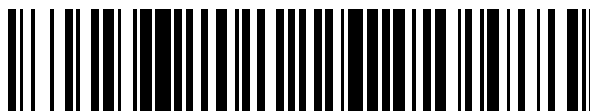


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 015**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009** **E 09744140 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014** **EP 2350268**

54 Título: **Método para la producción de vectores adenovíricos**

30 Prioridad:

03.11.2008 US 198122 P

03.11.2008 EP 08168181

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

23.03.2015

73 Titular/es:

CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)

**Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**LUITJENS, ALFRED y
LEWIS, JOHN ALFRED**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 532 015 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 producción de vectores adenovíricos

- 5 La invención se refiere al campo del cultivo celular y la producción de vectores adenovíricos. Más concretamente, se refiere a métodos mejorados para el cultivo de células de mamíferos, la infección de estas células con adenovirus y la producción de partículas adenovíricas a partir de las mismas.

Antecedentes de la invención

- 10 Los desarrollos recientes en el campo de la vacunación con ADN mediante el uso de vectores víricos recombinantes ha creado la necesidad de la preparación a gran escala de material para uso clínico. Se necesitan procesos que sean capaces de apoyar al mundo menos desarrollado y de menor desarrollo con cantidades suficientes de vacunas recombinantes basadas en adenovirus para luchar, por ejemplo, contra el problema de la tuberculosis y la malaria en el mundo. Una evaluación de las cohortes de nacimientos muestra que se esperan más de 150.000.000 nacimientos en el mundo menos desarrollado y de menor desarrollo en el periodo 2010-2015. Sobre la base de esta cohorte de nacimientos, la demanda anual proyectada para una vacuna podría alcanzar aproximadamente $1,5 \times 10^{19}$ partículas víricas (PV) cada año (<http://esa.un.org/unpp/index.asp?panel=2>).

- 20 Se han descrito varios procesos para la producción de adenovirus. Estos procesos usan cultivos celulares adherentes en botellas rotatorias, fábricas celulares (Nunc o CellStack de Corning) o cubos celulares (Corning). Los procesos de producción en cultivos celulares adherentes no pueden satisfacer la demanda mundial de vacunas basadas en adenovirus. Por consiguiente, las células usadas en los procesos adherentes se adaptan a cultivos en suspensión (por ejemplo, las líneas celulares HEK293 y PER.C6®). Con el uso de cultivos en suspensión es posible aumentar la escala de los procesos de producción para biorreactores a gran escala. Los cultivos celulares en suspensión para la producción de adenovirus se realizan normalmente a una escala de entre 3 y 20 l y se ha descrito un aumento satisfactorio de la escala hasta 100 l (Kamen y col., 2004) y 250 l (Xie y col., 2003). Se han descrito experimentos en los que se anticipa un aumento de la escala hasta 10.000 l (Xie y col., 2003).

- 30 Sin embargo, una desventaja importante del aumento de la escala hasta 10.000 l es la gran inversión de capital (CAPEX) necesaria para diseñar y construir una instalación de biorreactores de 10.000 l. Además, el compromiso de inversión de capital para la construcción de una instalación de 10.000 l, en las condiciones de bioseguridad BSL 2, debe realizarse antes de saber incluso si el producto tendrá éxito (fase IV y posteriores). Se calcula que el gasto de inversión total para una planta de biorreactores de 10.000 l está entre 225.000.000 € y 320.000.000 € (Estape y col., 2006). Por consiguiente, sería deseable la preparación a menor escala, por ejemplo, en biorreactores de 1.000 l o más pequeños.

- Con el uso de los procesos existentes en la actualidad deben producirse más de 150 lotes de 1.000 l al año para alcanzar el objetivo de $1,5 \times 10^{19}$ PV/año. Por consiguiente, existe la necesidad de mejorar los sistemas de producción de adenovirus para mejorar los rendimientos de partículas adenovíricas con el fin de satisfacer la demanda mundial de vacunas de adenovirus, preferentemente con costes no prohibitivos.

