

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 713**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10771402 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2488635**

54 Título: **Proceso para la purificación de adenovirus a partir de cultivos de alta densidad celular**

30 Prioridad:

15.10.2009 US 279060 P

15.10.2009 EP 09173119

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

04.03.2014

73 Titular/es:

CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)

Archimedesweg 4

2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

DE VOCHT, MARCEL, LEO y

VEENSTRA, MARLOES

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 445 713 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

Proceso para la purificación de adenovirus a partir de cultivos de alta densidad celular

- 5 La invención se refiere al campo de la producción de virus. Más en particular, se refiere a métodos mejorados para la purificación de partículas de adenovirus a partir de una suspensión celular.

Antecedentes de la invención

- 10 Los recientes avances en el campo de la producción de vacunas han generado la necesidad de una fabricación a gran escala. Son necesarios procesos sólidos y de alto rendimiento para aportar al mundo cantidades suficientes de vacunas (recombinantes) para combatir las enfermedades infecciosas.

- 15 Las vacunas contra enfermedades infecciosas pueden estar basadas en partículas de adenovirus recombinantes. Por este motivo, se han realizado enormes esfuerzos en la optimización de procesos celulares para la producción de adenovirus. Las células se han cultivado a densidades crecientes y, posteriormente, se han infectado para obtener rendimientos víricos totales mayores. Estos procesos de alta densidad celular se describen, por ejemplo, en el documento WO 2010/060719 de Crucell Holland BV y en Yuk y col. (2004). En estos se describe un proceso para la producción de grandes concentraciones de adenovirus recombinantes. Este proceso optimizado depende de la capacidad para infectar cultivos de alta densidad celular (p. ej., superior a 5×10^6 células/ml) con el mantenimiento de una alta productividad de virus por célula. En este documento, se ofrece un método para obtener una solución de virus recogida con alta concentración vírica en un único biorreactor. Los rendimientos de partículas víricas (PV) típicas de dichos procesos son de aproximadamente $1,5\text{-}2,5 \times 10^{12}$ PV/ml.

- 25 Los procesos en los que las células se cultivan a altas densidades son propensos a la acumulación de altas cantidades de restos celulares y ADN de la célula huésped. Estos contaminantes han de ser eliminados durante el proceso de purificación, lo cual es una operación engorrosa. Un método para eliminar el ADN de la célula huésped de un cultivo celular recogido se describió previamente en el documento US 7326555. El método consiste en la precipitación selectiva del ADN de la célula huésped a partir del cultivo celular. Un agente de precipitación selectiva podría unirse específicamente al ADN de la célula huésped y dejar las partículas de adenovirus sin precipitar. Sin embargo, el método de esta referencia se ha descrito solo para cultivos celulares con baja densidad celular, en los que los restos celulares y el ADN de la célula huésped están presentes en pequeñas cantidades.

- 35 Hasta el momento se desconoce si dicho proceso podría aplicarse a un cultivo con alta densidad celular. Por el contrario, a partir de la técnica previa podría deducirse la firme idea de que un agente de precipitación como el que se utiliza en dicho método no podría precipitar de forma selectiva el ADN de la célula huésped del cultivo y podría precipitar las partículas víricas cuando se utiliza a altas concentraciones (Goerke y col. 2004).

- 40 Los cultivos de células que contienen adenovirus recogidos generalmente se procesan adicionalmente para obtener los adenovirus purificados. Normalmente se incluye una etapa de aclaramiento, como filtración en profundidad y/o filtración de flujo tangencial (FFT) en dicho proceso de purificación. El uso de FFT requiere una recogida relativamente limpia, es decir, que contenga cantidades limitadas de restos celulares o de otras impurezas como por ejemplo, ADN de la célula huésped. Un exceso de dichas impurezas podría posiblemente bloquear los filtros. En consecuencia, el aclaramiento mediante FFT se utiliza normalmente más adelante en el proceso de purificación, por ejemplo, como tercer o cuarto paso de dicho proceso de purificación.

- 50 La separación de adenovirus de una suspensión celular que contiene adenovirus directamente tras la recogida, usando filtración de flujo tangencial se ha descrito previamente, por ejemplo, en el documento EP 1371723. Sin embargo, el adenovirus se crecía en células adherentes, que permanecían en el biorreactor tras la recogida. Por tanto, la suspensión que contiene los virus que se procesó adicionalmente contenía concentraciones muy bajas de restos celulares y de ADN de la célula huésped. En el documento WO 2006/052302 también se describe el uso de FFT directamente tras la recogida. Sin embargo, las densidades celulares de los cultivos recogidos que contenían virus usados en este documento eran mucho menores de 5×10^6 células/ml. Como se describe en este documento, el uso de FFT en el paso de aclaramiento directamente tras la recogida no es posible en cultivos celulares que contiene altas densidades de células.

- 60 En el artículo de Biotechnology and Bioengineering, vol. 90, 2005, 645-655 se describe la capacidad de las células PER.C6 para crecer a densidades del orden de 9×10^6 células por ml, la infección de las mismas con adenovirus y la obtención de adenovirus mediante un proceso de lisis con detergente, eliminando a continuación los restos celulares mediante centrifugación. La infección de las células crecidas a la densidad indicada con adenovirus daba lugar a una productividad volumétrica alta de virus, aunque la productividad específica de la célula disminuyó (véase el párrafo puente entre las páginas 652-3).

- 65 Puesto que los procesos de cultivo celular se han escalado y las células se han cultivado a densidades crecientes, existe la necesidad en la industria de procesos en pasos sucesivos que permitan el tratamiento de suspensiones de alta densidad celular. Esto se aplica en particular al campo de la producción de adenovirus.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la purificación de partículas de adenovirus a partir de un lisado celular de una suspensión de alta densidad celular.

5 Los intentos de purificación de adenovirus a partir de una suspensión de alta densidad celular con procesos existentes daban lugar a una recuperación muy baja de virus, como se ilustra en este documento (ejemplo 1). Las concentraciones de impurezas en dicha suspensión de alta densidad celular obtenida tras la recogida fueron generalmente demasiado altas como para permitir una purificación directa del adenovirus. El procesamiento en
10 pasos sucesivos de suspensiones de alta densidad celular usando procesos conocidos podría requerir normalmente una multitud de pasos. Un primer paso de filtración podría consistir en una filtración grosera para eliminar precipitados grandes y restos celulares. Posteriormente, serían necesarios uno o dos pasos más de filtración selectivos para obtener una suspensión de adenovirus suficientemente purificada.

15 Sorprendentemente, los autores han encontrado y descrito en este documento que directamente después de preparar el lisado celular que contiene el adenovirus, el uso consecutivo de la fragmentación y/o precipitación del ADN de las células huésped seguido de un paso de aclaramiento que comprende una filtración de flujo tangencial (FFT) tiene como resultado una suspensión de adenovirus altamente purificada.

20 Sorprendentemente, podría procesarse de forma eficaz el lisado celular que contiene adenovirus, grandes cantidades de restos celulares, ADN de la célula huésped y otras impurezas para purificar el adenovirus con la presente invención. En este documento, la presente invención proporciona un proceso novedoso para eliminar el ADN de la célula huésped en procesos de purificación de adenovirus a gran escala.

25 Con la incorporación de la fragmentación o precipitación del ADN dentro del proceso de purificación, era suficiente un único paso de aclaramiento para purificar el adenovirus a partir de una suspensión de alta densidad celular, usando FFT para el aclaramiento.

La invención es la siguiente:

30 1. Un método para la purificación de partículas de adenovirus a partir de una suspensión celular con una densidad celular que varía de 5×10^6 a 150×10^6 células por ml, comprendiendo dicho método los pasos consecutivos de:

a) lizar las células que contiene dicha suspensión celular;

35 b) precipitar selectivamente el ADN de la célula huésped que contiene dicha suspensión celular añadiendo un agente de precipitación selectiva, en el que el agente de precipitación selectiva se selecciona entre el grupo compuesto por compuestos de amonio cuaternario, copolímeros de amina y mezclas de los mismos; o fragmentar el ADN de la célula huésped dentro de dicha suspensión celular añadiendo una nucleasa;

40 c) someter la suspensión celular obtenida en el paso b) a aclaramiento mediante filtración de flujo tangencial, para obtener una suspensión de adenovirus purificada.

45 2. Un método para purificar partículas de adenovirus de acuerdo con el punto 1 donde dicha precipitación del paso b) se realiza mediante precipitación selectiva del ADN de la célula huésped a partir de las partículas víricas mediante la adición del agente de precipitación selectiva.

50 3. Un método de acuerdo con el punto 2 en el que dicho agente de precipitación selectiva es bromuro de domifeno (BD).

