

10 En el procedimiento de purificación, las etapas de aclarado primario y secundario fueron similares a las descritas en los Ejemplos 3 y 4. La etapa de adsorción de membrana de intercambio aniónico usando el adsorbente Mustang™ Q se optimizó de la siguiente manera. La filtración de flujo tangencial se realizó utilizando sistemas Quixstand™ o Flexstand™ con cartuchos de membrana de fibra hueca (GE Healthcare; Piscataway, NJ). Se ensayaron en este estudio las membranas de ultrafiltración de polietersulfona de GE con valores de peso molecular límite (MWCO) de 750 kDa. Todas las membranas tenían un área superficial de filtración nominal de 420 cm² o 1200 cm². Los experimentos de cromatografía de membrana se realizaron usando sistemas AKTA™ explorer y AKTAPilot™ (GE Healthcare; Piscataway, NJ) con adsorbentes de membrana Mustang™ Q de Pall (Pall Corporation; East Hills, NY).

20 El primer ensayo de purificación con Mustang™ Q para el VSV_{NJ} N4CT₁-gag1 obtuvo un producto de alta calidad basado en análisis SDS-PAGE, utilizando las mismas condiciones operativas descritas en el procedimiento de purificación del VSV_{IN} N4CT₉-gag1. Sin embargo, se detectó un alto nivel de ADN residual en la mezcla de elución del producto. Usando la cromatografía de membrana, se desarrollaron las condiciones de la unión y la elución con Mustang™ Q para conseguir una alta purificación y un producto de alta calidad. Se demostró una elevada consistencia del rendimiento del procedimiento en los experimentos posteriores, incluyendo procedimientos a pequeña escala y procedimientos de consistencia a gran escala, usando las siguientes condiciones operativas. El procedimiento de purificación también se transfirió con éxito a la Organización de Fabricación por Contrato (CMO) para la producción de materiales para ensayos clínicos.

Primera purificación con Mustang™ Q para VSV_{NJ} N4CT₁-gag1

30 La etapa de Mustang™ Q se realizó usando fluido de cultivo celular y los mismos tampones y condiciones operativas que se describieron en el procedimiento de purificación del VSV_{IN} N4CT₉-gag1. Como resumen, se eliminaron las células y los residuos por centrifugación. Después de acondicionar mediante la adición de 1x sacarosa fosfato glutamato (SPG) y diluir dos veces con HEPES 10mM, NaCl 0,465 M, pH 7,5, sacarosa al 2%, el sobrenadante se bombeó a través de un filtro de 0,2 µm. El filtrado se cargó en un adsorbente de membrana Mustang™ Q de Pall equilibrado previamente (volumen de cápsula de 0,35 ml) y se recogió la mezcla tras flujo continuo y lavado (FT&W). El producto de VSV se obtuvo usando el tampón de elución y las condiciones operativas que se describen en el procedimiento de purificación del VSV_{IN} N4CT₉-gag1. También se recogió una mezcla a partir de la regeneración usando HEPES 10 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5, sacarosa al 2%. Finalmente se limpió el Mustang™ Q con una solución de NaOH 1,0 M. Se observó una elevada capacidad de unión al VSV en el experimento. Sin embargo, se recuperó muy poco producto en la mezcla de elución (no se muestran los datos). El producto vírico se detectó principalmente en la mezcla de regeneración, y no se recuperó más de la mitad del producto vírico (véase Tabla 14). Se detectó un alto nivel de contaminantes de ADN en las mezclas de regeneración y elución. Las condiciones de unión y elución para el Mustang™ Q se optimizaron adicionalmente para este nuevo constructor con objeto de incrementar la recuperación de producto y reducir al mismo tiempo el nivel de ADN residual.

Tabla 24. Análisis del procedimiento de Mustang™ Q - Recuperación de título y eliminación de ADN

PROCEDIMIENTO:	Alimentación	FT&W	Elución	Regeneración
Volumen (ml)	312	330	35	15
Título de Virus(pfu/ml)	6,71 x 10 ⁵	BD	5,94 x 10 ⁵	5,00 x 10 ⁶
Título de Virus (pfu)	2,09 x 10 ⁸	BD	2,08 x 10 ⁷	7,50 x 10 ⁷
Recuperación del Virus (%)	100,0	0,0	9,9	35,8
ADN (ng/ml)	123	16	84	782
ADN (ng)	38376	5280	2940	11730
Recuperación de ADN (%)	100,0	13,76	7,66	30,57
ADN (ng/dosis*)	1833,1	n/a	1414,1	1564,0

* 1 dosis = 1,0 x 10⁷ pfu; BD: por debajo del límite de detección

45

Como se describe previamente, la purificación de VSV_{IN} N4CT₉-gag1 se abordó mediante aclarado de ADN a partir del producto final. Se usaron KGaA™ TMAE™ de Merck y Mustang™ Q de Pall para la optimización adicional de las condiciones.

Desarrollo de la purificación del VSV usando resina TMAE™

- 5 La evaluación de la condición del tampón de unión de VSV en resina TMAE™ se realizó usando un diseño experimental factorial completo como se muestra en la Tabla 25. La alimentación fue sobrenadante de cultivo celular ajustada a diferentes condiciones del tampón de carga. Se monitorizó el VSV en el flujo continuo usando análisis por transferencia de Western.

Tabla 25. Diseño factorial completo para las condiciones de unión con TMAE™

Factores	pH	Concentración de NaCl en el tampón de equilibrado (mM)
Nivel	6,5, 7,0, 7,5	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400

- 10 Como indicó el análisis por transferencia de Western (no se muestra), cuando la concentración de NaCl en el tampón de equilibrado alcanzaba 200 mM, se observaba una cantidad significativa de VSV en las mezclas de los flujos continuos. El comportamiento de unión del VSV no se vio afectado de forma dramática en el ensayo de las condiciones de pH. Sin embargo, el análisis de la recuperación de VSV en la mezcla de elución, estimado mediante la integración del área del pico de SE-HPLC de la mezcla de elución con TMAE (Figuras 8A, 8B y 8C)
- 15 indicó que con la misma concentración de NaCl de unión, se conseguía una mayor capacidad a mayores condiciones de pH (pH 7,5 frente a pH 7,0 y 6,5).