- Uno de los problemas que se presentan en la optimización de la producción de adenovirus es el denominado "efecto de la densidad celular". En el modo de operación por lotes, varias referencias sugieren la existencia de una densidad celular óptima en el momento de infección para la producción de adenovirus. El óptimo se encuentra entre $0,5$ y 1×10^6 células/ml (Maranga y col., 2005; Kamen y col., 2004). Se ha demostrado que, para la producción de adenovirus (Ad5) en un biorreactor del tipo de tanque agitado por lotes, la productividad de virus por célula permanece constante hasta aproximadamente $0,9 \times 10^6$ células/ml, pero disminuye abruptamente a aproximadamente 1×10^6 células/ml (Altaras y col., 2005). Por encima de 2×10^6 células/ml, no se detectan partículas víricas. El valor crítico relacionado con la caída de la producción específica con las densidades celulares en el momento de infección depende del medio. Ningún medio comercial disponible hasta el momento ha mostrado potencial para alcanzar grandes rendimientos de partículas víricas, manteniendo a la vez la producción específica óptima a densidades celulares por encima de 1×10^6 células/ml (Kamen y col., 2004). La razón de esta caída no se conoce todavía, pero podría ser debida a la limitada disponibilidad de nutrientes para la producción de virus o a altas concentraciones de metabolitos que inhiben la producción de virus.

- Las operaciones por lotes alimentados, tales como por adición de glucosa, glutamina y aminoácidos, permitieron infecciones a densidades celulares de hasta 2×10^6 células/ml. Sin embargo, las productividades alcanzadas a altas densidades celulares fueron inferiores a las obtenidas con una infección a densidades celulares de 1×10^6 células/ml (Kamen y col., 2004).

- En los procesos de perfusión, las células se retienen en el biorreactor por medio de fibras huecas, filtros de centrifugación o separadores acústicos, mientras el medio de cultivo se perfunde a través del biorreactor. En estos procesos, pueden alcanzarse a veces densidades celulares superiores a 100×10^6 células/ml (por ejemplo, Yallop y col., 2005).

Las células infectadas perfundidas mostraron una pérdida prematura de células durante la perfusión con un sistema de fibras huecas. Esto podría estar relacionado con su mayor sensibilidad al cizallamiento debido a la infección vírica (Cortin y col., 2004). Lo más probable es que la causa de este fenómeno fuera el estrés hidrodinámico inducido en el entubado, las fibras huecas o la bomba peristáltica sobre las células infectadas, que son más frágiles. Dado que las células infectadas son más frágiles, se ha sugerido que el separador acústico sería especialmente deseable si la perfusión ha de mantenerse a lo largo de la fase de infección. Sin embargo, las infecciones llevadas a cabo en el modo de perfusión solo pudieron mantenerse para densidades celulares de 3×10^6 células/ml con una tasa de perfusión de dos volúmenes/día. La infección a una densidad celular de 6×10^6 células/ml condujo a una reducción de la productividad específica de cinco veces (Henry y col., 2004).

A pesar del efecto de la densidad celular descrito por otros autores, una publicación (Yuk y col., 2004) describe cultivos perfundidos satisfactorios de células tumorales humanas como plataforma para la producción de vectores adenovíricos oncolíticos. Esta publicación describe un proceso de perfusión para altas densidades celulares mediante el uso de la tecnología del flujo tangencial alterno (ATF). Para una densidad media de células viables en el momento de infección de 9×10^6 células HeLaS3/ml, se observó un título vírico medio de aproximadamente 4×10^{11} PV/ml. Las células tumorales usadas en esta publicación no son preferidas como células productoras, dado que el uso de células tumorales puede plantear riesgos de seguridad cuando las partículas de adenovirus producidas van a administrarse a humanos. El adenovirus recombinante en esta publicación estaba basado en Ad5. Tales adenovirus tienen posibilidades limitadas de uso como vacunas, ya que la mayoría de la población humana contiene anticuerpos preexistentes neutralizantes contra Ad5 y, por lo tanto, los adenovirus recombinantes de otros serotipos son más adecuados para su uso como vacunas (véase, por ejemplo, el documento WO 00/70071). En particular, los adenovirus recombinantes del subgrupo B, tales como Ad35, son especialmente ventajosos para su uso como vacunas (documento WO 00/70071). El documento WO 2005/080556 desvela la producción de Ad35 mediante la infección de células PER.C6 a una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ml.

