

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 429**

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 10773603 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2488636**

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

30 Prioridad:

15.10.2009 US 279014 P

15.10.2009 EP 09173090

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

01.07.2014

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:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 472 429 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

Método para la purificación de partículas 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 últimos avances en el campo de la producción de vacunas han creado la necesidad de preparaciones a gran escala. Se necesitan procesos fiables y de alto rendimiento para proporcionar al mundo la suficiente cantidad de vacunas (recombinantes) para combatir las enfermedades infecciosas.

- 15 Algunas vacunas contra enfermedades infecciosas pueden basarse en partículas de adenovirus recombinantes. Por este motivo, se están haciendo grandes esfuerzos para optimizar los procesos para la producción de adenovirus a base de células. Las densidades de cultivo de las células que subsiguientemente se infectan se están aumentando para obtener mayores rendimientos totales de virus. Tales procesos de alta densidad celular se desvelan, por ejemplo, en el documento WO 2010/060719 de Crucell Holland BV y en Yuk y col. (2004). En estos documentos se describe un proceso para la producción de grandes concentraciones de adenovirus recombinantes. Este proceso optimizado se basa en la posibilidad de infectar cultivos de alta densidad celular (por ejemplo, mayor que 5×10^6 células/ml), manteniendo una alta productividad de virus por célula. Con ello, se ofrece un método para la obtención de una disolución de virus cosechada con alta concentración de virus en un único biorreactor. Los rendimientos de partículas víricas (PV) típicos 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 grandes cantidades de restos celulares y de ADN de las células huésped. Estos contaminantes deben desecharse más adelante en el proceso de purificación, lo que es una operación engorrosa. Con anterioridad, en el documento US 7326555 se desveló un método para desechar el ADN de las células huésped de un cultivo celular cosechado. El método consiste en la precipitación selectiva del ADN de las células huésped separándolo del cultivo celular. Un agente de precipitación selectiva pudo unirse específicamente al ADN de las células huésped y dejar las partículas de adenovirus sin precipitar. Sin embargo, el método en esta referencia solo se ha descrito para cultivos celulares de baja densidad celular, en los que los restos celulares y el ADN de las células huésped están presentes en bajas cantidades.

- 35 Hasta ese momento no se sabía que dicho método pudiera aplicarse en un cultivo con altas densidades celulares. Por el contrario, del estado de la técnica podía deducirse fundadamente que un agente precipitante, como el usado en dicho método, no precipitaría selectivamente el ADN de la célula huésped separándolo del cultivo y precipitaría las partículas del virus al usarlo en altas concentraciones (Goerke y col. 2004).

- 40 La publicación *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 90, 2005, 645-655, desvela la posibilidad cultivar células PER.C6 a densidades de aproximadamente 9×10^6 células/ml, la infección de las mismas con adenovirus, la obtención de los adenovirus por un proceso de lisis con detergente y la eliminación posterior de los restos celulares por centrifugación. La infección de las células cultivadas a la densidad indicada con adenovirus resultó en una elevada productividad volumétrica de virus, aunque la productividad específica de las células se redujo (véase el párrafo que conecta las páginas 652-653).

- 50 Dado que la escala de los procesos de los cultivos celulares se está aumentando y las células se cultivan a densidades crecientes, en la industria existe la necesidad de procesos posteriores que hagan posible el tratamiento de suspensiones celulares de alta densidad. Esto se aplica en particular al campo de la producción de adenovirus.

Sumario de la invención

- 55 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. En este trabajo, hemos encontrado que el ADN de las células huésped en suspensiones de alta densidad celular podía precipitarse selectivamente separándolo de la suspensión celular lisada y dejando las partículas víricas sin precipitar. La precipitación selectiva del ADN de las células huésped se llevó a cabo con bromuro de domifeno.

- 60 La precipitación selectiva en suspensiones de baja densidad celular ha sido descrita con anterioridad, por ejemplo, en el documento US 7326555. Sin embargo, el logro de la precipitación selectiva en una suspensión de alta densidad celular no tiene precedente y fue en gran medida inesperado. De hecho, en el estado de la técnica, por ejemplo, en el documento US 7326555, se demostró que, en suspensiones de baja densidad celular (de hasta 1×10^6 células/ml), las partículas de adenovirus precipitaban al aumentar la concentración de detergente catiónico. Como extrapolación, esto sugiere que un aumento sustancial de la concentración de detergente catiónico (por ejemplo, por un factor de 2) conduciría a la precipitación de la totalidad de las partículas de adenovirus presentes en la suspensión.

En suspensiones de alta densidad celular, en las que la densidad celular es, por ejemplo, diez veces superior y por lo tanto la concentración de ADN de las células huésped es diez veces superior, es de esperar que la concentración de detergente requerida para conseguir la precipitación del ADN de las células huésped sea también significativamente superior. Por consiguiente, a partir de los resultados de las suspensiones de baja densidad, se esperaba que un aumento tal de la concentración de detergente tuviera el efecto de precipitar todas las partículas víricas presentes en la disolución.

Durante las pruebas experimentales con altas densidades celulares (aumentadas por un factor de 10), encontramos que, en oposición a cualquier sugerencia o expectativa basada en el estado de la técnica, la concentración aumentada de bromuro de domifeno (aumentada por un factor de 2,5) precipitaba el ADN de las células huésped (al menos en el 80 %), pero no precipitaba las partículas de adenovirus. Sorprendentemente, el efecto de precipitación selectiva del bromuro de domifeno se mantuvo. Con ello, la presente invención proporciona un proceso que puede usarse para desechar el ADN de las células huésped en procesos de purificación de adenovirus a gran escala con el uso de cultivos de alta densidad celular.