Ensayo de purificación de VSV usando una columna TMAE

- Se eliminaron las células y los residuos celulares del fluido de cultivo celular que contenía VSV_{IN} N4CT₉-gag1 mediante una centrifugación a 5000 rpm durante 30 minutos a 20-24 °C. El sobrenadante se bombeó a través de un filtro de 0,45/0,2 µm después de mezclarlo con una solución de reserva 10x SPG en una relación de 9 a 1. El filtrado se usó para alimentar la columna de TMAE (2 ml) con un caudal de 4 ml/min. La columna se equilibró previamente con HEPES 10 mM, NaCl 0,465 M, sacarosa al 2%, pH 7,4. Después de cargar la columna con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrado, los materiales unidos se eluyeron de la columna mediante un gradiente de HEPES 10 mM, NaCl 1,5 M, sacarosa al 2%, pH 7,5 en 30 CV. Se recogieron las diferentes mezclas de elución.
- 25

Tabla 26: Elución de VSV de una columna de TMAE

Muestras	Descripción	Volumen (ml)
Alimentación	Post filtrado a 0,2 µm	130
FT&W	Flujo continuo y lavado	150
F1	A3-10	16
F2	A11-B12	6
F3	B11-B1	22
F4	C12-D11 (NaOH 0,5 M)	6

- La electroforesis en gel SDS-PAGE (no se muestra) permitió observar dos picos principales en el perfil de elución. El primer pico F1 tenía una baja relación UV 254/280, indicando contenidos elevados de proteína/virus. El segundo pico F2 tenía una elevada relación UV 254/280, sugiriendo un contenido elevado de ácidos nucleicos. El ensayo de PicoGreen® confirmó que el nivel de ADN en la mezcla de la fracción F1 era extremadamente bajo (no se muestran los datos). Por tanto, esta columna se usó en la eliminación de ADN. La recuperación de título en este pico fue del 81,4 % mediante análisis de placa. Sin embargo, se detectó un alto nivel de impurezas de proteína.
- 30

Purificación de VSV usando adsorbente de membrana Mustang™ Q

- La evaluación de las condiciones de unión de VSV en adsorbente de membrana Mustang™ Q se realizó utilizando un diseño experimental factorial completo como se muestra en la Tabla 27. La alimentación fue sobrenadante de cultivo celular ajustada con diferentes condiciones del tampón de carga. Las diferentes muestras de elución en Mustang™ Q se analizaron usando el análisis SDS-PAGE (no se muestra).
- 35

Tabla 27. Diseño factorial completo para la evaluación de las condiciones de unión en Mustang™ Q

Factores	pH	Concentración de NaCl en el tampón de equilibrado (mM)
Nivel	6,5, 7,0, 7,5	0,15, 0,20, 0,22, 0,24, 0,26, 0,28

- El análisis por SDS-PAGE de la evaluación de las condiciones de unión de VSV en el adsorbente Mustang™ Q mostraron mezclas de elución con diferentes concentraciones de NaCl de unión: 0,15, 0,20, 0,22, 0,24, 0,26, 0,28 M, respectivamente. Cuando la concentración de NaCl en el tampón de equilibrado alcanzaba 0,26 M, se eliminaban las impurezas de proteínas de alto peso molecular de las mezclas de elución para todas las
- 40

condiciones de pH ensayadas.

Evaluación de las condiciones de elución

5 El sobrenadante del cultivo celular que contenía VSV_{IN} N4CT₉-gag1 se diluyó dos veces con una solución de reserva de HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 0,415 M, sacarosa al 2%, pH 7,25) para alcanzar una concentración final de NaCl de 0,28 M. La solución preparada se usó como alimentación en el experimento. El diseño experimental para este estudio se resume en la Tabla 28. Después de la unión con el adsorbente de membrana Mustang™ Q, se eluyó el VSV con tampones de elución con diferentes concentraciones de NaCl.

Tabla 28. Diseño factorial completo para el estudio de la evaluación de las condiciones de elución en Mustang™ Q

Factores	pH	Concentración de NaCl en el tampón de elución (M)
Nivel	6,5, 7,0, 7,5	0,55, 0,60, 0,65, 0,70 y 0,75

10 Una gráfica de contorno del procedimiento de recuperación (no se muestra) indica que para conseguir una recuperación razonable en el procedimiento (>55%), las condiciones del tampón de elución se deberían mantener de la siguiente manera: pH = 6,5-6,9 y concentración de NaCl = 0,55-0,70 M. Con estas condiciones, se ha obtenido un producto de VSV de alta calidad, como muestra el análisis SDS-PAGE para las mezclas de elución en Mustang™ Q (no se muestra).

Optimización de las condiciones de Mustang™ Q usando aproximaciones DOE

15 Las optimizaciones adicionales en la etapa de Mustang™ Q dieron como resultado unas mejores condiciones de elución y unión del VSV para lograr un alto nivel de aclarado de ADN y un elevado rendimiento del procedimiento. El diseño experimental se muestra en la Tabla 29. Se seleccionó un pH de elución y carga entre 6,5 y 7,0 basado en los estudios de evaluación iniciales y en experiencias previas con VSV_{IN} N4CT₉-gag1. Las diferentes concentraciones de NaCl en los tampones de elución y carga también se eligieron a partir de los resultados de los estudios de evaluación iniciales. El caudal en todos los experimentos se mantuvo en 7,0 ml/min, que era de 20 volúmenes de cápsula (CV)/min.

Tabla 29. Purificación de VSV en adsorbente Mustang™ Q

Exp Nº	NaCl de unión (M)	pH de unión	NaCl de elución (M)	pH de elución
1	0,26	6,5	0,550	6,50
2	0,26	6,5	0,700	6,75
3	0,26	7,0	0,625	7,00
4	0,26	7,5	0,550	6,75
5	0,26	7,5	0,700	6,50
6	0,28	6,5	0,550	7,00
7	0,28	6,5	0,625	6,50
8	0,28	7,0	0,550	6,50
9	0,28	7,0	0,625	6,75
10	0,28	7,0	0,625	6,75
11	0,28	7,0	0,625	6,75
12	0,28	7,0	0,625	6,75
13	0,28	7,5	0,700	7,00
14	0,30	6,5	0,550	6,50
15	0,30	6,5	0,700	7,00
16	0,30	7,0	0,625	6,75
17	0,30	7,0	0,700	6,50
18	0,30	7,5	0,550	7,00
19	0,30	7,5	0,625	6,50

Resultados experimentales

25 El rendimiento del procedimiento se calculó basándose en la determinación del título de producto de VSV mediante ensayo de placa. Los resultados se resumen en un perfil de predicción (no se muestra). Para maximizar el rendimiento del procedimiento, se identificaron las siguientes condiciones de tampón en la adsorción con Mustang™ Q:

30 Concentración de NaCl en el tampón de carga: 0,26-0,30 M
 pH del tampón de carga: 7,0-7,5
 Concentración de NaCl en el tampón de elución: 0,55-0,65
 pH del tampón de elución: 6,5-7,0

Los niveles de ADN residual en las mezclas de elución de Mustang™ Q con diferentes condiciones de unión se informaron en gráficos de contorno (no se muestran). Las condiciones del tampón de Mustang™ Q se refinaron adicionalmente basándose en los resultados de aclarado de ADN:

- 5 Concentración de NaCl en el tampón de carga: 0,27-0,29 M
- pH del tampón de carga: 7,0-7,5
- Concentración de NaCl en el tampón de elución: 0,55-0,65
- pH del tampón de elución: 6,5-7,0

10 La pureza del producto de VSV en las mezclas de elución de Mustang™ Q se estimó mediante densitometría de SDS-PAGE (no se muestra). Se analizó la pureza del producto con diferentes condiciones del tampón de unión y con diferentes condiciones del tampón de elución. Considerando la variación en los análisis por densitometría, no hubo diferencias significativas en la pureza del producto de VSV en ninguno de los casos. Se obtuvo un producto de VSV de alta calidad en todos los experimentos.