Se dispone, si acaso, de una limitada información para la producción a gran escala de adenovirus recombinantes de otros serotipos distintos de Ad5, especialmente del ventajoso serotipo 35. Se han descrito algunas diferencias entre Ad35 y Ad5 con respecto a purificación de los mismos mediante intercambio aniónico (por ejemplo, el documento WO 2005/080556). Las propiedades físicas en cierta medida diferentes de los adenovirus recombinantes de distintos serotipos pueden dar lugar a diferencias en los procesos de producción o en determinadas condiciones. Tales diferencias potenciales pueden ser especialmente importantes a escala industrial, en que incluso diferencias aparentemente pequeñas a pequeña escala pueden tener consecuencias económicas considerables a la escala prevista para la producción de la demanda mundial anual. Por ejemplo, hasta ahora se desconoce si el efecto de la densidad celular descrito para Ad5 será similar para otros serotipos. Por consiguiente, con el fin de satisfacer la demanda mundial de vacunas de rAd35, existe la necesidad de mejorar los sistemas para la producción de adenovirus recombinantes del serotipo 35 (rAd35).

Sumario de la invención

En este documento, hemos encontrado que los rendimientos de adenovirus recombinantes del serotipo 35 (rAd35) aumentaron adicionalmente cuando las células productoras se infectaron a densidades por encima de 10×10^6 células viables/ml en cultivos perfundidos. Por el contrario, los rendimientos de adenovirus recombinantes del serotipo 5 (rAd5) fueron inferiores cuando las células productoras se infectaron a 20×10^6 o 30×10^6 células viables/ml, en comparación con la infección a 10×10^6 células viables/ml. Por lo tanto, rAd35 se propaga de manera diferente a rAd5 en las células productoras en las condiciones empleadas. Además, hemos observado que otro serotipo más se comporta de nuevo de manera diferente, lo que sugiere que los procesos para serotipos específicos de adenovirus pueden tener que ajustarse a cada serotipo con el fin de obtener los mejores resultados. La presente invención proporciona un sistema para la producción de un rAd35 optimizado en cuanto al rendimiento, la calidad del rAd35 obtenido y la facilidad de manejo del virus recogido para su procesamiento posterior.

La invención proporciona un método para la producción de un adenovirus recombinante del serotipo 35 (rAd35), en que el método comprende: a) el cultivo de las células productoras en suspensión con un sistema de perfusión; b) la infección de dichas células a una densidad de entre aproximadamente 10×10^6 células viables/ml y 16×10^6 células viables/ml con rAd35; c) el cultivo posterior de las células infectadas con un sistema de perfusión para la propagación de dicho rAd35; y d) la recogida de dicho rAd35. Las células productoras de acuerdo con la invención son células PER.C6. Las etapas a), b) y c) se llevan a cabo en un biorreactor.

En ciertas realizaciones, dichas células en la etapa b) se infectan con rAd35 a una densidad de entre 10×10^6 y 14×10^6 células viables/ml.

En ciertas realizaciones preferidas, dicho sistema de perfusión en la etapa c) es un sistema de perfusión de flujo tangencial alterno (ATF). En otras realizaciones preferidas, dicho sistema de perfusión en la etapa a) es un sistema de perfusión de flujo tangencial alterno (ATF). En una realización preferida, dicho sistema de perfusión en ambas etapas a) y c) es un sistema de perfusión de flujo tangencial alterno (ATF).

En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende además: e) la purificación del rAd35. En otras

realizaciones adicionales, el método comprende además: f) la preparación de una composición farmacéutica que contiene el rAd35 purificado.

En ciertas realizaciones, dicho adenovirus recombinante carece de al menos una porción de la región E1 y comprende un ácido nucleico heterólogo.

En aspectos preferidos, la relación entre partículas físicas y partículas infecciosas (PV/UI) del rAd35 producido es inferior a 30:1 y preferentemente inferior a 20:1.

Además, se proporciona un método para la producción de al menos 1×10^{12} partículas víricas (PV)/ml de rAd35, en que el método comprende: a) el cultivo de las células productoras en suspensión con un sistema de perfusión; b) la infección de dichas células a una densidad de entre aproximadamente 10×10^6 células viables/ml y 16×10^6 células viables/ml con rAd35; c) el cultivo posterior de las células infectadas con un sistema de perfusión para la propagación de dicho rAd35, en el que la concentración de las partículas víricas de rAd35 alcanza al menos 1×10^{12} PV/ml; y d) la recogida de dicho rAd35.

Además se desvela un biorreactor con un volumen de trabajo de entre 2 l y 1.000 l que comprende: un medio de cultivo, las células productoras y al menos 1×10^{12} partículas víricas (PV)/ml de rAd35. El biorreactor puede tener un volumen de trabajo de entre 50 l y 500 l. El biorreactor puede estar conectado a un sistema de perfusión ATF.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Infección a alta densidad celular en agitadores con rAd5.

Figura 2. Infección a alta densidad celular en agitadores y un biorreactor de 2 l con rAd35.TB-S.