4. Un método de acuerdo con el punto 3 en el que la concentración de bromuro de domifeno (BD) está en el intervalo de 1,2 a 5 mM.

55 5. Un método de acuerdo con el punto 3 en el que la densidad celular está en el intervalo de aproximadamente 10×10^6 a 30×10^6 células por ml y la concentración de bromuro de domifeno (BD) oscila de 1,3 a 2 mM.

6. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-5 en el que dicha filtración de flujo tangencial se realiza con una membrana que tiene un tamaño de poro que oscila de 0,1 a 0,65 μm .

60 7. Un método de acuerdo con uno cualquier de los puntos 1-6 en el que dicha filtración de flujo tangencial se realiza con fibra hueca.

8. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-7 en el que dicha filtración de flujo tangencial se realiza con un sistema de FTA.

65 9. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-8 en el que al menos el 80% del ADN de la célula

huésped se ha eliminado en la suspensión de adenovirus purificada.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1. Recuperación de adenovirus y ADN de la célula huésped precipitado, representado frente a la concentración de bromuro de domifeno en suspensiones de baja ($2,5 \times 10^6$ - $3,5 \times 10^6$ células viales (cv)/ml) y alta (20×10^6 - 30×10^6 cv/ml) densidad celular.

10 Figura 2. Recuperación de adenovirus y ADN de la célula huésped precipitado, representado frente a la concentración de bromuro de domifeno en suspensiones de baja ($2,5 \times 10^6$ - $3,5 \times 10^6$ cv/ml) y alta (18×10^6 - 25×10^6 cv/ml) densidad celular.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a métodos para la purificación de partículas de adenovirus a partir de una suspensión de alta densidad celular. Según la invención, las suspensiones de alta densidad celular se obtienen cultivando las células a altas densidades celulares. Dicho cultivo puede realizarse, por ejemplo, por lotes, por lotes alimentados o en modo perfusión. Los métodos para el cultivo de células a altas densidades celulares son conocidos por los expertos en la materia. Los métodos específicos para la obtención de cultivos de alta densidad celular se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2004/099396, WO 2005/095578, WO 2008/006494 y WO 2010/060719.

20 De acuerdo con la presente invención, una suspensión de alta densidad celular contiene entre 5×10^6 y 150×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 8×10^6 y 120×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 12×10^6 y 100×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 20×10^6 y 80×10^6 células/ml.

30 En una realización preferida de la presente invención, la densidad celular en dicha suspensión de alta densidad celular oscila entre aproximadamente 10×10^6 y 50×10^6 células/ml, por ejemplo al menos aproximadamente 15×10^6 células/ml, por ejemplo al menos aproximadamente 20×10^6 células/ml, por ejemplo al menos aproximadamente 25×10^6 , por ejemplo hasta aproximadamente 30×10^6 células/ml, por ejemplo hasta aproximadamente 35×10^6 células/ml, por ejemplo hasta aproximadamente 40×10^6 células/ml, por ejemplo hasta aproximadamente 45×10^6 células/ml.

35 De acuerdo con la invención, los cultivos de alta densidad celular se infectan con partículas de adenovirus para permitir que dicho adenovirus se propague en la suspensión celular. En este documento se obtienen suspensiones de alta densidad celular que contienen altas concentraciones de adenovirus en un único biorreactor. Los métodos para infectar los cultivos de alta densidad celular también son conocidos por el experto en la materia. Los métodos específicos para obtener dichos cultivos de alta densidad celular con alta concentración de virus se describen por ejemplo, en el documento EP 08168181.9, Cortin y col. 2004 y Yuk y col. 2004. En estas referencias se describen procesos para la producción de grandes cantidades de adenovirus recombinantes. Estos procesos dependen de la capacidad para infectar los cultivos a alta densidad celular con la conservación de una alta productividad de adenovirus por célula. En este documento se ofrece un método para obtener una suspensión de alta densidad celular con altas concentraciones víricas en un único biorreactor. Los rendimientos típicos de los procesos actuales, por ejemplo, para el adenovirus recombinante 35 (rAd35) son de aproximadamente $1,5$ - $2,5 \times 10^{12}$ PV/ml. Una vez que el adenovirus se ha propagado en el cultivo celular, matando a la mayoría de las células, las partículas de adenovirus se purifican, de acuerdo con la presente invención, a partir de la suspensión de alta densidad celular.

50 El método de la presente invención como primer paso incluye la lisis de las células contenidas en la suspensión de alta densidad celular. La lisis de las suspensiones de alta densidad celular, que se infectaron con partículas de adenovirus, produce grandes cantidades de restos celulares y que el ADN de la célula huésped se acumule en la suspensión celular. Estas acumulaciones se traducen en un procesamiento en pasos sucesivos posterior de la engorrosa suspensión celular.

55 La presente invención proporciona un método adecuado para la purificación de partículas de adenovirus a partir del lisado celular de suspensiones de alta densidad celular. Pueden precipitarse selectivamente grandes cantidades de ADN de la célula huésped de entre las partículas de adenovirus que contiene la suspensión de alta densidad celular añadiendo un agente de precipitación selectiva al lisado celular, de modo que se precipite al menos aproximadamente el 80% de las moléculas de ADN de la células huésped de la suspensión de alta densidad celular que contiene las partículas de adenovirus. Como se describe en este documento, el paso de precipitación permite la precipitación del ADN de la célula huésped contaminante, con una reducción de al menos el 80% en el ADN de la célula huésped, preferiblemente del 90% e incluso más preferiblemente, según se ilustra en este documento, aproximadamente una reducción del 95% en el ADN de la célula huésped tras el aclaramiento con FFT.

Lisis

65 El primer paso del proceso incluye la lisis de las células dentro de la suspensión celular. Este primer paso, en el que

se lisan las membranas celulares, permite la recogida tanto de los adenovirus asociados (intracelulares) como los no asociados (extracelulares) a las células a partir de la suspensión de alta densidad celular infectada. La lisis con detergente de la célula huésped, aunque es el método preferido de lisis de las células huésped que contienen virus, puede sustituirse por métodos de lisis no mecánica (como tratamiento enzimático) y/o métodos de cizallamiento mecánico (como la ultrafiltración en fibra hueca) para liberar cantidades máximas de adenovirus. Los expertos en la materia conocen los métodos que pueden usarse para la lisis activa de células y se describen, por ejemplo, en el documento WO 98/22588, págs. 28-35: Los métodos útiles a este respecto son por ejemplo, congelación-descongelación, cizalla sólida, lisis hipertónica y/o hipotónica, cizalla líquida, sonicación, extrusión a alta presión, lisis con detergente, combinaciones de los anteriores y similares. En una realización de la invención, las células se lisan usando al menos un detergente. El uso de un detergente para la lisis tiene la ventaja de que es un método fácil y que puede escalarse fácilmente.

Los detergentes que pueden usarse, y la manera de emplearlos, son conocidos generalmente por los expertos en la materia. Por ejemplo, en el documento WO 98/22588, págs. 29-33 se describen varios ejemplos. Entre los detergentes, según se usan en este documento, pueden incluirse pero sin limitaciones detergentes aniónicos, catiónicos, bipolares y no iónicos. Entre los ejemplos de detergentes se encuentran Triton y/o Polisorbato-80. En una realización, el detergente utilizado es Triton X-100. Además, puede usarse un solvente como TNBP para lisar o aclarar el lisado a baja concentración como complemento a estos detergentes por su capacidad para inactivar virus con envoltura. Además, la autólisis de las células huésped infectadas por el adenovirus en su interior puede proporcionar una liberación importante de los adenovirus intracelulares y puede usarse en los procesos de la invención. Por tanto, puede usarse cualquier forma de lisis de la célula huésped conocida en la técnica para liberar los virus intracelulares al medio de cultivo de la célula huésped para su recogida final mediante los métodos descritos en este documento. Es evidente para el experto en la materia que la concentración óptima del detergente puede variar, por ejemplo, dentro del intervalo de aproximadamente 0,1-1% (p/p).

Fragmentación y precipitación selectiva

Tras la lisis, el ADN de la célula huésped puede fragmentarse o precipitarse a partir de la suspensión celular que contiene el virus.

El ADN de la célula huésped se precipita mediante la adición de un agente de precipitación selectiva (APS). Este paso permite la precipitación selectiva del ADN de la célula huésped mientras que deja las partículas del virus sin modificar en la fase líquida. Según se ilustra en este documento, este paso de precipitación en el estadio inicial da lugar a una reducción de al menos el 90% del ADN de la célula huésped tras el aclaramiento.