Rangos de operación de Mustang™ Q

15 Las condiciones de los tampones de elución y unión de la cromatografía de membrana con Mustang™ Q se definieron mediante la realización de experimentos con más puntos de operación dentro y fuera de las condiciones desarrolladas, como se muestra en la Tabla 30. El tampón de elución/equilibrado fue HEPES 10 mM, sacarosa al 2% con varias cantidades de NaCl y diferentes condiciones de pH. Las mismas condiciones de operación se mantuvieron en todos los procedimientos: el mismo caudal, el mismo volumen de carga y el mismo volumen de elución. Se observó un rendimiento del procedimiento consistente, como se muestra en la Tabla 30:

20 se obtuvo un producto de VSV de alta calidad basado en los análisis SDS-PAGE; se logró un nivel aceptable de aclarado de ADN residual en todas las mezclas de elución de Mustang™ Q; también se obtuvo un rendimiento del procedimiento similar.

Tabla 30. Experimento de rango de operación de Mustang™ Q

pH de carga	NaCl de carga (M)	pH de elución	NaCl de elución (M)	Rendimiento (% título)	Pureza (% SDS/PAGE)	ADN (ng/ml)
7,5	0,30	6,75	0,60	52,0	72,0	34
7,0	0,30	6,75	0,60	85,7	80,0	33
7,5	0,26	6,75	0,60	49,1	76,1	34
7,0	0,26	6,75	0,60	68,0	73,0	39
7,5	0,28	7,00	0,65	85,7	79,6	21
7,5	0,28	6,50	0,65	70,9	82,3	18
7,5	0,28	6,50	0,55	49,5	82,8	15
7,5	0,28	7,00	0,55	59,9	83,3	21
7,5	0,28	6,75	0,60	52,6	ND*	17
7,5	0,28	6,75	0,60	107,2	ND*	30

N/D: no determinado

25 **Procedimientos de consistencia de VSV_{IN} N4CT₉-gag1**

El procedimiento de purificación completo se realizó utilizando fluido de cultivo celular que contenía VSV_{IN} N4CT₉-gag1. El procedimiento consta de: el aclarado del fluido de cultivo celular mediante centrifugación a baja velocidad y la recuperación del VSV en el sobrenadante; el filtrado del sobrenadante a través de un filtro de 0,45/0,2 µm y la recuperación del VSV en la solución filtrada; la carga del filtrado de VSV en un adsorbente de membrana de intercambio aniónico, la elución del VSV de un adsorbente de membrana de intercambio aniónico y la recuperación del producto de VSV; la purificación del VSV recuperado mediante filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana de fibra hueca de peso molecular límite de 750 kDa y la recuperación del VSV en el retenido, y el filtrado del retenido de VSV a través de un filtro de 0,2 µm y la recuperación del VSV en la solución filtrada. Se completaron un procedimiento de 10 l y dos de 6 l en Wyeth como "procedimientos de consistencia" y se consiguieron dos procedimientos de 10 l en Henogen como procedimientos de transferencia de tecnología. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 31.

Tabla 31. Condiciones de procedimiento para los procedimientos de VSV_{IN} N4CT₉-gag1

Procedimiento	Condiciones de procedimiento
Recuperación de producto por centrifugación	Centrífuga Batch 6236 x g, 30 min, 20-24°C
Recuperación de producto por filtración	Sartorius Sartobran™ 300 para escala de 6 l, 500 para escala de 10 l; Caudal: 200 ml/min para escala de 6 l y 300 ml/min para escala de 10 l
Cromatografía con Mustang Q	Cápsula Pall Mustang™ Q 10 ml, Caudal: 200 ml/min; Cápsula Pall Mustang™ Q 60 ml, Caudal: 600 ml/min

Ultrafiltración/Diafiltración TFF	GE Healthcare, MWCO: 750 kDa; Cinco intercambios de tampón; CR: 420 cm ² , CFR: 500-550 ml/min, TMP = 6,9-13,8 kPa; TTR: 1200 cm ² , CFR: 1800 ml/min, TMP = 13,8 kPa
Filtración final	Sartorius Sartobran™ 150; Caudal: 100 ml/min

Se usó una cápsula de 10 ml de Mustang™ Q en tres procedimientos de consistencia (CRs) y un procedimiento de transferencia de tecnología (TTR). Se usó una cápsula de 60 ml de Mustang™ Q únicamente en un TTR. El caudal fue de 200 ml/min para la cápsula de 10 ml y 600 ml/min para la cápsula de 60 ml. Se usó una membrana TFF de 420 cm² en los procedimientos de consistencia mientras que se usó una de 1200 cm² en los TTRs. El caudal cruzado se ajustó linealmente de acuerdo con el área de membrana.

Los resultados experimentales se resumen en las Tablas 32 y 33. El rendimiento global del procedimiento fue consistente para todos los procedimientos realizados. La variación de la etapa de recuperación entre los diferentes procedimientos se debe a la variación del ensayo de potencia (Tabla 33). Se observó una eliminación consistente de las impurezas de proteína y ADN en todos los procedimientos (Tabla 32). Un análisis típico por SDS-PAGE acompañó a esta evaluación (no se muestra). Se obtuvo un producto vírico de alta calidad a través de este procedimiento de purificación.

Tabla 32. Resumen de los procedimientos de consistencia del VSV_{NJ}N4CT₁-gag1

	CR N°1	CR N°2	CR N°3	TTR N°1	TTR N°2
Lote N°	VSV060629	VSV060712	VSV060728	Henogen N°1	Henogen N°2
Cultivo celular recolectado: Volumen (ml)	8927	5704	5607	8072	7980
Cultivo celular recolectado: Título (pfu/ml)	1,28 x 10 ⁷	2,81 x 10	2,56 x 10 ⁷	1,27 x 10 ⁷	8,14 x 10 ⁶
Concentrado a granel purificado Vol. (ml)	800	670	600	855	550
Concentrado a granel purificado Título (pfu/ml)	8,22 x 10 ⁷	1,45 x 10 ⁸	1,16 x 10 ⁸	2,86 x 10 ⁷	5,36 x 10 ⁷
Rendimiento del procedimiento (%)	57,7	60,8	55,8	23,9	45,4
ADN Residual (ng/ml)	18	22	11	51	21
Eliminación de impureza de proteína (%)	99,83	99,84	99,89	99,72	NA
NA: no disponible					

Tabla 33. Análisis del procedimiento basado en la recuperación de producto

Etapa del procedimiento	CR N°1	CR N°2	CR N°3	Promedio ¹	DEVST ²	TTR N°1	TTR N° 2
Recolección	100	100	100	100	0	100	100
Centrifugación	113,8	97,6	96,3	102,6	9,8	188,6	71,2
Filtración Sartobran™	107,6	90,8	123,6	107,3	16,4	23,8	71,6
Almacenamiento nocturno	N/D	76,8	85,5	81,2	6,2	N/D	N/D
Mustang™ Q	37,5	70,7	42,7	50,3	17,9	309,3	60,2
UF/DF	116,7	102,8	129,9	116,5	13,6	16,5	123,4
Filtración 0.2 µm	107,7	131,2	85,8	108,2	22,7	134,2	119,9
Rendimiento global	57,7	60,8	48,8	55,8	6,2	23,9	45,4
1, 2: Promedio y desviación estándar de CR N°1-3; N/D: no determinado.							