La invención es la siguiente:

1. Un método para la purificación de partículas de adenovirus a partir de una suspensión celular productora, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) lisado de las células en dicha suspensión celular;

b) precipitación selectiva del ADN de las células huésped separándolo de las partículas de adenovirus por adición de bromuro de domifeno en una concentración de 1,3 a 2,2 mM;

c) clarificación de dicha suspensión que contiene dichas partículas de adenovirus para obtener una suspensión purificada que contiene adenovirus, en la que al menos el 80 % del ADN de las células huésped se ha separado por precipitación de la suspensión que contiene adenovirus;

estando el método caracterizado porque la densidad celular de dicha suspensión celular varía de 10×10^6 a 50×10^6 células/ml.

2. Un método de acuerdo con 1, en el que la densidad celular varía de aproximadamente 10×10^6 a 30×10^6 células/ml y la concentración de bromuro de domifeno (BD) varía de 1,3 a 2 mM.

3. Un método de acuerdo con uno cualquiera de 1 o 2, en el que dicho método comprende además una etapa de intercambio aniónico y una etapa de ultrafiltración.

40 Breve descripción de las figuras

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

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

50 Descripción detallada 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.

De acuerdo con la invención, las suspensiones de alta densidad celular se obtienen por cultivo de células hasta altas densidades celulares. Tal cultivo puede llevarse a cabo (sin limitación) en un modo por lotes, por lotes alimentados o por perfusión. Los métodos para el cultivo de células hasta altas densidades celulares son conocidos por el experto en la técnica. Los métodos específicos para la obtención de cultivos de alta densidad celular se desvelan, por ejemplo, en los documentos WO 2004/099396, WO 2005/095578, WO 2008/006494 y WO 2010/060719.

De acuerdo con la presente invención, una suspensión de alta densidad celular contiene entre 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 células/ml, 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.

De acuerdo con la presente invención, los cultivos de alta densidad celular se infectan subsiguientemente con partículas de adenovirus con el fin de permitir la propagación de tales adenovirus en el cultivo celular. Con ello, se obtienen suspensiones de alta densidad celular que contienen altas concentraciones de adenovirus en un único biorreactor. Los métodos para la infección de cultivos de alta densidad celular son conocidos por el experto en la técnica. Los métodos específicos para la obtención de dichos cultivos de alta densidad celular con alta concentración de adenovirus se desvelan, por ejemplo en el documento EP 08168181.9 y en Cortin y col. (2004) y Yuk y col. (2004). Estas referencias describen procesos para la producción de grandes cantidades de adenovirus recombinantes. Estos procesos se basan en la posibilidad de infectar cultivos con alta densidad celular manteniendo una alta productividad de adenovirus por célula. Con ello, se ofrece un método para la obtención de una suspensión de alta densidad celular con altas concentraciones de virus 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, las partículas de adenovirus se purifican a partir de la suspensión de alta densidad celular de acuerdo con la presente invención.

En una primera etapa, el método de la presente invención incluye el lisado de las células contenidas en la suspensión de alta densidad celular. La lisis de las suspensiones de alta densidad celular infectadas con partículas de adenovirus da lugar a la acumulación de grandes cantidades de restos celulares y de ADN de las células huésped en dichas suspensiones celulares. Estas acumulaciones hacen que el procesamiento posterior de la suspensión celular sea engorroso.

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. Las grandes cantidades de ADN de las células huésped se precipitan selectivamente separándolas de las partículas de adenovirus dentro de la suspensión de alta densidad celular mediante la adición de bromuro de domifeno al lisado celular, de modo que al menos el 80 % de las moléculas de ADN de las células huésped precipita separándose de la suspensión de alta densidad celular que contiene las partículas de adenovirus. Según se desvela en este documento, la etapa de precipitación permite la precipitación del ADN de las células huésped contaminante con al menos una reducción del ADN de las células huésped del 80 %, preferentemente del 90 % y aún con mayor preferencia, según se ejemplifica en este documento, con una reducción del ADN de las células huésped de aproximadamente el 95 % después de la clarificación (por ejemplo, por filtración en profundidad).

Lisis

La primera etapa del proceso incluye la lisis de las células dentro de la suspensión celular. Esta primera etapa, en la que se lisan las membranas celulares, permite la cosecha de adenovirus, tanto asociados a las células (intracelulares) como no asociados (extracelulares), a partir de la suspensión de alta densidad celular infectada. Aún siendo el método preferido para la lisis de células huésped que contienen virus, la lisis de dichas células huésped mediante detergente puede sustituirse por métodos de lisis no mecánicos (como un tratamiento enzimático) y/o métodos de rotura mecánica (como la ultrafiltración a través de fibras huecas) para liberar las máximas cantidades de adenovirus. Los métodos que pueden usarse para la lisis de células activas son conocidos por el experto en la técnica y, por ejemplo, se han expuesto en el documento WO 98/22588, págs. 28-35. Algunos métodos útiles a este respecto son, por ejemplo, congelación-descongelación, rotura en sólido, lisis hipertónica y/o hipotónica, rotura en líquido, tratamiento con ultrasonidos, extrusión a alta presión, lisis con detergente, combinaciones de los anteriores y similares. En una realización de la invención, las células se lisan con el uso de al menos un detergente. El uso de un detergente para la lisis tiene la ventaja de que es un método sencillo, cuya escala puede aumentarse fácilmente.