Los APS utilizados en la práctica de la presente invención son copolímeros de amina, compuestos de amonio cuaternario y cualquier mezcla respectiva de los mismos. Más específicamente, las numerosas formas de polietileno (PEI) son muy eficaces para la neutralización de un exceso de carga aniónica (impurezas de ADN). En el documento US 7326555 (columna 12, líneas 56-67 y columna 13, líneas 1-28) se proporciona una lista de posibles APS que pueden usarse de forma apropiada en la presente invención. Entre los APS apropiados para su uso en la presente invención se incluyen, pero sin limitaciones, las siguientes clases y ejemplos de productos disponibles en el mercado: sales de monoalquiltrimetilamonio (entre los ejemplos de productos disponibles en el mercado se incluyen bromuro o cloruro de cetiltrimetilamonio como CTAB, bromuro o cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTA), cloruro de alquiltrimetilamonio, cloruro de alquilariltrimetilamonio, bromuro o cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodecildimetil-2-fenoxietilamonio, sal cloruro o bromuro de hexadecilamina, dodecil amina o su sal cloruro y bromuro o cloruro de cetildimetiletilamonio), sales de monoalquildimetilbencilamonio (entre los ejemplos se incluyen cloruros de alquildimetilbencilamonio y cloruro de bencetonio como BTC), sales de dialquildimetilamonio (entre los productos comerciales se incluyen bromuro de domifeno (BD), haluros de didecildimetilamonio, y cloruro o bromuro de octildodecildimetilamonio), sales de amonio heteroaromáticas (entre los productos comerciales se incluye haluros de cetilpiridinio (CPC) o sal bromuro y bromuro o cloruro de hexadecilpiridinio), isómero cis de 1-[3-cloroalil]-3,5,7-triaza-1-azoniadamantano, bromuro de alquil-isoquinolinio y cloruro de alquildimetilnaftil-metil amonio (BTC 1110). Sales de amonio cuaternario polisustituidas (entre los productos disponibles en el mercado se incluyen, pero sin limitaciones sacarinato de alquildimetilbencilamonio y ciclohexilsulfamato de alquildimetiletilbencilamonio), sales de amino bis-cuaternario (entre los ejemplos de productos se incluyen el cloruro de 1,10-bis(2-metil-4-aminoquinolinio)-decano, cloruro de 1,6-bis {1-metil-3-(2,2,6-trimetil ciclohexil)-propildimetilamonio} hexano o cloruro de triclobisonio y el bis-cuaternario denominado CDQ de Buckman Brochures) y sales de amonio cuaternario poliméricas (incluyendo poliiones como dicloruro de poli[oxietilendimetiliminio]etilen(dimetiliminio)etileno, cloruro de alfa-4-[1-tris(2-hidroxi)etil]amonio). Como el experto entenderá a partir del documento US 7326555, en el que se mostraba cómo funcionan algunos de estos compuestos y en el que los profesionales puede encontrar de forma rutinaria las concentraciones apropiadas para que estos compuestos precipiten el ADN de forma selectiva, estos son ejemplos de APS y en base a la descripción de dichos documentos y a la descripción de la actual invención, está claro que estos también pueden ser adecuados para la presente invención.

En una realización preferida, se usan detergentes catiónicos en la presente invención. En una realización incluso más preferida, se usan sales de dialquildimetilamonio como bromuro de domifeno (BD) en la presente invención.

Aunque pueden usarse un gran número de posibles APS en la práctica de la presente invención, el bromuro de domifeno es de especial interés debido principalmente a su disponibilidad como materia prima de grado BPF (buena práctica de fabricación) y el uso actual en otros productos de uso humano. Más específicamente, puesto que el bromuro de domifeno se utiliza ampliamente como principio activo en los productos de higiene bucal, así como en cremas antibióticas tópicas, esta molécula se produce en grandes cantidades y se comercializa según las condiciones de BPF.

La concentración óptima de APS que se usa en suspensiones de alta densidad celular para precipitar el ADN de la célula huésped de la suspensión celular se determina en este documento. Aunque se previó que, en base a la técnica previa, las partículas de adenovirus precipitarían inmediatamente al ponerse en contacto con altas concentraciones de APS, de forma inesperada, las partículas de adenovirus permanecían sin precipitar. De hecho, se mostró en la técnica previa, por ejemplo en el documento US 7326555, que en suspensiones de baja densidad celular (hasta 1×10^6 células/ml), las partículas de adenovirus precipitan cuando se aumenta la concentración de detergente catiónico.

La suspensión producida mediante la lisis de cultivos de alta densidad celular como se describe en este documento contiene, en gran medida, cantidades mayores de ADN de la célula huésped y de otras impurezas y, por tanto serán necesarias cantidades mayores de detergente catiónico (p. ej., aumento en un factor de 2). Por tanto, se previó que, en base a la extrapolación de los resultados a baja densidad celular, este aumento en la concentración de detergente catiónico podría inducir la precipitación de la totalidad de las partículas de adenovirus presentes en la suspensión.

Sin embargo, sorprendentemente, a concentraciones altas de APS, la eliminación selectiva del ADN de la célula huésped contaminante a partir de una suspensión de alta densidad celular que contenía partículas víricas seguía siendo posible. En una realización preferida de la presente invención, el APS, preferiblemente BD, se añade a una concentración que oscila entre 1,2 y 5 mM. En una realización incluso más preferida el APS, preferiblemente BD, se añade a una concentración que oscila entre 1,3 y 2,2 mM, por ejemplo, 1,4 y 2 mM, por ejemplo, 1,4 y 1,8 mM, por ejemplo, 1,5 y 1,6 mM. En función de la presente descripción, está claro que el experto en la materia sabe cómo determinar el margen de concentración de APS apropiado para una determinada densidad celular en el producto recogido.

La concentración apropiada de BD para tratar una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus que comprende una densidad celular que oscila entre 10×10^6 y 150×10^6 células/ml oscila entre aproximadamente 1,2 mM y 5 mM. La concentración apropiada de BD para tratar una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus que comprende una densidad celular que oscila entre 10×10^6 y 50×10^6 células/ml oscila entre aproximadamente 1,3 mM y 2,2 mM. La concentración apropiada de BD para tratar una suspensión de alta densidad celular recogida que contiene adenovirus que comprende una densidad celular que oscila entre 10×10^6 y 30×10^6 células/ml oscila entre aproximadamente 1,3 y 2 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 1,4 y 1,9 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 1,4, y 1,8 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 1,4 y 1,7 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 1,45 y 1,65 mM, por ejemplo, aproximadamente 1,5-1,55 mM.

Estará dentro de la competencia del experto en la materia probar posibles sustitutos de los APS descritos en este documento para identificar un compuesto que precipite de forma eficaz moléculas de ácido nucleico y otros restos celulares de entre las partículas de adenovirus según se ilustra en este documento para el bromuro de domifeno (BD). La presente invención se refiere en parte a métodos de purificación de partículas de adenovirus a partir de una suspensión de alta densidad celular mediante precipitación selectiva de las moléculas de ácido nucleico de la célula huésped de entre las partículas de adenovirus que contiene la suspensión de alta densidad celular tras la lisis añadiendo un agente de precipitación selectiva al medio de cultivo de la célula huésped tras la lisis.

Aunque el método preferido para eliminar el ADN de la célula huésped a partir de la suspensión celular es la precipitación selectiva, la invención no se limita a este.

En una realización, el ADN de la célula huésped se fragmenta, es decir, se corta en trozos. De acuerdo con la presente invención, la fragmentación del ADN de la célula huésped tras la lisis se realiza añadiendo una nucleasa a la suspensión celular. Entre los ejemplos de nucleasas adecuadas para su uso en la presente invención se incluyen Benzonase[®], Pulmozyme[®] o cualquier otra ADNasa y/o ARNasa utilizada normalmente en la técnica. En realizaciones preferidas de la invención, la nucleasa es Benzonase[®], que hidroliza rápidamente los ácidos nucleicos hidrolizando los enlaces fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos reduciendo de este modo la viscosidad del lisado celular. Benzonase[®] puede obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Merck KGaA (código W214950).

La concentración de nucleasa que es necesaria para la fragmentación adecuada depende, por ejemplo, de la densidad de células del huésped, la temperatura y el tiempo de reacción. El experto en la materia conoce como determinar y optimizar la concentración de nucleasas necesaria para una fragmentación útil del ADN de la célula huésped.

Aclareamiento

El lisado tratado con APS o nucleasa obtenido a partir de los pasos previos se aclara posteriormente para eliminar el ADN de la célula huésped precipitado, los restos celulares y otras impurezas.