De esta manera, se ha desarrollado con éxito un procedimiento de purificación para el VSV_{NJ} N4CT₁-gag1 y las condiciones de purificación desarrolladas se adaptaron a una escala de 10 l (en volumen de cultivo celular), manteniendo aún el mismo rendimiento del procedimiento. El procedimiento se confirmó mediante tres procedimientos de consistencia y dos procedimientos de transferencia de tecnología a una escala de 6 a 10 l (en volumen de cultivo celular). Se obtuvo un producto vírico de alta calidad a través del procedimiento desarrollado con un rendimiento de procedimiento y un aclarado de impurezas aceptables.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar el virus de la estomatitis vesicular (VSV) secretado en el fluido del cultivo celular de un cultivo celular de mamífero infectado con el VSV, que comprende:

- 5 (a) aclarado del fluido del cultivo celular mediante centrifugación a baja velocidad y recuperación del VSV del sobrenadante;
 (b) filtrado del sobrenadante de la etapa (a) a través de un filtro de 0,2 a 0,45 μm y recuperación del VSV en la solución filtrada;
 (c) carga de la solución filtrada del VSV en la etapa (b) sobre un adsorbente de membrana de intercambio aniónico equilibrado con una primera solución salina de pH tamponado, elución del VSV en el adsorbente de membrana de intercambio aniónico con una segunda solución salina de pH tamponado,
 10 y recuperación de las fracciones eluidas del VSV;
 (d) purificación del VSV recuperado en la etapa (c) mediante filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana de peso molecular límite entre 300 kDa y 1000 kDa y recuperación del VSV en el retenido, y
 15 (e) filtrado del retenido del VSV en la etapa (d) a través de un filtro de 0,2 a 0,22 μm y recuperación del VSV en la solución filtrada.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el VSV recuperado en la etapa (e) está libre de contaminantes de proteínas y ácidos nucleicos en el cultivo celular, al menos en un 90,0% y hasta aproximadamente un 99,0%.

3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las células de mamífero se seleccionan de células renales embrionarias humanas (HEK), células HEK 293, células ováricas de hamster chino (CHO), células renales de cría de hamster (BHK), células renales de mono verde africano (AGMK) y células Vero (AGMK).

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la centrifugación a baja velocidad es entre 4400 x g y 8000 x g.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que primera solución salina de pH tamponado o la segunda solución salina de pH tamponado en la etapa (c) **se caracteriza** independientemente por una o más de las características seleccionadas del grupo que consiste en:

- 25 (a) contiene una sal seleccionada independientemente entre NaCl o KCl;
 (b) contiene una sal con una fuerza iónica de 100 mM a 400 mM;
 (c) contiene una disolución tampón con un pKa entre 6,0 y 8,5;
 (d) tiene un pH de 6,5 a 8,0;
 30 (e) comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en un tampón fosfato, un tampón del ácido N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) o tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS); y
 (f) comprende sacarosa en una concentración del 1,5% al 5%.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la sal de la segunda solución salina de pH tamponado es NaCl y en el que el VSV se eluye del adsorbente de membrana por la adición de la segunda solución salina de pH tamponado en una etapa única, en el que la concentración del NaCl en la elución en la etapa única está entre 500 mM y 750 mM.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la segunda solución salina de pH tamponado tiene un caudal de elución de 10 volúmenes de cápsula/minuto (CV/minuto) a 30 CV/minuto.

8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la sal de la segunda solución salina de pH tamponado es NaCl y en el que la fuerza iónica del NaCl en la segunda solución salina de pH tamponado se aumenta linealmente desde 1 mM a 750 mM con un caudal de elución de 10 CV/minuto a 30 CV/minuto.

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la membrana para la filtración de flujo tangencial (TFF) **se caracteriza por** una o más de las características seleccionadas del grupo que consiste en:

- 45 (a) un peso molecular límite de 300kDa;
 (b) un peso molecular límite de 750 kDa; y
 (c) un módulo de membrana de fibra hueca.

10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la filtración de flujo tangencial (TFF) comprende la concentración del VSV recuperado en la etapa (c) al menos 5 veces, seguido de al menos uno, o al menos cinco intercambios de tampón.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el tampón usado en el intercambio de tampón **se caracteriza por** una o más de las características seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) un tampón fosfato;
 (b) un tampón HEPES;

- (c) un tampón TRIS;
 - (d) una concentración del tampón de 5 mM a 15 mM y un pH de 7,2 a 7,5; y
 - (e) una disolución tampón que comprende adicionalmente NaCl de 100 mM a 200 mM y sacarosa entre un 3,5% y un 4,5%.
- 5 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los procedimientos de la etapas (a) a (e) se llevan a cabo a una temperatura o temperaturas de o entre 15 °C y 25 °C.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el aclarado del fluido del cultivo celular en la etapa (a) se lleva a cabo con un módulo de filtración en profundidad de 1,0 µm a 4,5 µm, en el que se omite en la etapa (a) la centrifugación a baja velocidad.
- 10 14. Un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el VSV purificado se formula dando una composición farmacéutica.