Figura 3. Infección a alta densidad celular en agitadores con rAd35.eGFP.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un nuevo proceso para la producción de grandes cantidades de un adenovirus 35 recombinante. Este proceso optimizado se basa en la capacidad de infectar cultivos a una alta densidad celular conservando una alta productividad de virus por célula. De este modo, ofrece un método para la obtención de una disolución de virus recogidos con una alta concentración de virus en un único biorreactor. Los rendimientos típicos de los procesos actuales para rAd35 son de aproximadamente $2-3 \times 10^{11}$ PV/ml. De hecho, se cree que pueden producirse cantidades muy elevadas de partículas de rAd35 mediante los procesos de la presente invención, por ejemplo, cantidades de al menos aproximadamente 5×10^{11} PV/ml, preferentemente de al menos aproximadamente $6, 7, 8$ o 9×10^{11} PV/ml. Preferentemente se producen al menos 1×10^{12} PV/ml de rAd35, con mayor preferencia al menos $1,5 \times 10^{12}$ PV/ml, aún con mayor preferencia al menos 2×10^{12} PV/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 1×10^{12} y 5×10^{10} PV/ml. Típicamente, el proceso no producirá más de aproximadamente 1×10^{13} PV/ml de rAd35. Los rendimientos que pueden obtenerse con los procesos de acuerdo con la presente invención son probablemente suficientes para preparar la cantidad deseada en el mundo de ciertas vacunas basadas en rAd35, sin necesidad de instalaciones de biorreactores con volúmenes de trabajo superiores a 1.000 l.

La invención proporciona un método para la producción de un adenovirus recombinante del serotipo 35 (rAd35) en que el método comprende: a) el cultivo de células PER.C6 en suspensión con un sistema de perfusión; b) la infección de dichas células a una densidad de al menos 10×10^6 células viables/ml con rAd35; c) el cultivo posterior de las células infectadas con un sistema de perfusión para la propagación de dicho rAd35; y d) la recogida de dicho rAd35.

Dichas células en la etapa b) se infectan con rAd35 a una densidad de entre aproximadamente 10×10^6 y 16×10^6 células viables/ml, por ejemplo, a aproximadamente $10, 11, 12, 13, 14$ o 15×10^6 células viables/ml.

Células productoras y adenovirus recombinante

Una célula productora (a veces denominada también en la técnica y en este documento como "célula de empaquetamiento", "célula de complementación" o "célula "hospedadora") puede ser cualquier célula productora en la que puede propagarse un adenovirus deseado. Por ejemplo, la propagación de los vectores de adenovirus recombinantes se lleva a cabo en células productoras que complementan las deficiencias del adenovirus. Tales células productoras tienen en su genoma al menos una secuencia E1 de adenovirus y por lo tanto son capaces de complementar adenovirus recombinantes con una delección en la región E1. Además, el adenovirus puede tener una delección en la región E3, que es prescindible en el genoma del Ad y que, por consiguiente, no ha de complementarse. Las células productoras que complementan E1 son células de retina humana inmortalizadas por E1, es decir, células PER.C6 (depósito 96022940 en la colección ECACC; véase la patente de los EE.UU. 5.994.128) o células derivadas de estas.

En este documento se demuestra que un adenovirus recombinante del serotipo 35 (rAd35) tiene propiedades ventajosas hasta ahora desconocidas en comparación con rAd5 en procesos que utilizan la infección a altas densidades celulares. Ahora sabemos también que otro serotipo más se comporta de manera diferente en procesos similares, lo que sugiere que las condiciones óptimas para la producción de adenovirus recombinantes a gran escala pueden tener que establecerse para los diferentes serotipos. Por consiguiente, en ciertas realizaciones preferidas, el adenovirus de la invención es rAd35.