5 Los intentos para purificar directamente adenovirus a partir de una suspensión de alta densidad celular con un proceso de aclareamiento en un paso daban lugar a una recuperación baja de virus, como se ilustra en este documento (ejemplo 1). Las concentraciones de impurezas en dicha suspensión de alta densidad celular obtenida tras la recogida fueron generalmente demasiado altas como para permitir una purificación directa del virus.
10 Normalmente, las combinaciones de al menos dos filtros consecutivos, como se utiliza a menudo y se recomienda en la técnica, y como se ilustra en este documento, son necesarias para un aclareamiento apropiado.

Los autores han encontrado sorprendentemente y han descrito en este documento que la combinación de la precipitación del ADN con un paso de aclareamiento usando FFT permite la purificación del virus a partir de una
15 suspensión de alta densidad celular con alta recuperación. Un único paso de filtración de flujo tangencial era suficiente para eliminar los restos celulares y los precipitados de ácido nucleico de la suspensión que contiene el virus. El ADN de la célula huésped se precipitaba en más del 95% y la recuperación del virus era superior al 80%. Por tanto, según la presente invención, es posible utilizar FFT como único paso de aclareamiento. La suspensión que contiene el virus aclarada obtenida con el método de la presente invención está sustancialmente reducida en ADN
20 de las células huésped y de otras impurezas en comparación con el lisado original (obtenida en el paso a) del presente método.

Según la presente invención, los filtros utilizados en una configuración de FFT son, por ejemplo, filtros de fibra hueca de GE Healthcare o separaciones JM; otras alternativas son filtros de pantalla plana de Millipore o Sartorius stedim
25 biotech. En dicha configuración de FFT, las partículas de virus se recogen en el permeado mientras que los restos celulares, el ADN de la célula huésped precipitado y otras impurezas permanecen en el material retenido. En este documento se mostró que los filtros de fibra hueca eran muy apropiados para procesar suspensiones de alta densidad celular. Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, el FFT se realiza con un filtro de fibra hueca.
30

Según la presente invención, el tamaño del poro de dichos filtros preferiblemente oscila de 0,1 a 1 μm . En una realización preferida de la presente invención, el tamaño del poro oscila de 0,2 a 0,65 μm . Dichos tamaños de poro permiten que las partículas víricas pasen a través de la membrana y que los restos celulares, el ADN de la célula huésped precipitado y otras impurezas queden retenidos por el filtro. Preferiblemente, los módulos del filtro se humedecen previamente con agua siguiendo las instrucciones del fabricante. El líquido se hace recircular a lo largo
35 de los módulos usando tubos y una bomba peristáltica.

En determinadas realizaciones de la presente invención se usa FFT en forma de filtración tangencial alterna (FTA). La FTA es una forma de filtración de flujo tangencial y, en este documento, se encontró que el aclareamiento usando
40 FTA era especialmente adecuado para la recuperación de virus de las suspensiones con altas concentraciones de restos celulares, ADN de la célula huésped y otras impurezas. El flujo tangencial puede conseguirse según los métodos conocidos para el experto en la materia y como se describe, por ejemplo, en el documento US 6.544.424. La ventaja de utilizar un sistema de FTA (p. ej., ATF System, Refine Technology, Co., East Hanover, NJ) es que los flujos de alimentación y retención cambian de dirección con cada ciclo de bombeo de FTA (el ciclo consiste en presurización y modo exhausto). Esto genera una acción de barrido de flujo inverso y un cambio continuo de la presión transmembrana (PTM) a través de la membrana. Durante el escape se crea el vacío durante el cual determinado material es devuelto mediante flujo del lado permeado al lado retenido, lo que da lugar a la limpieza de la membrana. El uso del FTA dará lugar a una menor contaminación de la membrana lo que tiene como resultado un rendimiento de recuperación de virus mayor. Los expertos en la materia pueden determinar el FTA óptimo y los
50 caudales permeados para un máximo rendimiento.

De acuerdo con la presente invención, los filtros utilizados en dicho sistema de FTA son, por ejemplo filtros de fibra hueca de GE healthcare.

55 Una ventaja adicional del uso de un sistema de FTA es que la configuración que se usa para el aclareamiento puede usarse con antelación para el cultivo de células en modo perfusión. De hecho, puede usarse un biorreactor conectado a un sistema de FTA en el primer lugar para cultivar células a altas densidades celulares. Pueden obtenerse densidades celulares muy altas de más de 100×10^6 células viables/ml con el uso de un sistema de perfusión FTA, por ejemplo, con células PER.C6 (véase p. ej., Yallop y col., 2005 y el documento WO 2005/095578). Una vez que las células hayan alcanzado una alta densidad celular, pueden infectarse para obtener una suspensión celular que contenga virus muy concentrada. El sistema de FTA que permanece conectado al biorreactor durante todo el proceso podría utilizarse posteriormente para purificar los virus a partir de dicha suspensión con alta densidad celular.
60

65 La combinación de precipitación selectiva con aclareamiento mediante FFT elimina al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80% e incluso más preferiblemente al menos el 90% del ADN de la célula huésped contenido en el

lisado de alta densidad celular obtenido tras la recogida.

Métodos de purificación adicional

5 En determinadas realizaciones, las partículas de virus recogidas se purifican adicionalmente. Una purificación adicional del virus puede realizarse en varios pasos que comprenden la concentración, ultrafiltración, diafiltración o separación con cromatografía como se describe por ejemplo en el documento WO 2005080556. También pueden usarse otros pasos como cromatografía en membrana de intercambio aniónico, filtración estéril, adsorción en fase inversa o cromatografía en hidroxapatita. Estos pasos se describen, por ejemplo, en el documento US 7326555, incorporado a este documento en su totalidad por referencia. El experto en la materia sabe cómo encontrar las condiciones óptimas para cada paso de purificación. También en el documento WO 98/22588 se describen métodos para la producción y purificación de partículas víricas.

15 En determinadas realizaciones de acuerdo con la invención, la suspensión de partículas de adenovirus aclarada puede tratarse mediante ultrafiltración. Se utiliza ultrafiltración para concentrar la suspensión de virus. La suspensión puede concentrarse de 5 a 20 veces y, posiblemente, tratarse con nucleasa. Otro aspecto de la invención es la posterior introducción de un tampón de intercambio a través de diafiltración. La diafiltración, o intercambio de tampón, usando ultrafiltros, es una forma de eliminar e intercambiar sales, azúcares y similares. El experto en la materia sabe en qué condiciones debería llevarse a cabo el intercambio de tampón y qué tampones son los apropiados para este paso.

25 La membrana de ultrafiltración en particular seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño como para retener las partículas de adenovirus aunque suficientemente grande como para limpiar las impurezas de forma eficaz. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, pueden ser apropiados valores de corte nominales de peso molecular entre 10 y 1.000 kDa. Se prefiere la ultrafiltración usando el modo de flujo tangencial. En dicho modo, el paso puede controlarse estableciendo un flujo fijo con o sin contrapresión sobre el retorno del material retenido, estableciendo una presión de transmembrana fija o fijando tanto el flujo cruzado como el flujo permeado.

30 De acuerdo con la invención, el siguiente paso puede ser un paso de cromatografía de intercambio aniónico. Durante dicho paso las partículas de adenovirus se unen a un material cargado positivamente, por ejemplo, una membrana, cartucho o columna. La posterior elución permite separar las partículas de virus de las impurezas y del resto del ADN de la célula huésped.

35 Para la purificación de adenovirus con un absorbente de membrana Mustang Q, la concentración de NaCl para la carga y lavado podría ser presumiblemente cualquiera entre 0,3 y 0,4 M a pH 7,5 y podría cambiarse a un pH alternativo. Más preferiblemente, la concentración de NaCl es de 0,35 M. Es necesario que el pH de los tampones sea suficientemente alto para que los adenovirus se unan (mayor de aproximadamente 6,5). Además, el pH del sistema tampón debería ser también suficientemente bajo como para evitar la inestabilidad del virus. El pH máximo preciso que es útil dependerá del perfil de estabilidad específico del adenovirus y de los componentes del tampón y el experto en la materia puede determinarlo fácilmente para esa aplicación en particular. Con guía y ciertamente no de forma limitante, el pH podría potencialmente oscilar entre aproximadamente 5-10.

45 La presencia de PS-80 al 0,1% en los tampones es altamente preferida para conseguir niveles bajos de ADN residual en el producto debido a que este atenúa la asociación adenovirus/ADN y la agregación de los adenovirus. Estará dentro del ámbito de la experimentación rutinaria para el experto en la materia establecer las concentraciones de detergente más altas o más bajas o detergentes alternativos que podrían ser útiles para promover la disociación de partículas de adenovirus de otros adenovirus, así como de diversos contaminantes celulares. También está dentro de este mismo alcance de experimentación que el experto en la materia puede elegir un detergente alternativo al tampón del proceso. Ejemplos de estos detergentes alternativos pueden encontrarse en el documento US 7326555. Están disponibles productos de cromatografía de membrana de intercambio aniónico como los producidos por Pall (p. ej., series MustangTM) y Sartorius (p. ej., series Sartobind) para la purificación según la presente invención. La patente de EE.UU. 6.485.958 o el documento WO 05/080556 describen el uso de cromatografía de intercambio aniónico para la purificación del adenovirus recombinante.