Los detergentes que pueden usarse y la manera en que se emplean son generalmente conocidos por el experto en la técnica. Algunos ejemplos se exponen, por ejemplo, en el documento WO 98/22588, págs. 29-33. Los detergentes, según se usan en este documento, pueden incluir, pero no se limitan a detergentes aniónicos, catiónicos, dipolares y no iónicos. Algunos ejemplos de detergentes son, por ejemplo, Triton y/o polisorbato-80. En una realización, el detergente usado es Triton X-100. Además, puede añadirse un disolvente como TNBP al lisado o al lisado clarificado a baja concentración para complementar la capacidad de estos detergentes para inactivar los virus envueltos. Además, la autólisis de las células huésped infectadas por los adenovirus en su interior puede proporcionar una liberación sustancial de adenovirus intracelulares y puede usarse en los procesos de la invención. Por lo tanto, cualquier forma de lisis de las células huésped conocida en la técnica puede usarse para liberar los virus intracelulares al medio de cultivo de las células huésped para su cosecha final por los métodos desvelados en este documento. El experto en la técnica tendrá claro que la concentración óptima de detergente puede variar, por ejemplo, dentro del intervalo de aproximadamente el 0,1 % al 1 % (p/p).

Precipitación selectiva

Después de la lisis, el ADN se precipita selectivamente mediante la adición de bromuro de domifeno a una concentración de 1,3 a 2,2 mM, mientras las partículas víricas permanecen en la fase líquida. Esta etapa permite la precipitación selectiva del ADN de las células huésped y también mejora la fiabilidad de las etapas posteriores. Según se ejemplifica en este documento, esta etapa de precipitación en un estadio temprano resulta en una reducción del ácido nucleico (de las células huésped) de al menos aproximadamente el 80 % después de la

clarificación.

Los detergentes catiónicos incluyen sales de dialquildimetilamonio como bromuro de domifeno (BD). El bromuro de domifeno se usa como agente de precipitación selectiva para los esquemas de purificación que requieren la separación de cualquier cantidad de componentes celulares, especialmente ácidos nucleicos, de cualquier cantidad de productos biológicos de diferentes tipos, incluidas, pero sin limitarse a partículas víricas, partículas similares a virus o cualquier otro producto biológico que pueda separarse sustancialmente de un componente contaminante procedente del cultivo por medio de una etapa de precipitación selectiva. El bromuro de domifeno está disponible como materia prima de grado de BPF y se usa actualmente en otros productos destinados al uso humano. El bromuro de domifeno se usa ampliamente como principio activo en productos de higiene oral, así como en cremas antibióticas de uso tópico y se produce en grandes cantidades y se libera según las condiciones de BPF actuales.

Las concentraciones de bromuro de domifeno óptimas que se usan en las suspensiones de alta densidad celular para la precipitación del ADN de las células huésped separándolo de la suspensión celular han sido determinadas. Aunque sobre la base del estado de la técnica, se había anticipado que las partículas de adenovirus precipitarían inmediatamente al ponerse en contacto con altas concentraciones de bromuro de domifeno, inesperadamente, las partículas de adenovirus no precipitaron. De hecho, en el estado de la técnica, por ejemplo en el documento US 7326555, se había demostrado que en suspensiones de baja densidad celular (hasta 1×10^5 células/ml), las partículas de adenovirus precipitaban al aumentar la concentración de detergente catiónico. La suspensión tal como se produce por la lisis de cultivos de alta densidad celular, según se desvela en este documento, contendrá cantidades muy superiores de ADN de las células huésped y otras impurezas y, por lo tanto, necesitará cantidades mayores de detergente catiónico (por ejemplo, aumentadas por un factor de 2,5). Basándose en la extrapolación de los resultados obtenidos a baja densidad celular, era de esperar que este aumento de la concentración de detergente catiónico condujera a la precipitación de la totalidad de las partículas de adenovirus presentes en la suspensión.

Sorprendentemente, a altas concentraciones de bromuro de domifeno, todavía fue posible la eliminación selectiva del ADN de las células huésped contaminante de una suspensión de alta densidad celular que contenía partículas de adenovirus. En la presente invención, el bromuro de domifeno se añade a una concentración de 1,3 a 2,2 mM, por ejemplo, de 1,4 a 2 mM, por ejemplo, de 1,4 a 1,8 mM, por ejemplo, de 1,5 a 1,6 mM. Sobre la base de la presente descripción, está claro que el experto en la técnica sabe cómo determinar los intervalos de concentración de bromuro de domifeno apropiados para una densidad celular dada en el momento de la cosecha.

La concentración de BD apropiada para el tratamiento de una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus y tiene una densidad celular de entre 10×10^6 y 50×10^6 células/ml varía entre 1,3 mM y 2,2 mM. La concentración de BD apropiada para el tratamiento de la cosecha de una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus y tiene una densidad celular de entre 10×10^6 y 30×10^6 células/ml varía entre aproximadamente 1,3 mM 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.

En esta etapa, no se requieren nucleasas (incluidas, pero sin limitarse en ningún modo a BENZONASETM, ADNasas y ARNasas), pero pueden ser beneficiosas para una máxima reducción de ADN. A la vista de la capacidad de la etapa de precipitación para eliminar la gran mayoría de los ácidos nucleicos contaminantes, puede no ser esencial una etapa posterior de cromatografía de intercambio aniónico (CIA) para la pureza del producto (dependiendo de la dosis final). Sin embargo, pueden mantenerse una etapa de CIA en el proceso para mayor fiabilidad.

Clarificación

El lisado celular tratado con BD obtenido de las etapas previas se clarifica a continuación para eliminar las impurezas y los restos celulares precipitados. Dicha clarificación puede llevarse a cabo por filtración en profundidad. También es factible una centrifugación con o sin filtración en profundidad como refinado. Por lo tanto, la clarificación del lisado precipitado puede realizarse mediante centrifugación solamente o mediante centrifugación en tándem con una etapa de clarificación de refinado como una filtración en profundidad según se describe en el documento US 7326555.