Preferentemente, el vector adenovirico es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1, por ejemplo, la región E1a y/o la región E1b, del genoma adenovirico que se requiere para la replicación vírica. En ciertas realizaciones, el vector es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1 y al menos parte de la región no esencial E3. El vector adenovirico puede ser "deficiente múltiple", lo que significa que el vector adenovirico es deficiente en una o más funciones génicas esenciales en cada una de dos o más regiones del genoma adenovirico. Por ejemplo, los vectores adenoviricos anteriormente mencionados deficientes en E1 o deficientes en E1 y E3 pueden ser deficientes además en al menos un gen esencial de la región E4 y/o al menos un gen esencial de la región E2 (por ejemplo, la región E2A y/o la región E2B). Los vectores adenoviricos con la totalidad de la región E4 suprimida pueden provocar menores respuestas inmunitarias en el hospedador. Algunos ejemplos de vectores adenoviricos adecuados incluyen vectores adenoviricos que carecen de (a) toda o parte de la región E1 y toda o parte de la región E2, (b) toda o parte de la región E1, toda o parte de la región E2 y toda o parte de la región E3, (c) toda o parte de la región E1, toda o parte de la región E2, toda o parte de la región E3 y toda o parte de la región E4, (d) al menos parte de la región E1a, al menos parte de la región E1b, al menos parte de la región E2a y al menos parte de la región E3, (e) al menos parte de la región E1, al menos parte de la región E3 y al menos parte de la región E4 y (f) todos los productos génicos adenoviricos esenciales (por ejemplo, amplicones adenoviricos que comprenden solamente las secuencias ITR y la señal de empaquetamiento). Como es sabido para un experto en la técnica, en caso de delecciones de regiones esenciales del genoma del adenovirus, las funciones codificadas por esas regiones deben proporcionarse en *trans*, preferentemente por parte de la célula productora, es decir, cuando se suprime parte o la totalidad de las regiones E1, E2 y/o E4 del adenovirus, estas han de estar presentes en la célula productora, por ejemplo, integradas en el genoma, o en forma de los denominados adenovirus auxiliares o plásmidos auxiliares.

El vector adenovirico deficiente en replicación puede generarse con 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 el vector adenovirico con la capacidad de infectar ciertos tipos de células deseados.

De acuerdo con la presente invención, se usa rAd35.

En otras realizaciones adicionales, el adenovirus de la invención carece de al menos una porción de la región E1, por ejemplo, las secuencias codificantes E1A y/o E1B, y comprende además un ácido nucleico heterólogo. Los ácidos nucleicos heterólogos adecuados son bien conocidos por el experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, secuencias de lectura abierta transgénicas, por ejemplo, secuencias de lectura abierta codificantes de polipéptidos contra los que se desea una respuesta inmunitaria cuando el vector rAd se usa con la finalidad de una vacunación, por ejemplo, transgenes adecuados para generar una respuesta inmunitaria contra la malaria (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/055187), el VIH, la tuberculosis (véase, por ejemplo el documento WO 2006/053871), ciertos virus, etc., todos ellos bien conocidos por el experto en la técnica. De hecho, la naturaleza del ácido nucleico heterólogo no es crítica en la presente invención, puede ser cualquier ácido nucleico heterólogo y, por lo tanto, no necesita aquí de mayor elaboración.

El experto en la técnica será consciente de las posibilidades de propagar vectores adenoviricos de diferentes serotipos en células hospedadoras específicas mediante métodos tales como, por ejemplo, los desvelados en la patente de los EE.UU. 6.492.169 o en el documento WO 03/104467 y las referencias incluidas en estos documentos. Por ejemplo, para la propagación de rAd35 deficiente en E1, pueden construirse células productoras específicas que expresan E1B-55K de Ad35, por ejemplo a partir de células productoras existentes que expresan E1A y E1B de Ad5, tales como las células PER.C6 (véase, por ejemplo, el documento US 6.492.169), como es sabido por el experto en la técnica. Alternativa y preferentemente, pueden usarse líneas celulares de complementación (de Ad5) existentes, tales como PER.C6, sin modificación o las células para la propagación de rAd35 deficiente en E1, mediante la inclusión de la secuencia codificante E4-orf6 de Ad5 en el vector rAd35, según se describe ampliamente, por ejemplo, en el documento WO 03/104467. Por lo tanto, la propagación de los vectores adenoviricos de cualquier serotipo puede llevarse a cabo en las células productoras con el uso de los medios y métodos bien conocidos por el experto en la técnica. Los vectores adenoviricos, los métodos para la construcción de los mismos 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 Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication" y M. S. Horwitz, "Adenoviruses", capítulos 67 y 68, respectivamente, en Virology, B. N. Fields y col., eds., 3.^a ed., Raven Press, Ltd., Nueva York (1996), y en otras referencias mencionadas en las mismas.

La construcción de vectores adenoviricos es bien conocida en la técnica y supone el uso de técnicas estándar de

biología molecular, tales como las descritas, por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), Watson y col., Recombinant DNA, 2.^a ed., Scientific American Books (1992) y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995) y otras referencias mencionadas en las mismas.