55 La capacidad de unión del virus a un absorbente de membrana como Mustang Q (Pall Corporation) es extremadamente alto y en el orden de 7×10^{13} PV/ml. Entre otros absorbente de membrana y resinas que son adecuados para la purificación de adenovirus en este proceso se incluyen, pero sin limitaciones, Source 15Q y Source 30Q (GE life sciences), Q-Sepharose XL (GE life sciences), Fractogel TMAE (industrias EM), Sartobind Q (Sartorius), Adsept Q (Natrix separations), CIM QA (BIA separations). La elución del adenovirus podría realizarse preferiblemente usando un tampón que contenga NaCl. El experto sabe cómo optimizar la concentración de NaCl.

65 En determinadas realizaciones, se prefiere usar al menos un paso de cromatografía de intercambio aniónico. Tras el paso de cromatografía de intercambio aniónico, el adenovirus puede estar suficientemente puro. En determinadas realizaciones, sin embargo, se realiza además un paso de cromatografía de exclusión molecular para aumentar la solidez del proceso. Este paso puede ser previo o posterior al paso de cromatografía de intercambio aniónico. Obviamente, también pueden combinarse adecuadamente otros pasos de purificación con un paso de cromatografía

de intercambio aniónico. El uso de cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de adenovirus se ha descrito extensamente y este aspecto esta, por tanto, bien dentro del alcance del experto en la materia. Se han empleado muchas matrices de cromatografía diferentes para la purificación de adenovirus y son adecuadas, y el experto en la materia puede encontrar fácilmente el material de intercambio aniónico óptimo para la purificación de adenovirus.

En cualquier realización particular de la presente invención, el producto de intercambio aniónico puede diafiltrarse en un tampón y esterilizarse por filtración. Alternativamente, puede añadirse un paso de cromatografía adicional (p. ej., intercambio catiónico) antes o después de la diafiltración con la posibilidad de mejorar la solidez del aclaramiento de la impureza y/o el virus/prión.

Un paso de ultrafiltración adicional podría ser posible también en esta etapa. La ultrafiltración de flujo tangencial es útil para eliminar la proteína y el ácido nucleico residual y para el intercambio del adenovirus en un tampón. La elección entre membranas de 300 kDa y 500 kDa viene dictada por los equilibrios entre el rendimiento y la mejora del aclaramiento de las impurezas. Otras configuraciones de membrana (como la fibra hueca) son sustitutos aceptables. La membrana de ultrafiltración seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño como para retener las partículas de adenovirus aunque suficientemente grande como para limpiar las impurezas de forma eficaz. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, pueden ser apropiados valores de corte nominales de peso molecular de entre 100 y 1.000 kDa.

Puede incluirse en el proceso un paso de filtración estéril, el cual es útil para eliminar la carga biológica. El producto puede filtrarse a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) modificada de 0,22 micras (p. ej., Millipore, Millipak).

Pueden añadirse al proceso pasos opcionales de procesamiento en pasos sucesivos. Estos podrían ser, por ejemplo, un paso de cromatografía de exclusión molecular, un paso de adsorción en fase inversa y/o un paso de cromatografía en hidroxapatita. Pueden encontrarse más detalles sobre cada uno de estos pasos en, por ejemplo, los documentos US 7326555, WO 03/097797 y WO 02/44348.

En la solicitud internacional WO 97/08298 se describe la purificación de adenovirus usando determinadas matrices cromatográficas para prevenir el daño a los virus, incluyendo pasos de intercambio aniónico y de exclusión molecular.

También son muy adecuados para la purificación de adenovirus determinados métodos de ultrafiltración, como los descritos en WO 2006/108707. Estos pasos pueden realizarse además o en lugar de determinados pasos de purificación cromatográfica.

Escala de sistemas de cultivo celular y sistemas de procesamiento en pasos sucesivos

Los procesos de la presente invención son escalables. Los cultivos celulares utilizados en la presente invención oscilan de cultivos a pequeña escala (p. ej., series de 1-10 litros) a cultivos a media escala (p. ej., series de 20-1.000 l) hasta preparaciones a gran escala comercial, como series de producción de 1.000 a 50.000 l. Los pasos del proceso inicial (lisis, filtración en profundidad y ultrafiltración) se escalan con el volumen de cultivo mientras que la cromatografía de intercambio aniónico y las etapas posteriores se escalan con la introducción de partículas de adenovirus. Por tanto, el tamaño de los pasos posteriores se basará en una productividad del biorreactor estimada en al menos 1×10^{12} partículas de adenovirus por ml (pv/ml). Estos altos rendimientos de adenovirus pueden obtenerse, por ejemplo, infectado cultivos de alta densidad celular (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 08168181.9). La purificación adicional de estas suspensiones de alta densidad celular que contenía altas concentraciones de partículas de adenovirus se hace posible con la presente invención. La posibilidad de procesar estas suspensiones, que contienen altas cantidades de restos celulares y el ADN de la célula huésped permite la purificación de altas cantidades de partículas de adenovirus por volumen de suspensión. El mérito de esta invención es proporcionar un método para procesar los lotes de cultivo celular con altas densidades celulares, que contenían altas concentraciones de partícula de adenovirus y permitiendo, de este modo, rendimientos muy altos de virus por volumen procesado. El método actual, aunque se puede aplicar a cultivos celulares a gran escala, permitirá que las células se cultiven a menor escala, aún a densidades celulares más alta, y seguir alcanzando altos rendimientos de adenovirus que pueden procesarse adicionalmente de forma eficaz. Este método ofrece la posibilidad de procesar lotes de adenovirus altamente concentrados que tendrán un gran impacto sobre la industria completa de purificación de adenovirus.

Adenovirus y células productoras

La invención se refiere a la purificación de adenovirus. Un adenovirus según esta invención puede ser cualquier adenovirus nativo, modificado, mutado y/o vector adenovírico recombinante. Es de interés específico en la vacunación con ADN y/o aplicaciones de terapia génica el uso de adenovirus incompetentes para la replicación de 1ª y 2ª generación, inhabilitado mediante E1 o delecciones adicionales incluyendo vectores de adenovirus «cobardes». El genoma del adenovirus se asocia generalmente con patologías benignas en humanos. El genoma es sensible a la

manipulación, dependiente de la estrategia utilizada para construir el vector respectivo. Un virus incompetente para la replicación, como un vector de adenovirus recombinante 35 (rAd35) o 26 (rAd26) (como se ilustra en este documento) requiere una línea celular productora que complemente las deleciones.

5 Una célula productora (también denominada en ocasiones en la técnica y en este documento una «célula empaquetadora», «célula complementaria» o «célula huésped») puede ser cualquier célula productora en la que puede propagarse un adenovirus deseado. Por ejemplo, la propagación de vectores de adenovirus recombinante se realiza en células productoras que complementa las deficiencias en los adenovirus. Estas células productoras tienen en su genoma al menos una secuencia E1 de adenovirus y, por tanto, son capaces de complementar a los
10 adenovirus recombinantes con una deleción en la región E1. Además el adenovirus puede presentar una deleción en la región E3, que es prescindible para el genoma del Ad y, por tanto, no es necesario complementar esta deleción. Puede usarse cualquier célula productora que complemente E1, como células de retina humana inmortalizadas por E1, por ejemplo, células 911 o PER.C6 (véase la patente de EE.UU. 5.994.128), amniocitos transformados con E1 (véase la patente EP 1230354), células A549 transformadas con E1 (véase, por ejemplo, el documento WO 98/39411, patente de EE.UU. 5.891.690), GH329:HeLa (Gao y col., 2000, Human Gene Therapy 11: 213-219), 293 y similares. En determinadas realizaciones, las células productoras son, por ejemplo, células HEK293, o células PER.C6, células 911 o células IT293SF y similares. Preferiblemente se usan células PER.C6 (N.º de depósito de ECACC 96022940, depositada el 29 de febrero de 1996 en la ECACC, CAMR, Portan Down, Salisbury SP4 0JG, Reino Unido; véase la patente de EE.UU. 5.994.128) y células derivadas de las mismas.