Al elegir un filtro o un esquema de filtros, fue necesario asegurar un rendimiento fiable en el caso de que pudieran producirse cambios o variaciones en las primeras etapas. El mantenimiento del equilibrio entre un buen rendimiento de clarificación y los rendimientos de las etapas puede investigarse probando diversos tipos de filtros con diversos medios internos. Los filtros adecuados pueden usar filtros de celulosa, fibras de celulosa regenerada, fibras de celulosa combinadas con adyuvantes de filtración inorgánicos (por ejemplo, tierra de diatomeas, perlita, sílice ahumada), fibras de celulosa combinadas con adyuvantes inorgánicos y resinas orgánicas o cualquier combinación de los mismos y filtros poliméricos (algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a nilón, polipropileno, polietersulfona) para conseguir una eliminación eficaz y recuperaciones aceptables del virus. En general, es preferible un proceso con múltiples estadios, pero no se requiere. Un proceso ejemplar con dos o tres estadios constaría de un filtro o filtros gruesos para eliminar el precipitado y los restos celulares de gran tamaño, seguido(s)

de un segundo estadio con un filtro o filtros de refinado con tamaños de poro nominales superiores a 0,2 μm , pero inferiores a 1 μm . La combinación óptima dependerá de la distribución de tamaños del precipitado, así como de otras variables. Además, también puede obtenerse un producto de buena calidad en operaciones de un solo estadio que empleen un filtro de poro relativamente pequeño o centrifugación. Más en general, cualquier estrategia de clarificación que incluya filtración en línea, microfiltración, centrifugación o suministro de adyuvantes de filtración (por ejemplo, tierra de diatomeas) en combinación con la filtración en línea o en profundidad y proporcione un filtrado de claridad adecuada para no obstruir la membrana y/o la resina en la etapa siguiente, será aceptable para la práctica dentro de la presente invención. La filtración en profundidad resulta un método de clarificación fiable para la presente invención. Algunas membranas de filtración en profundidad disponibles comercialmente se desvelan en el documento US 7326555 (columna 14, línea 65 hasta columna 15, línea 19), incorporado en este documento por referencia.

La combinación de las etapas de precipitación y clarificación separa al menos el 80 % o, incluso preferentemente, al menos el 90 % del ADN de las células huésped de las partículas de adenovirus después de la clarificación (por ejemplo, como filtración en profundidad solamente o filtración en profundidad combinada con una etapa de filtración en profundidad de refinado).

Métodos de purificación adicional

En ciertas realizaciones, las partículas de virus cosechadas se purifican adicionalmente. La purificación adicional del virus puede llevarse a cabo en varias etapas que comprenden concentración, ultrafiltración, diafiltración o separación por cromatografía según se describe, por ejemplo, en el documento WO 2005080556. También pueden usarse otras etapas, como cromatografía de intercambio aniónico sobre membrana, esterilización por filtración, adsorción en fase inversa o cromatografía sobre hidroxiapatito. Estas etapas se desvelan, por ejemplo, en el documento US 7326555. El experto en la técnica sabe cómo determinar las condiciones óptimas para cada etapa de purificación. Además, el documento WO 98/22588 describe métodos para la producción y purificación de partículas de virus.

En ciertas realizaciones de acuerdo con la invención, la suspensión de partículas de adenovirus clarificada puede tratarse por ultrafiltración. La ultrafiltración se usa para concentrar la suspensión de virus. La suspensión puede concentrarse cinco a 20 veces y es posible tratarla con nucleasa (según se menciona anteriormente). Otro aspecto de la invención es la subsiguiente introducción de un tampón de intercambio por diafiltración. La diafiltración o intercambio de tampón mediante ultrafiltros es una forma de eliminación e intercambio de sales, azúcares y similares. El experto en la técnica sabe en qué condiciones debe tener lugar el intercambio de tampón y qué tampones son apropiados para esta etapa.

La membrana de ultrafiltración concreta seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño para retener las partículas de adenovirus, pero lo suficientemente grande para eliminar las impurezas de manera eficaz. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, pueden ser apropiados cortes de peso molecular nominales de entre 10 y 1.000 kDa. Se prefiere la ultrafiltración que usa un modo de flujo tangencial. En dicho modo, la etapa puede controlarse mediante el ajuste de un flujo transversal fijo con o sin presión de retorno en el retorno del producto retenido, el ajuste de una presión transmembranal fija o la fijación simultánea del flujo transversal y el flujo del filtrado.

También puede considerarse incluir en el proceso en este punto un tratamiento con nucleasa, pero no se requiere en absoluto. El tratamiento con nucleasa puede incluir el uso de una nucleasa de amplio espectro (por ejemplo, BENZONASETM), una ADNasa, una ARNasa o cualquier combinación de las mismas. Se prefiere una nucleasa o un cóctel con actividad ADNasa y ARNasa simultáneamente. Una etapa de tratamiento con nucleasa puede contemplarse en cualquier punto del proceso, siempre que el contenido de nucleasa residual en el producto final sea aceptable para la aplicación. Se prefiere que el tratamiento con nucleasa tenga lugar después de la clarificación y se prefiere especialmente que el tratamiento con nucleasa tenga lugar después de la clarificación y de una etapa de concentración, pero antes de la cromatografía de intercambio aniónico.

De acuerdo con la invención, una etapa posterior puede ser una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Durante dicha etapa, las partículas de adenovirus se unen a un material cargado positivamente, por ejemplo, una membrana, cartucho o columna. La subsiguiente elución permite separar las partículas del virus de las impurezas y el ADN de las células huésped restante.