Figura 1

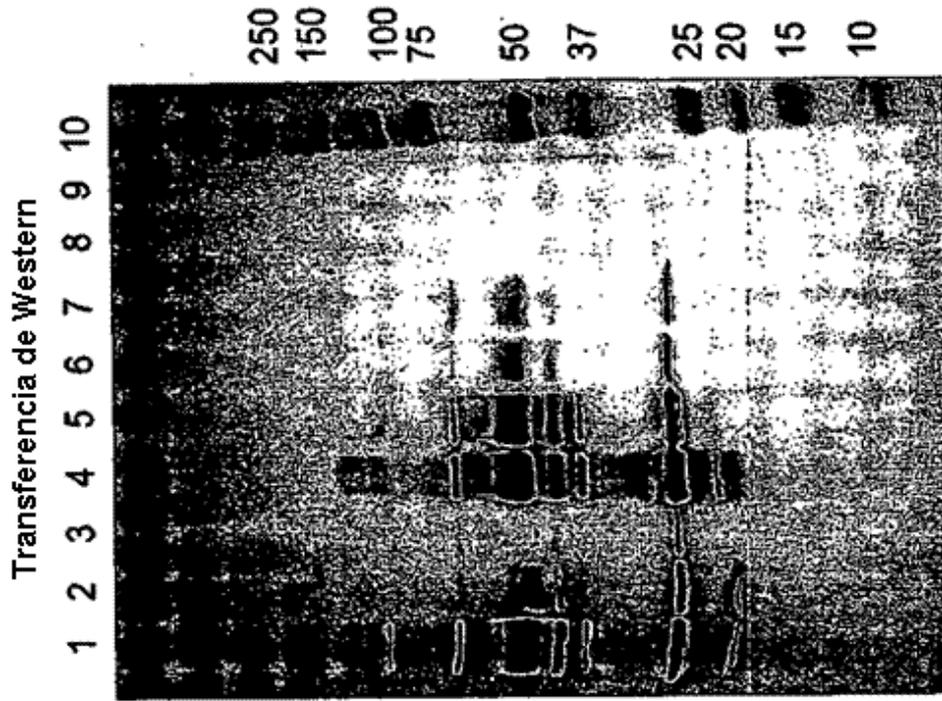


Figura 2B

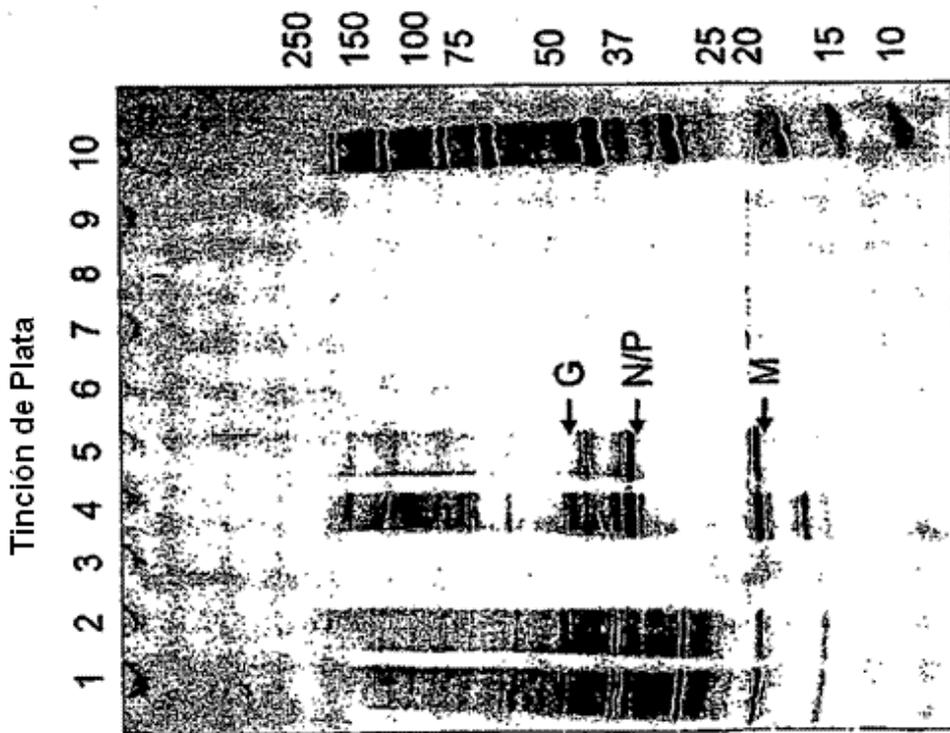


Figura 2A

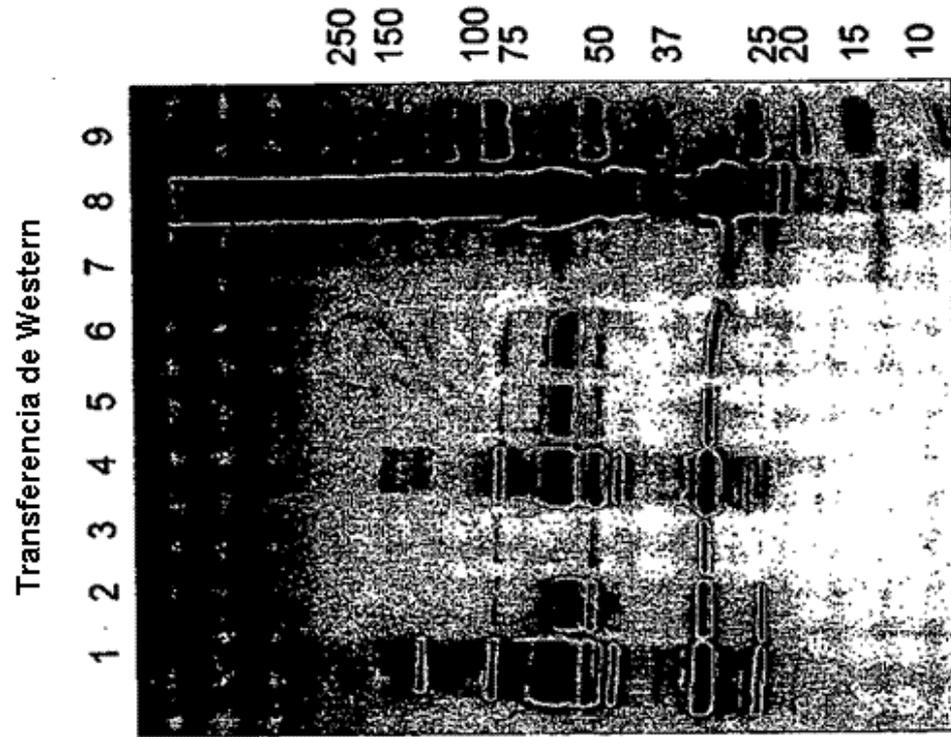


Figura 3B