20 El vector adenovírico de replicación deficiente puede generarse usando cualquier especie, cepa, subtipo o mezcla de especies, cepas o subtipos de un adenovirus o un adenovirus quimérico como la fuente del ADN del vector (véanse, por ejemplo, los documentos WO 96/26281 y WO 00/03029), que por ejemplo, puede proporcionar al vector adenovírico la capacidad para infectar determinados tipos celulares deseados. En una realización preferida de la presente invención se usan rAd35 o rAd26 como adenovirus.

El experto en la materia será consciente de las posibilidades para propagar los vectores de adenovirus de diferentes serotipos en células huésped específicas, usando métodos como los que se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 6.492.169 o en el documento WO 03/104467 y las referencias en estas. Por ejemplo, para la propagación de rAd35 deficiente en E1, pueden construirse células productoras específicas que expresen E1B-55K de Ad35, por ejemplo, en función de las células productoras existentes que expresan E1A y E1B de Ad5, como las células PER.C9 o HEK293 (véase, por ejemplo, el documento US 6.492.169) como sabe el experto. Alternativa y preferiblemente, pueden usarse las líneas celulares complementarias (Ad5-) existentes, como PER.C6 o HEK203, sin modificación de las células para la propagación de rAd35 o rAd26 deficiente en E1, incluyendo la secuencia que codifica E4-orf6 de Ad5 en el vector rAd35 o rAd26, como se describe ampliamente, por ejemplo, en el documento WO 03/104467. Por tanto, la propagación de los vectores adenovíricos de cualquier serotipo puede realizarse en células productoras usando medios y métodos bien conocidos por el experto en la materia. Los vectores adenovíricos, los métodos para su construcción y los métodos para su propagación son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.559.099, 5.837.511, 5.846.782, 5.851.806, 5.994.106, 5.994.128, 5.965.541, 5.981.225, 6.040.174, 6.020.191 y 6.113.913, y Thomas Shenk, «Adenoviridae and their Replication», M. S. Horwitz, «Adenoviruses», capítulos 67 y 68, respectivamente, en Virology, B. N. Fields y col., eds., 3ª ed., Raven Press, Ltd., Nueva York (1996) y otras referencias mencionadas en este documento.

La invención se explica además en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no limitan en modo alguno la invención.

Estos simplemente sirven para aclarar la invención.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: El aclaramiento directo con FFT no sirve para recogidas de alta densidad celular

Las células PER.C6 se cultivaron en un biorreactor a 37°C y se infectaron con Ad35 en un medio de cultivo sin suero durante 3 días. Las células se recogieron a una densidad celular de entre 20 y 30x10⁶ células/ml y valores de virus de 1 a 1,5x10¹² PV/ml. Los virus se liberaban de las células tras la adición de los detergentes no iónicos Triton X-100 y Tween-80 a concentraciones finales del 0,1 y 0,05%, respectivamente. El tiempo de lisis estaba entre 2 y 24 horas.

Tras la lisis, el producto recogido que contenía los virus se aclaró mediante filtración de flujo tangencial (FFT).

El aclaramiento se realizó usando un filtro de fibra hueca de 0,2µm (GE Healthcare, modelo CFP-2-E-4MA, 0,042 m²) o de 0,65 µm (GE Healthcare, modelo CFP-6-D-4MA, 0,046 m²). Un litro del producto recogido lisado se concentró al menos por un factor de 3. Tras el aclaramiento se realizó un lavado usando tres veces el volumen retenido, en un proceso de drenaje y alimentación. Los experimentos de filtración se realizaron con un flujo de permeado que oscilaba entre 15 y 40 LMH. El virus recuperado durante el paso de aclaramiento se determinó en la tabla siguiente.

65

Tabla 1

Exp.	Parámetros del proceso				Parámetros de rendimiento			
N.º	Tamaño de poro (µm)	Densidad celular (x10 ⁶ células/ml)	Valor de virus (x10 ¹¹ PV/ml)	ADN-CH precipitado (%)	ADN-CH (ng/1x10 ¹¹ pv)	Recuperación de virus ppt (%)	Recuperación de virus en aclaramiento (%)	Recuperación total de virus (%)
1	0,2	29,2	11,4	no realizado	no realizado	no realizado	0	0
2	0,65	20,1	15	no realizado	no realizado	no realizado	0	0

5 No se produjo recuperación de virus tras el aclaramiento. Esto fue, en cierto modo, inesperado ya que, por ejemplo en los documentos EP 1371723 y WO 2006/052302 se describía el uso de FFT para el aclaramiento con éxito de producto recogido con adenovirus. Aparentemente, las altas densidades celulares del proceso actual impedía que este paso funcionara y hacía que el FFP no fuera adecuado para un aclaramiento directo.

10 Ejemplo 2: Precipitación selectiva del ADN de la célula huésped en suspensiones de alta densidad celular

10 La precipitación selectiva del ADN de la célula huésped se demostró en la técnica previa (Goerke y col. (2005), documento US 7326555) para densidades celulares superiores a 1×10^6 células/ml. Se ha demostrado en este documento que (a bajas densidades celulares) al menos el 80% del ADN de la célula huésped se precipitaba de la suspensión celular con una recuperación del 90% de las partículas víricas. Sin embargo, hasta el momento se desconoce completamente si dicha precipitación selectiva podría ser posible a una alta densidad celular, ya que estas suspensiones celulares podrían contener cantidades mucho mayores de ADN de la célula huésped y de restos celulares y, por tanto, cabría esperar que fueran necesarias cantidades mucho mayores de agente de precipitación de ADN, mientras que la extrapolación de los datos a partir de la técnica previa sugeriría que estas concentraciones más altas de agente de precipitación de ADN también podrían precipitar el adenovirus.

20 Para indagar en la posibilidad de la precipitación del ADN a altas densidades celulares, se analizó la precipitación del ADN de la célula huésped en tubos de ensayo a pequeña escala que contenían densidades celulares de hasta 30×10^6 células/ml. El modelo de tubo de ensayo a pequeña escala se usó como herramienta rápida de cribado para comprobar si se seguía produciendo precipitación selectiva de ADN a altas densidades celulares.

25 Las células PER.C6 se cultivaron en un biorreactor y se infectaron con adenovirus 35 (Ad35) y se cultivaron a 37°C en medio de cultivo sin suero durante 3 días. Las células se recogieron a una densidad celular de entre 2 y 30×10^6 células/ml y valores de virus que oscilaban de 8×10^{10} a $1,5 \times 10^{12}$ PV/ml. La lisis celular se realizó durante un periodo de tiempo de 2 a 24 horas (h) añadiendo los detergentes no iónicos Triton X-100 y Tween-80 a concentraciones finales del 0,1% y el 0,05%, respectivamente. Se añadieron concentraciones crecientes de bromuro de domifeno (BD) en NaCl 40 mM a 3,5 ml de producto recogido lisado, seguido de agitación inmediata durante 1 minuto. El material precipitado se eliminó con filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en jeringa de 0,45 µm. En los filtrados se analizaron las concentraciones de Ad35 y de ADN de la célula huésped usando HPLC-AEX y ensayo de Q-PCR, respectivamente.

35 En la figura 1 se muestra la recuperación del virus y el ADN de la célula huésped precipitado frente a la concentración de bromuro de domifeno. Las curvas representadas por triángulos se obtuvieron a partir de productos recogidos de los cultivos celulares con densidades celulares que oscilaban entre $2,5 \times 10^6$ y $3,5 \times 10^6$ células/ml. Las curvas representadas por círculos se obtuvieron a partir de productos recogidos de los cultivos celulares con densidades celulares que oscilaban entre 20×10^6 y 30×10^6 células/ml. En las gráficas se destaca la C* (concentración de bromuro de domifeno que muestra una recuperación vírica del 90%) a altas y bajas densidades celulares y el porcentaje relativo de ADN de la célula huésped precipitado.

45 La concentración de BD necesaria para precipitar más del 90% del ADN de la célula huésped a densidades celulares entre 20×10^6 y 30×10^6 células/ml aumenta en un factor de al menos 2,5 veces en comparación con la concentración de BD necesaria a densidades celulares 10 veces menores. Sorprendentemente, el aumento de la concentración de BD no precipitaba las partículas víricas, como podría esperarse de la extrapolación de las curvas obtenidas a menor densidad celular.

50 El experimento se repitió con productos recogidos de cultivos celulares con densidades celulares que oscilaban entre 18×10^6 y 25×10^6 células/ml. En la figura 2 se muestra la recuperación vírica y el ADN de la célula huésped precipitado, representados frente a la concentración de bromuro de domifeno. Las curvas representadas por triángulos se obtuvieron a partir de productos recogidos de los cultivos celulares con densidades celulares que oscilaban entre $2,5 \times 10^6$ y $3,5 \times 10^6$ células/ml. Las curvas representadas por círculos se obtuvieron a partir de productos recogidos de los cultivos celulares con densidades celulares que oscilaban entre 18×10^6 y 25×10^6 células/ml. En las gráficas se destaca la C* (concentración de bromuro de domifeno que proporciona una

recuperación vírica del 90%) a altas y bajas densidades celulares y el porcentaje relativo de ADN de la célula huésped precipitado.