Para la purificación de adenovirus con un dispositivo de absorción de membrana Mustang Q, la concentración de NaCl para la carga y el lavado podría ser presumiblemente cualquiera entre 0,3 y 0,4 M a pH 7,5 y variará para un pH diferente. Con mayor preferencia, la concentración de NaCl es 0,35 M. El pH del tampón necesita ser suficientemente alto para la unión de los adenovirus (superior a aproximadamente 6,5). Además, el pH del sistema tampón deberá ser también lo suficientemente bajo para evitar la inestabilidad vírica. El pH máximo exacto que puede usarse dependerá del perfil de estabilidad específico del adenovirus y de los componentes del tampón y puede ser determinado fácilmente por el experto en la técnica para tal aplicación concreta. A modo de guía y en absoluto como limitación, el pH podría variar potencialmente entre aproximadamente 5 y 10.

Se prefiere en gran medida la presencia del 0,1 % de polisorbato-80 (PS-80) en los tampones para conseguir bajos niveles de ADN residual en el producto, ya que dicho PS-80 atenúa la asociación adenovirus/ADN y la agregación de los adenovirus. Está dentro del campo de la experimentación rutinaria del experto en la técnica establecer concentraciones mayores o menores del detergente o detergentes alternativos que serían útiles para promover la disociación de las partículas de adenovirus de otros adenovirus, así como de diversos contaminantes celulares. También está dentro de dicho campo de experimentación que el experto en la técnica pueda elegir un detergente alternativo para el tampón del proceso. Algunos ejemplos de tales detergentes alternativos pueden encontrarse en el documento US 7326555. Los productos para cromatografía de intercambio aniónico sobre membrana, como los producidos por Pall (por ejemplo, la serie MustangTM) y Sartorius (por ejemplo, la serie Sartobind) son adecuados para la purificación de virus de acuerdo con la presente invención. La patente de los EE. UU. 6.485.958 y el documento WO 05/080556 describen el uso de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de adenovirus recombinantes.

La capacidad de unión de los virus a un dispositivo de absorción de membrana como Mustang Q (Pall Corporation) es extremadamente alta, de aproximadamente 7×10^{13} PV/ml. Otros dispositivos de absorción de membrana y resinas adecuados para la purificación del virus en este proceso incluyen, pero no se limitan en absoluto a Source 15Q y Source 30Q (GE life sciences), Q-Sepharose XL (GE life sciences), Fractogel TMAE (EM industries), Sartobind Q (Sartorius), Adsept Q (Natrix separations), CIM QA (BIA separations). La elución de los adenovirus se realizará preferentemente con un tampón que contenga NaCl. El experto en la técnica sabe cómo optimizar la concentración de NaCl.

En ciertas realizaciones, se prefiere usar al menos una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, el adenovirus puede tener suficiente pureza. Sin embargo, en ciertas realizaciones se lleva a cabo adicionalmente una etapa de cromatografía de exclusión molecular para aumentar la fiabilidad del proceso. Esta etapa puede ser anterior o posterior a la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Obviamente, otras etapas de purificación también pueden combinarse adecuadamente con una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El uso de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de adenovirus ha sido descrita exhaustivamente y, por lo tanto, este aspecto se encuentra dentro del alcance del experto en la técnica. Para la purificación de adenovirus se han usado y están disponibles muchas matrices cromatográficas diferentes. El experto en la técnica puede encontrar fácilmente el material de intercambio aniónico óptimo para la purificación de dichos adenovirus.

En cualquier realización concreta de la presente invención, el producto del intercambio aniónico puede diafiltrarse en el tampón de formulación y esterilizarse por filtración. Alternativamente, puede añadirse una etapa de cromatografía adicional (por ejemplo, de intercambio catiónico) antes o después de la diafiltración con el potencial de mejorar la fiabilidad de la eliminación de impurezas y/o virus/priones.

En este estadio también podría ser posible una etapa de ultrafiltración adicional. La ultrafiltración de flujo tangencial es útil para eliminar proteínas y ácidos nucleicos residuales y para cambiar los adenovirus a un tampón de formulación. La elección entre membranas de 300 kDa y 500 kDa depende de la compensación entre el rendimiento y la mejora de la eliminación de impurezas. Otras configuraciones de membrana (como fibra hueca) son sustitutos aceptables. La membrana de ultrafiltración seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño para retener las partículas de adenovirus, pero lo suficientemente grande para eliminar las impurezas de manera eficaz. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, pueden ser apropiados cortes de peso molecular nominales de entre 100 y 1.000 kDa.

En el proceso puede incluirse una etapa de esterilización por filtración, que ayude a eliminar carga biológica. El producto puede filtrarse a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) modificado de 0,22 μm (por ejemplo, Millipore Millipak).

También podrían añadirse al proceso otras etapas de procesamiento posterior opcionales. Estas podrían incluir, por ejemplo, una etapa de cromatografía de exclusión molecular, una etapa de adsorción en fase inversa y/o una etapa de cromatografía sobre hidroxiapatito. En los documentos US 7326555, WO 03/097797 y WO 02/44348, por ejemplo, pueden encontrarse más detalles de cada una de estas etapas.

La solicitud internacional WO 97/08298 describe la purificación de adenovirus con el uso de ciertas matrices cromatográficas para evitar daños en los virus y con etapas de intercambio aniónico y exclusión molecular.

Ciertos métodos de ultrafiltración son también muy adecuados para la purificación de adenovirus, según se desvela en el documento WO 2006/108707. Estas etapas pueden llevarse a cabo además o en lugar de ciertas etapas de purificación cromatográfica.