5 Las células productoras se cultivan para aumentar el número de células y virus y/o el título del virus. El cultivo de una célula se lleva a cabo para permitirle metabolizar y/o crecer y/o dividirse y/o producir el virus de interés de acuerdo con el método de la invención. Esto puede realizarse mediante métodos como aquellos que son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluye, pero no se limita al suministro de nutrientes a la célula, por ejemplo, en el medio de cultivo apropiado. Pueden usarse diferentes medios de cultivo y la elección del medio de cultivo óptimo para las células y las condiciones usadas es parte de las tareas de rutina del experto en esta técnica. Los medios de cultivo adecuados para los fines de la presente invención son aquellos bien conocidos por el experto en la técnica y pueden obtenerse generalmente a partir de fuentes comerciales en grandes cantidades o prepararse a medida de acuerdo con protocolos estándar. El cultivo puede llevarse a cabo, por ejemplo, en placas, botellas rotatorias o en biorreactores, con el uso de sistemas de lotes, de lotes alimentados o continuos y similares. Con el fin de conseguir una producción a gran escala (continua) del virus a través de un cultivo celular, en la técnica se prefiere tener células capaces de crecer en suspensión y se prefiere tener células capaces de ser cultivadas en ausencia de suero derivado de animales o humanos o de componentes de suero derivados de animales o humanos. Las condiciones adecuadas para el cultivo de las células son conocidas (véase, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973) y R. I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, cuarta edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

Sistema de cultivo celular y sistema de perfusión

25 El uso de biorreactores para la producción a gran escala de productos biológicos a partir de cultivos de células animales en suspensión está muy extendido. De acuerdo con la invención, los biorreactores usados para la propagación de adenovirus pueden ser, por ejemplo, tanques agitados, biorreactores desechables, reactores aerobios y similares.

30 De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el biorreactor es un tanque agitado.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, el biorreactor tiene un volumen de trabajo de entre aproximadamente 2 l y 2.000 l, en que en este documento entre pretende incluir los valores límite superior e inferior desvelados, es decir, 2 l es el volumen de trabajo mínimo y 2.000 l es el volumen de trabajo máximo. Los biorreactores con un volumen de trabajo de cualquier valor individual entre estos valores estarán incluidos en la invención. El término "aproximadamente" para valores numéricos según se usa en la presente descripción indica el valor $\pm 10\%$. En ciertas realizaciones preferidas, el volumen de trabajo es de entre 10 l y 1.000 l, preferentemente entre 20 l y 800 l, por ejemplo, entre 30 l y 600 l, por ejemplo, entre 50 l y 500 l, por ejemplo, de aproximadamente 250 l o de aproximadamente 500 l. Una ventaja del uso de biorreactores con un volumen de trabajo de acuerdo con la invención es que se evita el uso de reactores de gran volumen, es decir, aquellos con un volumen de trabajo muy superior a 2.000 l, preferentemente 1.000 l, y de este modo no se requieren enormes inversiones de capital y tiempo para la construcción de un biorreactor de gran tamaño. Además, el producto, es decir, el rAd está mucho más concentrado cuando se hace uso de los métodos de la presente invención, lo que ahorra tiempo y costes en la recogida y/o el procesamiento posterior del rAd a partir de los biorreactores. El volumen de trabajo es el volumen efectivo del cultivo en el biorreactor. Generalmente, los tanques agitados tienen una relación entre altura y diámetro de 1:1 a 3:1. El cultivo se mezcla normalmente con uno o más agitadores, a base de discos de álabes o patrones de hélices marinas. Se han descrito sistemas de agitación que ofrecen menores fuerzas de cizallamiento que los álabes. La agitación puede accionarse directa o indirectamente por medio de accionamientos acoplados magnéticamente. Los accionamientos indirectos reducen el riesgo de contaminación microbiana a través de las juntas en los ejes de agitación. La instrumentación y los controles de dichos biorreactores incluyen (sin limitación): controles de agitación, temperatura, oxígeno disuelto, pH y biomasa. En principio, la agitación, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto del medio de cultivo no son críticos y dependen de célula elegido. Preferentemente, la agitación, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto se eligen de modo que sean óptimos para el crecimiento de las células. El experto en la técnica sabe cómo determinar la agitación, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto óptimos para el cultivo. Normalmente, la agitación óptima es de entre 50 y 300 rpm, por ejemplo, 100-250 rpm, el pH óptimo es de entre 6,7 y 7,7, la temperatura óptima de entre 30 y 39 °C, por ejemplo, 34, 35, 36, 37 o 38 °C.