5 Como puede deducirse de las gráficas de las figuras 1 y 2, la concentración de BD que proporciona una recuperación vírica del 90% (C^*) para suspensiones de alta densidad celular puede diferir ligeramente entre experimentos individuales y esto forma parte de la variación normal. Sin embargo, las gráficas demuestran de manera consistente que es posible una precipitación selectiva del ADN también a altas densidades celulares y que la concentración adecuada de APS (en este caso BD) es significativamente mayor que para los cultivos con baja densidad celular, aunque mucho más baja de lo esperado en base a la extrapolación. Por tanto, el experto en la materia reconocerá que existe un intervalo en lugar de un punto fijo de concentraciones adecuadas para el agente de precipitación selectiva y en base a la descripción de este documento puede encontrarse el intervalo adecuado. Por ejemplo, las concentraciones adecuadas de BD para tratar la suspensión recogida de alta densidad celular que contiene adenovirus que comprende una densidad celular que oscila entre aproximadamente 10×10^6 y 30×10^6 células/ml están entre aproximadamente 1,3 y 2 mM.

15 Basado en estos resultados, el experto en la materia será consciente ahora de que la precipitación con ADN puede extrapolarse a suspensiones que contiene adenovirus con concentraciones celulares incluso mayores, por ejemplo, de aproximadamente 40×10^6 células/ml, por ejemplo, de aproximadamente 50×10^6 células/ml, por ejemplo, de hasta aproximadamente 100×10^6 células/ml, por ejemplo, de hasta aproximadamente 150×10^6 células/ml y que pueden purificarse los adenovirus de dichas suspensiones de alta densidad celular con el proceso de la presente invención.

Por tanto, es posible de acuerdo con la presente invención utilizar la precipitación selectiva de ADN en la purificación de partículas de adenovirus de suspensiones de alta densidad celular.

25 Ejemplo 3: Precipitación selectiva del ADN de la célula huésped en suspensiones de alta densidad celular a gran escala

La precipitación de ADN se probó a escalas que oscilaban entre 0,5 l y 20 l. Las concentraciones de BD utilizadas para la precipitación del ADN se basaron en los resultados experimentales previos (fig. 2). Se usó aproximadamente el 80% de la concentración C^* según se determinó en el modelo en tubo de ensayo a pequeña escala.

35 En el modo de perfusión, la perfusión que se realizó con un sistema de FTA se inició 4 días después de la inoculación a una densidad celular de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células totales/ml. Después de 14 días de perfusión, la suspensión celular se diluyó con medio sin suero recién preparado en el biorreactor hasta una densidad celular de aproximadamente 13×10^6 células/ml. Posteriormente, el biorreactor se infectó con el virus Ad35. El sistema de FTA se puso en marcha 5 horas después de la infección a una velocidad de recambio de medio de 2 volúmenes del recipiente al día. A los 3 días (postinfección) se recogieron las células. La densidad celular en el producto recogido (DCPR) se proporciona en la tabla 2.

40 Tras la recogida, las células se lisaron durante un periodo de 2 a 24 horas añadiendo los detergentes no iónicos Triton X-100 y Tween-80 a concentraciones final del 0,1% y el 0,05%, respectivamente. Se añadió bromuro de domifeno al producto recogido lisado a concentraciones finales de 0,72 y 1,52 mM en NaCl 40 mM. El lisado precipitado se aclaró usando dos filtros en profundidad cargados consecutivos con diferentes tamaños de poro. Los tamaños de poro estimados de ambos filtros oscilaban entre $\sim 10 \sim 5 \mu\text{m}$ (Millistak + CE20) y $\sim 1 \sim 0,2 \mu\text{m}$ (Cuno Zeta plus 50CP), respectivamente. El primer filtro se usó para eliminar los restos celulares e impurezas grandes. Después de dicha filtración previa, el segundo filtró se usó para eliminar el resto de las impurezas y el ADN precipitado a partir de la suspensión que contenía los virus. El aclaramiento se realizó a un flujo constante de 100 LMH (litros por metro cuadrado y hora) hasta que la presión alcanzó 34,48 kPas.

50 En la tabla 2 se muestran los parámetros del proceso y los resultados del proceso de purificación. La lisis, la precipitación del ADN (ppt ADN) y el aclaramiento se realizaron usando 8 productos recogidos diferentes que diferían en el volumen, densidad celular en el producto recogido (DCPR) y valor de virus. Los productos recogidos se obtuvieron a partir de biorreactores de 2 l o 10 l. Se determinaron el porcentaje de ADN de la célula huésped (ADN-CH) y la recuperación de virus durante el paso de precipitación.

55

Tabla 2

Exp.	Parámetros del proceso			Resultados		
				ppt ADN		Aclaramiento
N.º	DCPR (x10 ⁶ células/ml)	Valor de virus (x10 ¹¹ PV/ml)	BD (mM)	Recuperación del paso (%)	Recuperación del paso (%)	Reducción de ADN-CH (%)
1	1,36	2,13	0,72	92	86	99,6
2	2,47	2,24		91	86	99,9
3	2,37	1,85		90	90	99,2
4	9,1	6,7	1,52	69	97	99,9
5	18,6	8,9		88	98	99,8
6	20,1	15		90	82	98,3
7	16,7	11		99	71	99,9
8	25,8	15,9		104	92	99,8

5 Se concluye que la precipitación selectiva del ADN de la célula huésped es posible a alta densidad celular. De hecho, aunque se aumentó la concentración de BD (por un factor de 2), las partículas de virus permanecieron sin precipitar (véase la recuperación superior al 70%) y la reducción de ADN-CH fue superior al 98%.

10 Este proceso ofrece un método para eliminar el ADN de la célula huésped del producto recogido de cultivos de alta densidad celular sin que se vea afectada la recuperación de virus. Con esto se permite el procesamiento de grandes volúmenes de suspensiones de alta densidad celular, lo que es necesario en los procesos industriales.

15 Debe apreciarse que por motivos prácticos se ha utilizado una única concentración de BD (1,52 mM) para la precipitación selectiva del ADN en los experimentos 4-8. Dichos experimentos muestran que las suspensiones que contienen adenovirus con un amplio intervalo (9,1x10⁶-25,8x10⁶ cv/ml) de densidades celulares pueden tratarse con 1,52 mM de BD. Esto coincide con la noción anterior de que la relación entre las concentraciones adecuadas de agente de precipitación selectiva y la densidad celular no es solo aquella bien fijada sino que más bien se proporciona una variación de manera que resulte adecuado un intervalo de concentraciones de agente de precipitación para una densidad celular determinada.

20 La concentración apropiada de BD para tratar una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus con una densidad celular que oscila entre 10x10⁶ y 50x10⁶ células/ml varía entre aproximadamente 1,3 mM y 2,2 mM. La concentración apropiada de BD para tratar una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus con una densidad celular que oscila entre 10x10⁶ y 30x10⁶ células/ml oscila entre aproximadamente 1,3 y 2 mM.

25 Se aprecia que en algunos experimentos a altas densidades celulares (experimentos n.º 6 y 7), se observó una reducción de la recuperación de virus y de la capacidad del filtro durante la 2ª filtración, en comparación con los productos recogidos de baja densidad celular. Además, el uso de dos filtros consecutivos diferentes hace que el proceso sea laborioso y costoso.

30 Ejemplo 4: Aclaramiento en un solo paso de preparaciones de adenovirus de alta densidad celular mediante precipitación selectiva del ADN de la célula huésped seguida de FFT

35 Las células PER.C6 se cultivaron en un biorreactor y se infectaron con Ad35 y se cultivaron a 37°C en un medio de cultivo sin suero durante 3 días. Las células se recogieron a una densidad celular de entre 20 y 30x10⁶ células/ml y valores de virus de 1 a 1,5x10¹² PV/ml. Los virus se liberaban de las células tras la adición de los detergentes no iónicos Triton X-100 y Tween-80 a concentraciones finales del 0,1 y el 0,05%, respectivamente. El tiempo de lisis estuvo entre 2 y 24 horas. Después de la lisis celular, se llevó a cabo un paso de precipitación del ADN seguido de aclaramiento.