Aumento de la escala de los sistemas de cultivo celular y sistemas de procesamiento posterior

Los procesos de la presente invención pueden realizarse a mayor escala. Los cultivos celulares usados en la presente invención varían desde cultivos a pequeña escala (por ejemplo, tandas de 1-10 l) y cultivos a media escala

(por ejemplo, tandas de 20-1.000 l) hasta preparaciones comerciales a gran escala, con tandas de producción de 1.000 a 50.000 l. La escala de las etapas iniciales del proceso (lisis, filtración en profundidad y ultrafiltración) depende del volumen del cultivo, mientras que escala de la cromatografía de intercambio aniónico y de las etapas subsiguientes depende de la cantidad inicial de partículas adenovíricas. Por lo tanto, la escala de las etapas posteriores se basará en una estimación de la productividad del biorreactor de al menos 1×10^{12} partículas de adenovirus por ml (PV/ml). Estos elevados rendimientos de adenovirus pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la infección de cultivos de alta densidad celular (según se describe, por ejemplo, en el documento EP 08168181.9). La purificación adicional de estas suspensiones de alta densidad celular que contienen altas concentraciones de partículas de adenovirus se hace posible con la presente invención. La posibilidad de procesar estas suspensiones que contienen grandes cantidades de restos celulares y de ADN de las células huésped permite la purificación de grandes cantidades de partículas de adenovirus por volumen de suspensión. Es el mérito de esta invención proporcionar un método para el procesamiento de lotes de cultivos celulares con altas densidades celulares que contienen altas concentraciones de partículas de adenovirus, lo que permite la obtención de rendimientos muy elevados de adenovirus por volumen procesado. El presente método, aunque puede aplicarse a cultivos celulares a gran escala, permitirá cultivar células a pequeña escala, pero con mayores densidades celulares y alcanzar aún rendimientos elevados de adenovirus que puedan procesarse adicionalmente de manera eficaz. Este método ofrece la posibilidad de procesar lotes de adenovirus de gran concentración, lo que tendrá un gran impacto en toda la industria de purificación de adenovirus.

20 Adenovirus y células productoras

La invención se refiere a la purificación de adenovirus. Un adenovirus de acuerdo con la invención puede ser cualquier adenovirus de tipo natural, modificado o mutado y/o un vector adenovírico recombinante. De interés específico en las aplicaciones de vacunas génicas y/o de terapia génica es el uso de adenovirus incapaces de replicación de la 1^a o 2^a generación, defectuosos por una delección en E1 u otras delecciones adicionales, incluidos vectores de adenovirus dependientes de un virus auxiliar ("gutless"). El genoma de adenovirus se asocia generalmente con patologías benignas en humanos. Dicho genoma es de fácil manipulación, dependiendo de la estrategia utilizada para la construcción del vector respectivo. Un virus incapaz de replicación, como los vectores de adenovirus recombinantes 35 (rAd35) o 26 (rAd26) (según se ejemplifica en este documento), requieren una línea celular productora que complemente las delecciones.

Una célula productora (a veces también denominada en la técnica y en este documento como "célula de empaquetamiento", "célula de complementación" o "célula huésped") puede ser cualquier célula productora en la que puede propagarse un adenovirus deseado. Por ejemplo, la propagación de vectores de adenovirus recombinantes se realiza en células productoras que complementan las deficiencias de los adenovirus. Preferentemente, tales células productoras tienen en su genoma al menos una secuencia E1 de adenovirus y por ello son capaces de complementar adenovirus recombinantes con una delección en la región E1. Además, los adenovirus pueden tener una delección en la región E3, que es prescindible en el genoma de Ad y, por lo tanto, esta delección no ha de complementarse. 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 los EE. UU. 5.994.128), amniocitos transformados por E1 (véase la patente EP 1230354), células A549 transformadas por E1 (véanse, por ejemplo, el documento WO 98/394411 y la patente de los EE. UU. 5.891.690), GH329:HeLa (Gao y col., 2000, Human Gene Therapy 11: 213-219), 293 y similares. En ciertas realizaciones, las células productoras son, por ejemplo, células HEK293, células PER.C6, células 911 o células IT293SF y similares. Preferentemente, se usan células PER.C6 (nº de depósito en la colección ECACC 96022940, depositadas el 29 de febrero de 1996 en la colección ECACC, CAMR, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, Reino Unido; véase la patente de los EE. UU. 5.994.128) o células derivadas de estas como células productoras.

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

El experto en la técnica conocerá las posibilidades de propagación de los vectores adenovíricos de diferentes serotipos en células huésped específicas mediante métodos como se desvelan, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. 6.492.169 o en el documento WO 03/104467 y las referencias allí incluidas. Por ejemplo, para la propagación de rAd35, deficiente en E1, pueden construirse células productoras específicas que expresen E1B-55K de Ad35, por ejemplo, a partir de células productoras existentes que expresan E1A y E1B de Ad5, como las células PER.C6 o HEK293 (véase, por ejemplo, el documento US 6.492.169), como sabe el experto en la técnica. Alternativa y preferentemente, pueden usarse líneas celulares existentes, que complementen Ad5, como por ejemplo PER.C6 o HEK293, sin modificación de las células para la propagación de rAd35 o rAd26 deficientes en E1, por inclusión de la secuencia codificante de E4-orf6 de Ad5 en el vector rAd35 o rAd26, según se expone exhaustivamente en el documento WO 03/104467. Por lo tanto, la propagación de los vectores adenovíricos de cualquier serotipo puede llevarse a cabo en las células productoras con el uso de medios y métodos bien conocidos por el experto en la técnica. Los vectores adenovíricos, los métodos para su construcción y los métodos para su

propagación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. n° 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 en los artículos de Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", y M. S. Horwitz, "Adenoviruses", capítulos 67 y 68, respectivamente, en Virology, B. N. Fields y col., eds., 3ª edición, Raven Press, Ltd. Nueva York (1996).