La mayoría de los cultivos en suspensión a gran escala se operan como procesos por lotes o lotes alimentados, porque son más fáciles de operar y de aumentar su escala. Sin embargo, los procesos continuos basados en principios de perfusión están haciéndose más comunes. De acuerdo con la presente invención, las células productoras se cultivan en un sistema de perfusión. El cultivo de células con perfusión tiene su significado convencional en la técnica, es decir, significa que durante el cultivo, las células están retenidas por un dispositivo de separación en el que hay una salida de líquido con una menor densidad celular que antes de la separación y en el que hay una entrada de medio de cultivo celular. El uso del cultivo perfundido tiene lugar en respuesta a las dificultades de cultivar células a altas densidades (por ejemplo, $10\text{-}50 \times 10^6$ células viables/ml). Con el fin de

aumentar las densidades por encima de $2-4 \times 10^6$ células viables/ml, el medio se repone constante o intermitentemente con un aporte fresco con el fin de compensar las deficiencias nutricionales y eliminar los productos tóxicos. La perfusión también permite un control mucho mejor del entorno del cultivo (pH, dO_2 , niveles de nutrientes, etc.). La perfusión de medio fresco a través del cultivo puede lograrse mediante la retención de las células con una diversidad de dispositivos de separación (por ejemplo, un filtro de centrifugación de malla fina, filtros de membrana de fibras huecas o placas planas, tubos de sedimentación). En aspectos preferidos del proceso de la presente invención, el dispositivo de separación es un módulo de filtro que comprende fibras huecas.

Con el término "fibra hueca" se indica una membrana tubular. El diámetro interno del tubo es preferentemente de entre 0,3 y 6,0 mm, con mayor preferencia de entre 0,5 y 3,0 mm, con la máxima preferencia de entre 0,5 y 2,0 mm. En ciertos ejemplos, el tamaño de malla (tamaño de poro) de la membrana se elige de modo que el tamaño de los poros en la malla se aproxima al diámetro de las células, lo que asegura una alta retención de células, mientras los restos celulares pueden atravesar el filtro. En otros ejemplos, el tamaño de malla es significativamente menor que el diámetro de las células. Preferentemente, el tamaño de malla es de entre 0,1 y 30 μm , por ejemplo de entre 0,1 y 3 μm , por ejemplo, de aproximadamente 0,2 μm . Los módulos de filtro que comprenden fibras huecas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de General Electric (anteriormente Amersham). Durante el proceso de la presente invención no se observaron cantidades significativas de partículas adenovíricas en el medio de cultivo de salida, a pesar de que las partículas víricas son más pequeñas que el tamaño de malla utilizado.

La perfusión se usa con el fin de mantener los niveles deseados de ciertos metabolitos y para eliminar y con ello reducir las impurezas en el medio de cultivo. Las tasas de perfusión pueden medirse de diversas maneras, tales como en términos de volúmenes de reposición por unidad de tiempo o con respecto a los niveles de ciertos metabolitos que deben mantenerse durante los periodos de perfusión. Un caso típico es que la perfusión no se lleva a cabo en todo momento durante el cultivo y generalmente solo se lleva a cabo de vez en cuando durante el cultivo, según se desee. Por ejemplo, típicamente la perfusión no se inicia hasta que ciertos componentes del medio, tales como glucosa, comienzan a agotarse y necesitan reponerse.

Se conocen varios sistemas de perfusión en la técnica que, en principio, son adecuados para los métodos de la presente invención. Con el término "sistema de perfusión" se indica la combinación de un biorreactor conectado a un dispositivo de separación. El dispositivo de separación puede estar incorporado en el biorreactor (por ejemplo, un filtro de centrifugación de malla fina) o permanecer fuera del biorreactor (por ejemplo, fibras huecas). En los dos casos, según se explica anteriormente, el dispositivo de separación previene el lavado de la masa celular fuera del reactor y permite la reposición del medio.