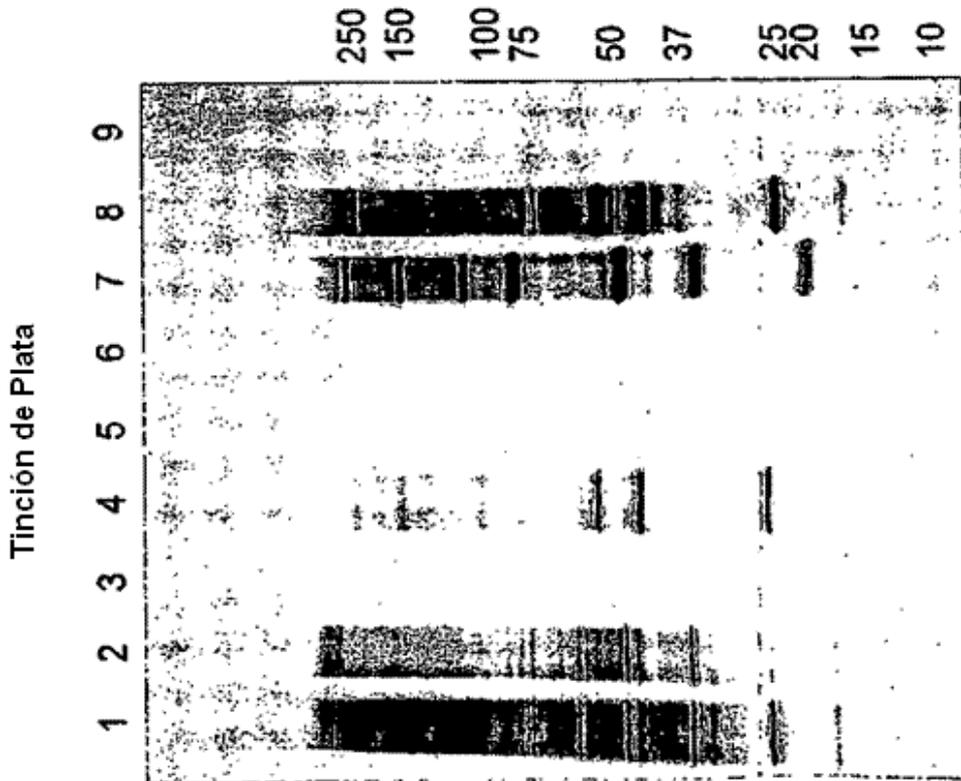


Figura 3A

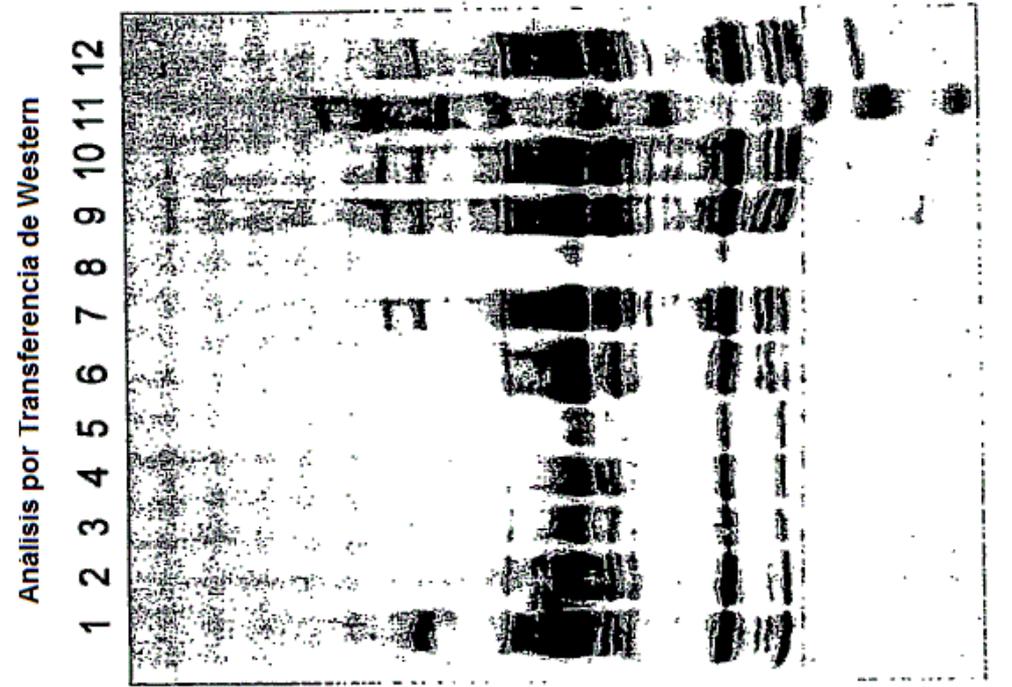


Figura 4B

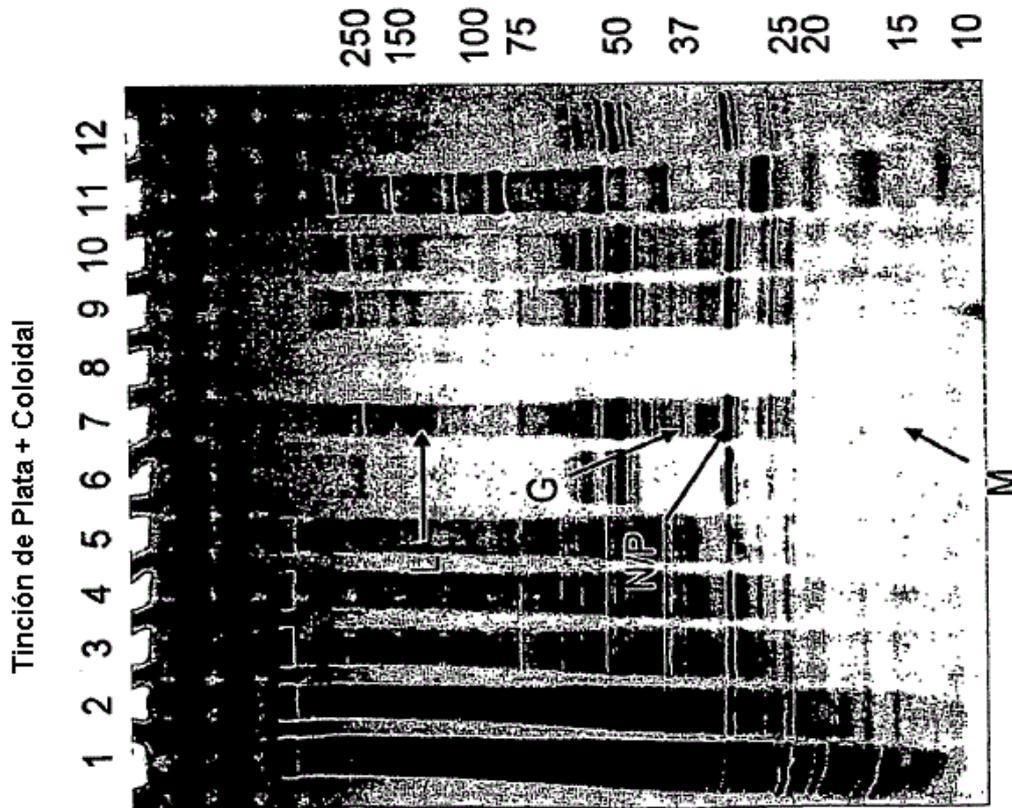


Figura 4A

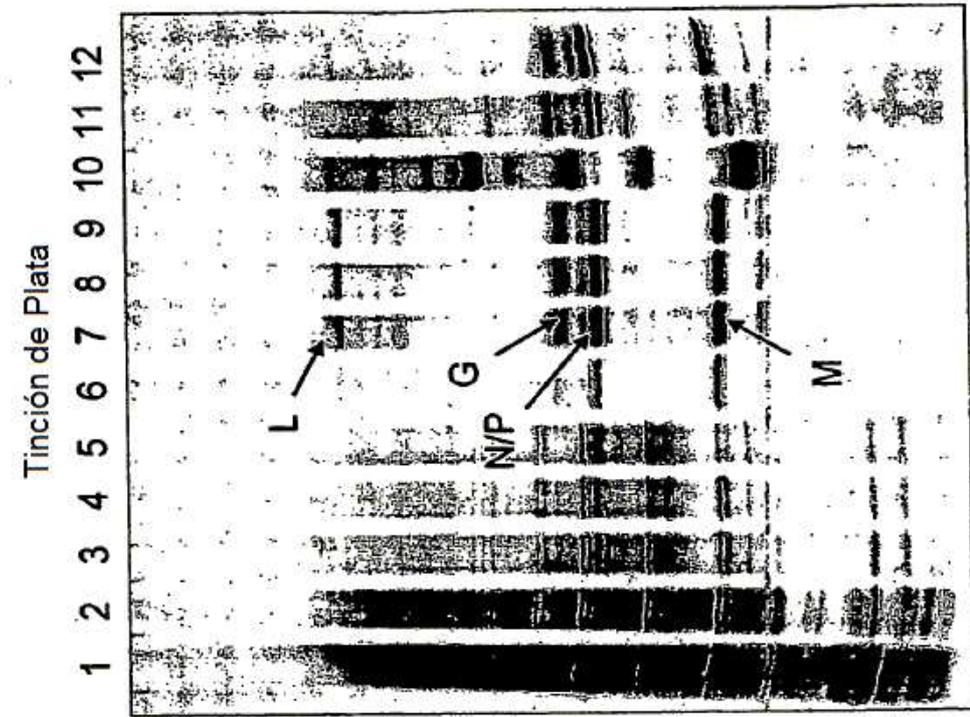