40 La precipitación del ADN se realizó usando bromuro de domifeno (BD) del 0,063% al 0,077% en NaCl 40 mM. La precipitación del ADN se llevó a cabo durante 3 h con un tiempo adicional de 2 h de BD con una velocidad de agitación de 0,17 a 1,52 m/s⁻¹. El aclaramiento se realizó usando filtración de flujo tangencial con un filtro de fibra hueca de 0,65 µm (GE Healthcare, modelo CFP-6-D-4MA, 0,046 m²). Un litro del producto recogido lisado y tras la precipitación del ADN se concentró al menos por un factor de 3. Tras el aclaramiento se realizó un lavado usando tres veces el volumen de retención, en un proceso de drenaje y alimentación. Los experimentos de filtración se realizaron con un flujo de permeado que oscilaba entre 15 y 40 LMH. La lisis seguida de precipitación del ADN y aclaramiento se realizó usando 3 productos recogidos diferentes. El porcentaje de ADN de la célula huésped

45

precipitado, la concentración de ADN de la célula huésped por 1×10^{11} partículas víricas y la recuperación vírica tras la precipitación selectiva y el aclaramiento se determinaron en la tabla 3.

Tabla 3

5

Exp.	Parámetros del proceso		Parámetros de rendimiento				
	N.º	Densidad celular ($\times 10^6$ células/ml)	Valor de virus ($\times 10^{11}$ PV/ml)	ADN-CH precipitado (%)	ADN-CH (ng/ 1×10^{11} pv)	Recuperación de virus ppt (%)	Recuperación de virus en aclaramiento (%)
1	20,1	14,1	100	8,6	88	99	87
2	17,9	17,4	99,9	6,9	110	74	81,4
3	23,5	15,3	99,9	23,8	100	81,2	81,2

10

De forma similar al ejemplo previo, se ha mostrado inesperadamente en este documento que las precipitación selectiva del ADN era posible a alta densidad celular. De hecho, aunque se aumentó la concentración de BD, las partículas de virus permanecieron sin precipitar (véase la recuperación superior al 80%) y la reducción de ADN-CH fue superior al 99%.

15

A pesar del fracaso del ejemplo 1, se muestra en este ejemplo que la filtración de flujo tangencial, cuando se usaba en combinación con la precipitación selectiva de ADN-CH, permitía el aclaramiento de suspensiones de alta densidad celular.

20

El uso de filtración de flujo tangencial en lugar de un conjunto de dos filtros de profundidad diferentes (como se ilustró previamente) ofrece la posibilidad de procesar una suspensión de alta densidad celular en una suspensión de adenovirus aclarada en un único paso de filtración.

25

La combinación de precipitación selectiva de ADN-CH con el uso de filtración de flujo tangencial permite la eliminación del ADN de la célula huésped a partir del producto recogido de una suspensión de alta densidad celular e, inesperadamente, se hace esto sin comprometer la recuperación de adenovirus. De hecho, la recuperación total de adenovirus usando este proceso puede incluso ser más alta que usando procesos clásicos de filtración de aclaración en dos pasos usando filtros de profundidad. Además, hace que el proceso de purificación sea menos laborioso y costoso en comparación con el proceso con filtros de profundidad. Con esto se permite el procesamiento de grandes volúmenes de suspensiones de alta densidad celular, lo que es necesario en los procesos industriales.

Referencias

30

Cortin V, Thibault J, Jacob D, Gamier A. High-Titer Adenovirus Vector Production in 293S Cell Perfusion Culture. *Biotechnol. Prog.* 2004.

35

Goerke A, To B, Lee A, Sagar S, Konz K. Development of a Novel Adenovirus Purification Process Utilizing Selective Precipitation of Cellular DNA. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 91, N.º 1, 5 de julio de 2005.

Yuk IHY, Olsen MM, Geyer S, Forestell SP. Perfusion Cultures of Human Tumor Cells: A Scalable Production Platform for Oncolytic Adenoviral Vectors. *Biotechnol. Bioengin.* 86: 637-641 (2004).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de partículas de adenovirus a partir de una suspensión celular con una densidad celular que varía de 5×10^6 a 150×10^6 células por ml, comprendiendo dicho método los pasos consecutivos de:
- 5 a) lisar las células que contiene dicha suspensión celular;
- b) precipitar selectivamente el ADN de la célula huésped que contiene dicha suspensión celular añadiendo un agente de precipitación selectiva, en el que el agente de precipitación selectiva se selecciona entre el grupo compuesto por compuestos de amonio cuaternario, copolímeros de amina y mezclas de los mismos;
- 10 o
- fragmentar el ADN de la célula huésped dentro de dicha suspensión celular añadiendo una nucleasa;
- 15 c) someter la suspensión celular obtenida en el paso b) a aclaramiento mediante filtración de flujo tangencial, para obtener una suspensión de adenovirus purificada.
2. Un método para purificar partículas de adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha precipitación del paso b) se realiza mediante precipitación selectiva del ADN de la célula huésped a partir de las partículas víricas mediante la adición del agente de precipitación selectiva.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho agente de precipitación selectiva es bromuro de domifeno (BD).
- 25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la concentración de bromuro de domifeno (BD) está en el intervalo de 1,2 a 5 mM.
- 30 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la densidad celular está en el intervalo de aproximadamente 10×10^6 a 30×10^6 células por ml y la concentración de bromuro de domifeno (BD) oscila de 1,3 a 2 mM.
- 35 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que dicha filtración de flujo tangencial se realiza con una membrana que tiene un tamaño de poro que oscila de 0,1 a 0,65 μm .
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicha filtración de flujo tangencial se realiza con fibra hueca.
- 40 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que dicha filtración de flujo tangencial se realiza con un sistema de FTA.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que al menos el 80% del ADN de la célula huésped se ha eliminado en la suspensión de adenovirus purificada.

FIG. 1

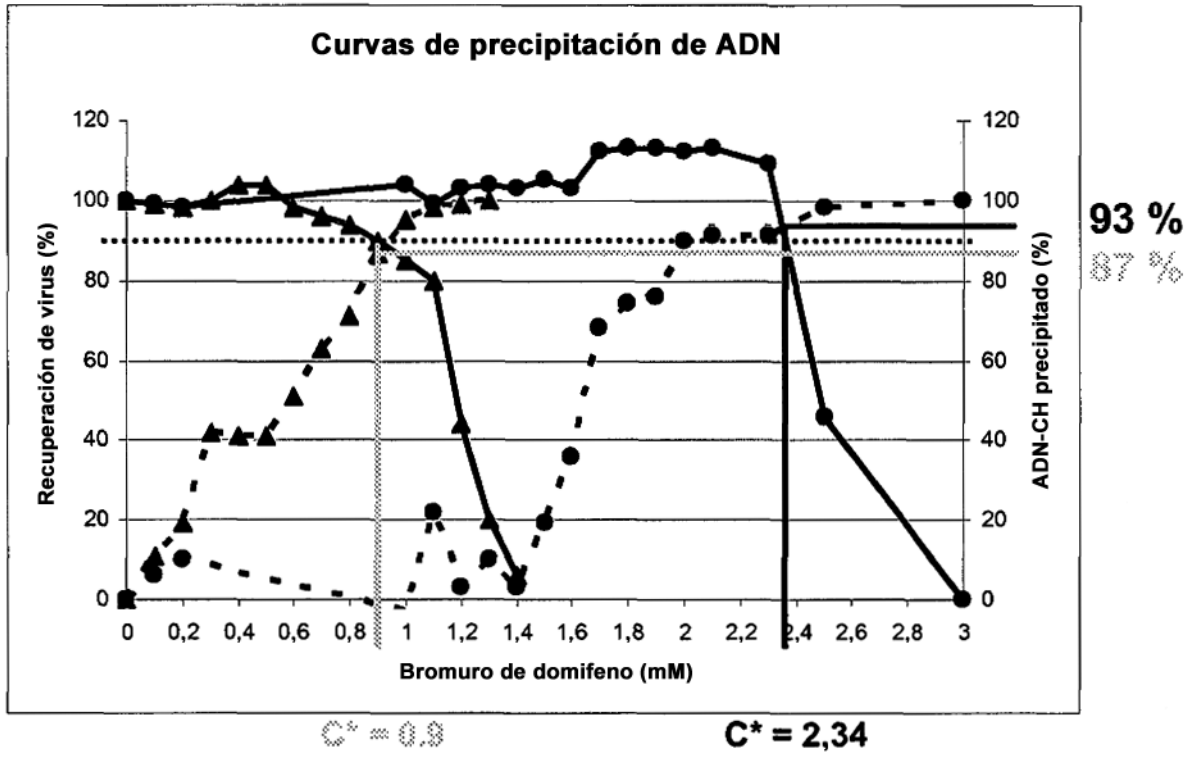


FIG. 2