La invención se explica con más detalle en los ejemplos siguientes. Los ejemplos no limitan la invención en ningún modo. Solo sirven para aclarar dicha invención.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Precipitación selectiva del ADN de las células huésped en suspensiones de alta densidad celular

La precipitación selectiva del ADN de las células huésped ha sido demostrada en el estado de la técnica (Goerke y col., documento US 7326555) para densidades celulares de hasta 1×10^6 células/ml. En dichas publicaciones se demostró que (para bajas densidades celulares) al menos el 80 % del ADN de las células huésped precipitaba separándose de la suspensión celular, con una recuperación de las partículas víricas del 90 %. Sin embargo, hasta el momento era completamente desconocido si podría llevarse a cabo una precipitación selectiva semejante a alta densidad celular, ya que tales suspensiones celulares contendrían cantidades muy superiores de ADN de las células huésped y de restos celulares y, por lo tanto, se esperaría que fueran necesarias cantidades muy superiores del agente precipitante de ADN, mientras que la extrapolación de los datos del estado de la técnica sugiere que tales concentraciones mayores del agente precipitante de ADN precipitarían también el adenovirus.

Con el fin de explorar la posibilidad de la precipitación de ADN a altas densidades celulares, se examinó la precipitación del ADN de las células huésped en tubos de ensayo a pequeña escala que contenían densidades celulares de hasta 30×10^6 células/ml. El modelo de tubos de ensayo a pequeña escala se usó como una herramienta de análisis rápido para examinar si la precipitación selectiva de ADN todavía tiene lugar a altas densidades celulares.

Se cultivaron células PER.C6 en un biorreactor, se infectaron con el adenovirus 35 (Ad35) y se incubaron a 37°C en un medio de cultivo sin suero durante tres días. Las células se cosecharon a una densidad celular de entre 2 y 30×10^6 células/ml y títulos del virus de 8×10^{10} a $1,5 \times 10^{12}$ PV/ml. La lisis de las células se llevó a cabo durante un periodo de 2 a 24 horas (h), mediante la adición de los detergentes no iónicos Triton X-100 y Tween-80 hasta concentraciones finales del 0,1 % y el 0,05 %, respectivamente. A 3,5 ml de la cosecha lisada se le añadieron concentraciones crecientes de bromuro de domifeno (BD) en NaCl 40 mM, a lo que siguió su inmediata agitación vorticial durante un minuto. El material precipitado se eliminó con filtros de jeringa de fluoruro de polivídeno (PVDF) de $0,45 \mu\text{m}$. Los filtrados se analizaron para determinar las concentraciones de Ad35 y de ADN de las células huésped mediante HPLC de intercambio aniónico y un ensayo de PCR cuantitativa, respectivamente.

La figura 1 muestra la recuperación del virus y el ADN de las células huésped precipitado, representados frente a la concentración de bromuro de domifeno. Las curvas representadas por triángulos se obtuvieron de la cosecha de cultivos celulares con densidades celulares entre $2,5 \times 10^6$ y $3,5 \times 10^6$ células/ml. Las curvas representadas por círculos se obtuvieron de la cosecha de cultivos celulares con densidades celulares entre 20×10^6 y 30×10^6 células/ml. En las gráficas se resalta el valor C^* (concentración de bromuro de domifeno que muestra el 90 % de recuperación de virus) a baja y a alta densidad celular y el porcentaje relacionado de ADN de las células huésped precipitado.

La concentración de BD que se requiere para precipitar más del 90 % del ADN de las células huésped a densidades celulares entre 20×10^6 y 30×10^6 células/ml aumenta por un factor de al menos 2,5 veces en comparación con la concentración de BD requerida a densidades celulares 10 veces inferiores. Sorprendentemente, el aumento de la concentración de BD no dio lugar a la precipitación de las partículas del virus, como se esperaría de la extrapolación de las curvas obtenidas a baja densidad celular.

El experimento se repitió con la cosecha de cultivos celulares con densidades celulares entre 18×10^6 y 25×10^6 células/ml. La figura 2 muestra la recuperación del virus y el ADN de las células huésped precipitado, representados frente a la concentración de bromuro de domifeno. Las curvas representadas por triángulos se obtuvieron de la cosecha de cultivos celulares con densidades celulares entre $2,5 \times 10^6$ y $3,5 \times 10^6$ células/ml. Las curvas representadas por círculos se obtuvieron de la cosecha de cultivos celulares con densidades celulares entre 18×10^6 y 25×10^6 células/ml. En las gráficas se resalta el valor C^* (concentración de bromuro de domifeno que da lugar al 90 % de recuperación de virus) a baja y a alta densidad celular y el porcentaje relacionado de ADN de las células huésped precipitado.

Como puede observarse en las gráficas de las figuras 1 y 2, la concentración de BD que da lugar al 90 % de recuperación del virus (C^*) para las suspensiones de alta densidad celular puede diferir ligeramente entre los experimentos individuales y esto es parte de la variación normal. Sin embargo, las gráficas demuestran coherentemente que también es posible una precipitación selectiva del ADN a altas densidades celulares y que la

concentración adecuada del agente de precipitación selectiva (aquí, BD) es significativamente superior a la empleada para los cultivos de baja densidad celular, pero muy inferior a lo que se esperaría de la extrapolación. Por lo tanto, el experto en la técnica reconocerá que existe un intervalo, más que un valor fijo de concentraciones adecuadas para el agente de precipitación selectiva y podrá encontrar el intervalo adecuado sobre la base de la descripción en este documento. Por ejemplo, las concentraciones apropiadas de BD para el tratamiento de la cosecha de una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus y tiene una densidad celular entre 10×10^6 y 30×10^6 células/ml varían entre aproximadamente 1,3 y 2 mM.

Sobre la base de estos resultados, el experto en la técnica será consciente ahora de que la precipitación de ADN puede extrapolarse a suspensiones con adenovirus de densidades celulares aún mayores, por ejemplo, de aproximadamente 40×10^6 células/ml, por ejemplo, de aproximadamente 50×10^6 células/ml y que los adenovirus de tales suspensiones de alta densidad celular pueden purificarse con el proceso de la presente invención.