Figura 5B

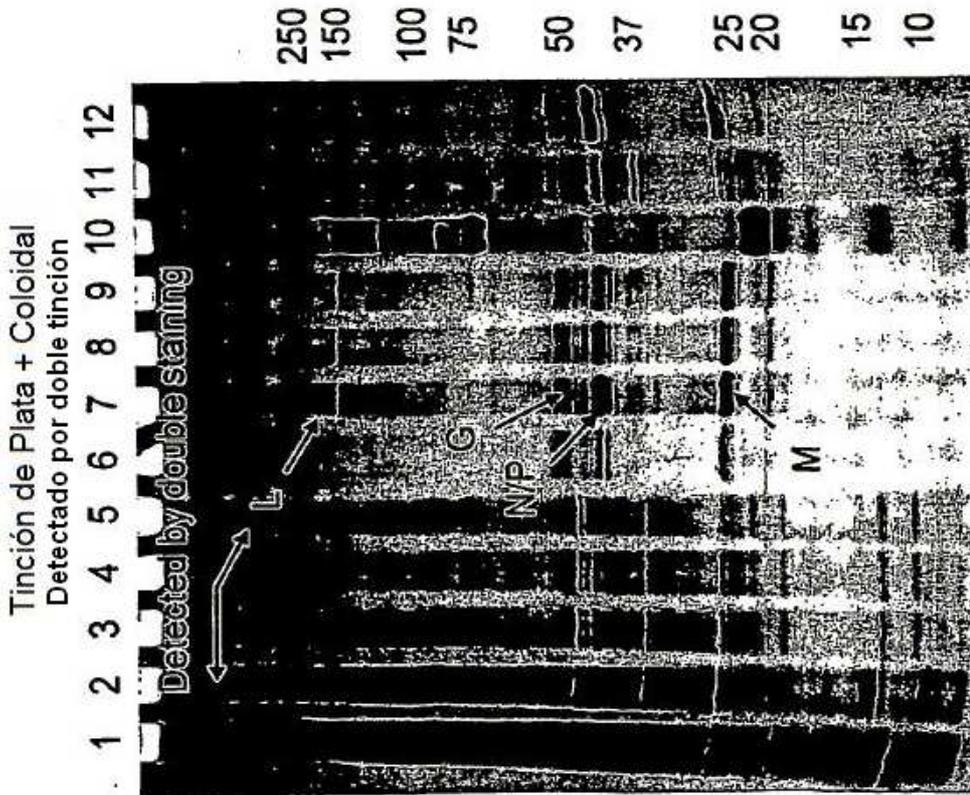


Figura 5A

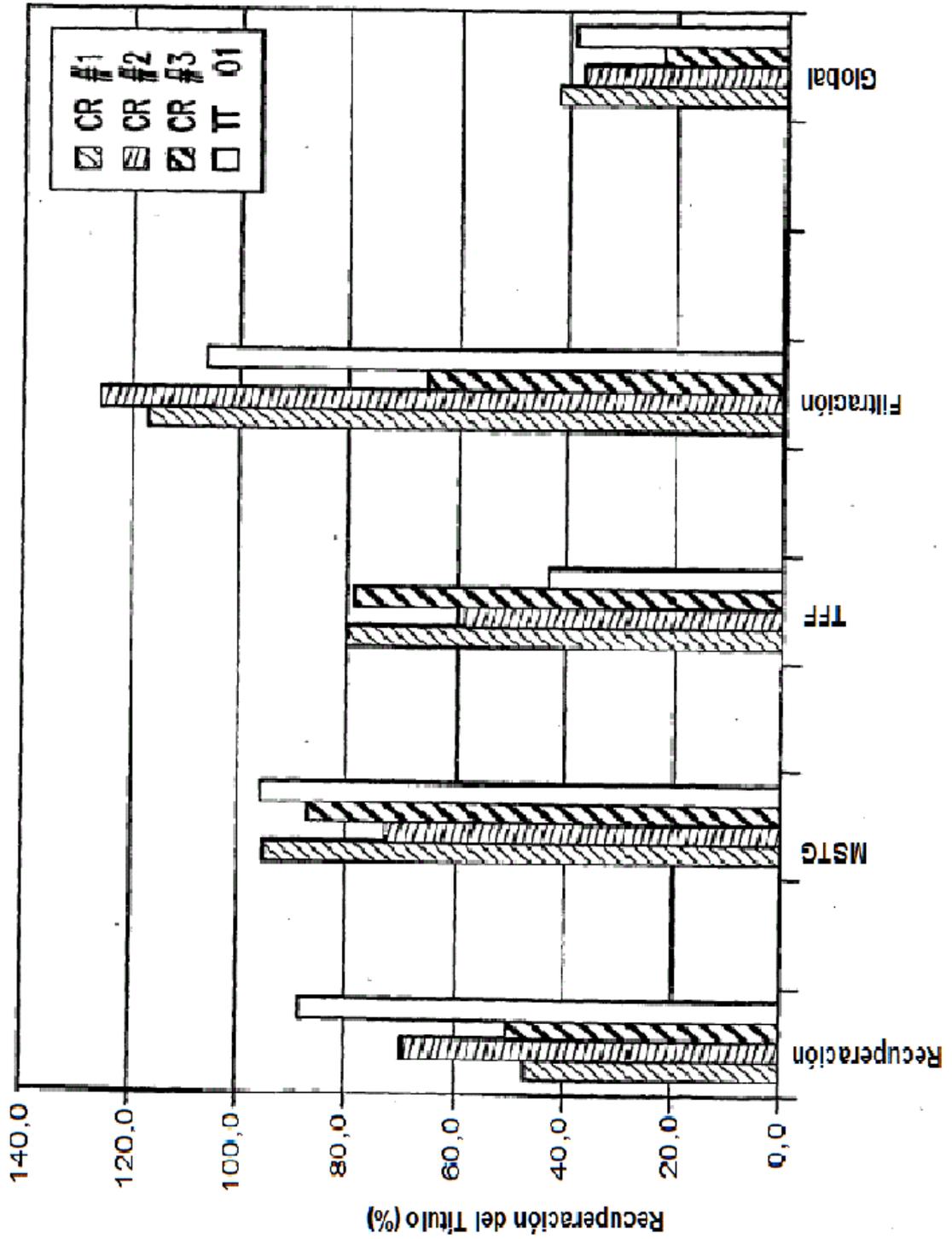


Figura 6

Eliminación de la impureza de Proteína en MSTG Q

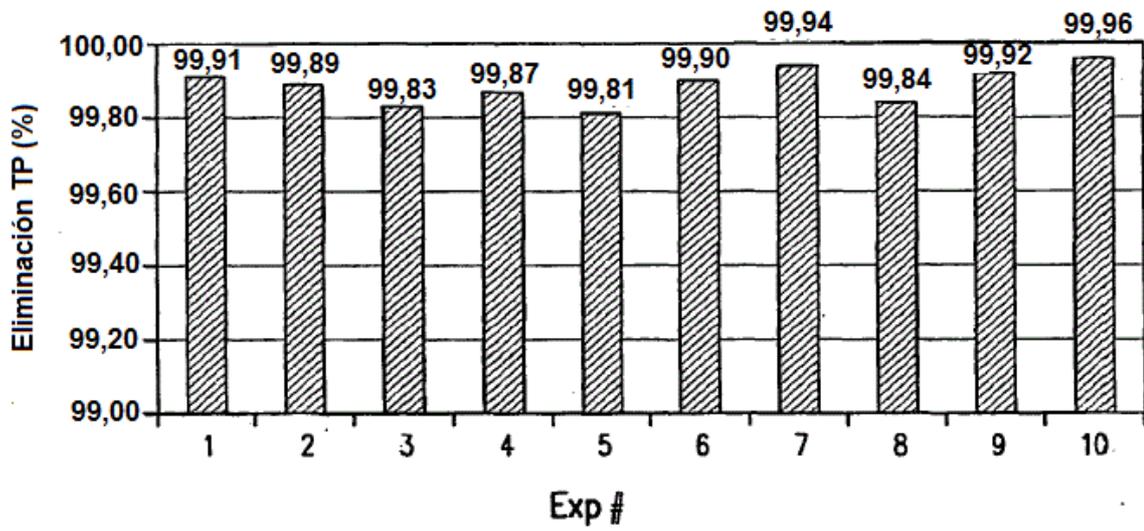