Ejemplo 2: Precipitación selectiva del ADN de las células huésped en suspensiones de alta densidad celular a mayor escala

La precipitación de ADN se examinó a escalas en el intervalo entre 0,5 l y 20 l. Las concentraciones de BD usadas para la precipitación de ADN se basaron en los resultados experimentales anteriores (figura 2). Se usó aproximadamente el 80 % de la concentración C*, según se determinó en el modelo del tubo de ensayo a pequeña escala.

Se cultivaron células PER.C6 en modo por lotes o por perfusión en biorreactores de 2 l o de 10 l. En el modo por lotes, las células se cultivaron durante cuatro días y se infectaron después de haber alcanzado una densidad entre 1×10^6 y $1,6 \times 10^6$ células/ml. Después de la infección, las células se siguieron cultivando durante tres días y entonces se cosecharon.

En el modo de perfusión, dicha perfusión se realizó con un sistema de flujo tangencial alterno (FTA) y se inició cuatro 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 fresco sin suero en el biorreactor hasta una densidad celular de aproximadamente 13×10^6 células/ml. A continuación, el biorreactor se infectó con el virus Ad35. El sistema de flujo FTA se inició cinco horas después de la infección con una velocidad de reemplazo del medio de 2 volúmenes del recipiente por día. Las células se cosecharon después de tres días (desde de la infección). La densidad celular en el momento de la cosecha (DCMC) se indica en la tabla 1.

Después de la cosecha, las células se lisaron durante un periodo de dos a 24 horas mediante la adición de los detergentes no iónicos Triton X-100 y Tween-80 hasta concentraciones finales del 0,1 % y 0,05 %, respectivamente. A continuación, se añadió bromuro de domifeno a la cosecha lisada hasta concentraciones finales de 0,72 y 1,52 mM en NaCl 40 mM. El lisado precipitado se clarificó mediante dos filtros de profundidad cargados con tamaños de poro estimados entre aproximadamente 10 y 5 μm (Millistak + CE20) y entre aproximadamente 1 y 0,2 μm (Cuno Zeta plus 50CP), respectivamente. La clarificación se llevó a cabo con un flujo constante de 100 l/m²/h, hasta que la presión alcanzó 5 psi (34,47 kPa).

La tabla 1 muestra los parámetros del proceso y los resultados del proceso de purificación. La lisis, la precipitación de ADN y la clarificación se llevaron a cabo usando ocho cosechas diferentes, que diferían en volumen, densidad celular en el momento de la cosecha (DCMC) y título del virus. Las cosechas se recogieron de biorreactores de 2 l o 10 l. Se determinaron el porcentaje de ADN de las células huésped precipitado (ADN-CH) y la recuperación del virus en la etapa de precipitación.

Tabla 1

Experimento	Parámetros del proceso			Resultados		
				Precipitación de ADN	Clarificación	
n°	DCMC (x 10 ⁶ células/ml)	Título del virus (x 10 ¹¹ PV/ml)	BD (mM)	Recuperación de la etapa (%)	Recuperación de la etapa (%)	Reducción del 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

ES 2 472 429 T3

7	16,7	11		99	71	99,9
8	25,8	15,9		104	92	99,8

Se concluye que la precipitación selectiva de ADN es posible a alta densidad celular. De hecho, aunque la concentración de BD se aumentó (por un factor de 2), las partículas del virus permanecieron sin precipitar (véase la recuperación superior al 69 %) y la reducción del ADN-CH fue superior al 98 %.

5 Con ello, se permite el procesamiento de grandes volúmenes de suspensiones de alta densidad celular, lo cual es necesario en los procesos industriales.

10 Ha de señalarse que, por razones prácticas, se ha usado una sola concentración de BD (1,52 mM) para la precipitación selectiva de ADN en los experimentos 4-8. Estos experimentos muestran que con BD 1,52 mM es posible tratar suspensiones que contienen adenovirus con un amplio intervalo de densidades celulares ($9,1 \times 10^6$ - $25,8 \times 10^6$ células viables/ml). Esto está de acuerdo con la idea anterior de que la relación entre las concentraciones adecuadas del agente de precipitación selectiva y la densidad celular no es demasiado fija, sino que más bien permite variación, de modo que un intervalo de concentraciones del agente precipitante es adecuado para una
15 densidad celular dada.

20 La concentración apropiada de BD para el tratamiento de una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus y tiene una densidad celular entre 10×10^6 y 50×10^6 células/ml varía entre 1,3 mM y 2,2 mM. La concentración apropiada de BD para el tratamiento de una suspensión de alta densidad celular que contiene adenovirus y tiene una densidad celular entre 10×10^6 y 30×10^6 células/ml varía entre 1,3 mM y 2 mM.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de partículas de adenovirus a partir de una suspensión de células productoras, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5
- a) lisado de las células en dicha suspensión celular;
- b) precipitación selectiva del ADN de la célula huésped separándolo de las partículas de adenovirus por adición de bromuro de domifeno en una concentración de 1,3 a 2,2 mM;
- 10
- c) clarificación de dicha suspensión que contiene dichas partículas de adenovirus para obtener una suspensión que contiene adenovirus purificada, en la que al menos el 80 % del ADN de la célula huésped se ha separado por precipitación de la suspensión que contiene adenovirus;
- 15
- estando el método caracterizado porque la densidad celular de dicha suspensión celular varía de 10×10^6 a 50×10^6 células/ml.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la densidad celular varía de aproximadamente 10×10^6 a 30×10^6 células/ml y la concentración de bromuro de domifeno (BD) varía de 1,3 a 2 mM.
- 20
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho método comprende además una etapa de intercambio aniónico y una etapa de ultrafiltración.

FIG. 2