Figura 7

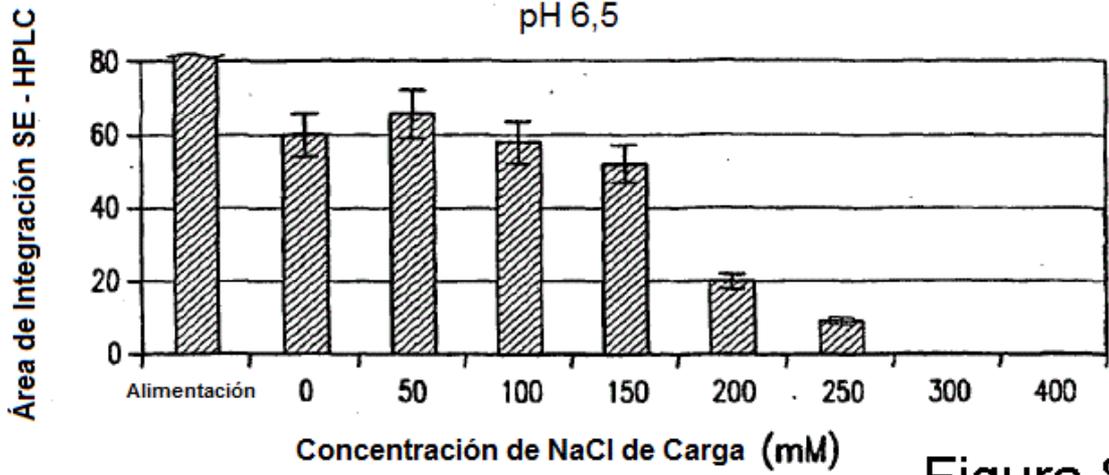


Figura 8A

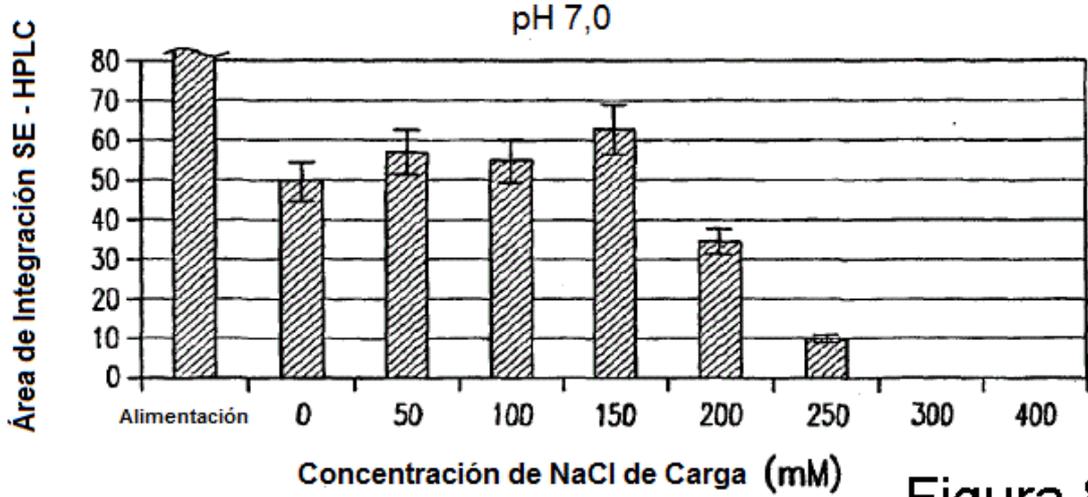


Figura 8B

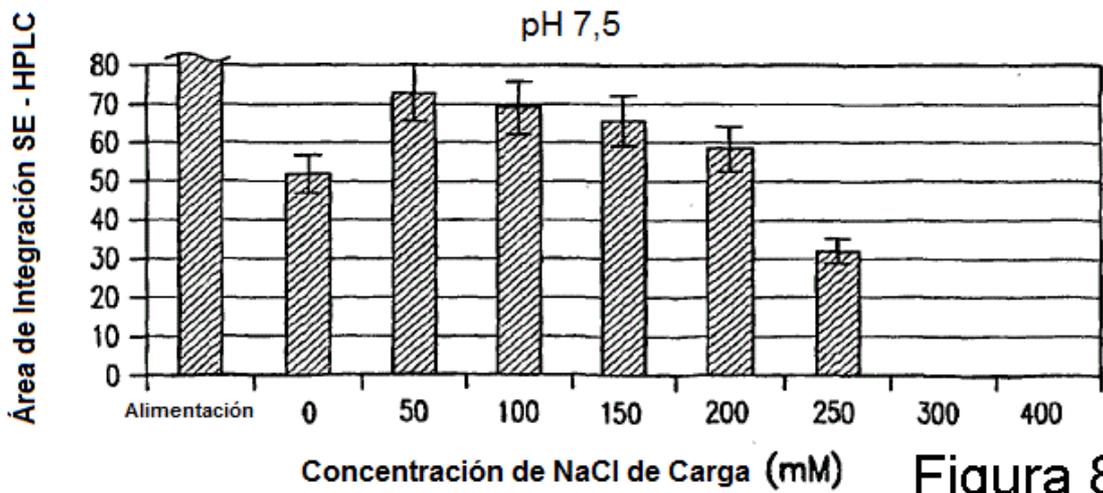


Figura 8C