Los presentes inventores llevaron a cabo experimentos piloto con varios sistemas de perfusión, entre los que el sistema de perfusión de flujo tangencial alterno (ATF) dio los mejores resultados. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, los biorreactores se operan con (conectados a) un sistema de perfusión ATF (por ejemplo, ATF System, Refine Technology, Co., East Hanover, NJ, EE.UU.). El sistema consta de una bomba de diafragma montada en un extremo de un alojamiento para fibras huecas. El otro extremo del alojamiento está unido a un ensamblaje de unión que, a su vez, está conectado a un biorreactor a través de un puerto disponible. La bomba de diafragma y el sistema de control sirven para generar un flujo tangencial alterno a través de las fibras huecas. Esto significa que hay un flujo en la misma dirección que (es decir, tangencial a) las superficies de membrana de las fibras huecas, en que dicho flujo va y viene, y que hay otro flujo en una dirección sustancialmente perpendicular a dicha superficie de filtro. El flujo tangencial puede conseguirse de acuerdo con los métodos conocidos por el experto en la técnica y es según se describe, por ejemplo, en el documento US 6.544.424.

La operación del sistema de perfusión ATF ha sido descrita (Furey, 2002). Los sistemas ATF permiten el cultivo de las células durante un periodo de tiempo más largo y alcanzar mayores densidades celulares sin bloqueo del filtro. De hecho, es posible obtener densidades celulares extremadamente altas de más de 100×10^6 células viables/ml con el uso de un sistema de perfusión ATF, por ejemplo, con células PER.C6 (véase, por ejemplo, Yallop y col.). Sin embargo, en publicaciones anteriores, las células PER.C6 en sistemas de perfusión se usaron para fines totalmente diferentes y no se infectaron con adenovirus.

Una ventaja adicional del sistema ATF es que el sistema genera una baja fuerza de cizallamiento. Se añade energía a la superficie del líquido, lo que genera un flujo laminar de bajo cizallamiento. Esto puede ser una ventaja, especialmente para la presente invención en que las células se infectan con adenovirus. Durante los procesos de perfusión, con el sistema ATF no se observaron pérdidas de la densidad celular ni una pérdida prematura de células después de la infección, sino que más bien se observó un crecimiento celular. Dado que las células permanecen intactas, se crean las condiciones óptimas para la propagación del virus.

Por lo tanto, la perfusión con el sistema ATF es ventajosa durante la fase de precultivo (etapa a de acuerdo con la presente invención), dado que permite la obtención de densidades celulares muy altas y las células están en buenas condiciones para su posterior infección con adenovirus, lo que posiblemente contribuye a los altos rendimientos obtenidos. Con el fin de obtener dichas altas densidades celulares, en ciertas realizaciones el medio de cultivo se perfunde al menos parcialmente durante una porción del tiempo durante el crecimiento celular de las células productoras (etapa a). En ciertas realizaciones, la perfusión se inicia una vez que se ha alcanzado una densidad

celular de entre aproximadamente 2×10^6 células viables/ml y 8×10^6 células viables/ml.

Además, la perfusión con el sistema ATF es ventajosa después de la etapa de infección (etapa c de acuerdo con la presente invención), ya que permite obtener rendimientos muy elevados de adenovirus a partir de las células infectadas. Por lo tanto, en ejemplos preferidos, tanto la etapa de precultivo como la etapa posterior a la infección de los procesos de la invención emplean un sistema de perfusión ATF. El volumen del medio de cultivo usado durante el ATF puede variarse de acuerdo con las necesidades de las células, como puede establecer y ajustar fácilmente el experto en la técnica, y varía típicamente entre 0,5 y 5 volúmenes de recipiente/día (vol/d), por ejemplo, entre 1 y 3 vol/d, por ejemplo, aproximadamente 2 vol/día. En ciertos ejemplos ventajosos, la tasa de reposición es de entre aproximadamente 1 y 2 vol/d, ya que los inventores han demostrado en este documento que da muy buenos resultados en términos de rendimiento y calidad del rAd35 obtenido, a la vez que el consumo de medio y, con ello, los costes asociados con el mismo son aún razonables.

Por último, el sistema de perfusión ATF es un sistema cuya escala puede aumentarse. Hay unidades ATF disponibles de tamaños diferentes. Dado que se usa un flujo de aire para dirigir el cultivo a través de la membrana de fibras huecas, pueden generarse tasas muy rápidas de flujo tangencial de bajo cizallamiento, lo que permite el uso de la tecnología desde una escala I+D hasta una escala de producción de hasta 1.000 l (Furey, 2002). Posiblemente, otros desarrollos adicionales permitirán aumentos de escala aún mayores del sistema de perfusión ATF.

En la publicación de Yuk y col., se produce rAd5 con el uso de una línea de células tumorales y en este caso el proceso completo se realiza en un único biorreactor y requiere aproximadamente 8-10 días en un biorreactor de producción. En ciertas realizaciones de la presente invención se usan dos biorreactores diferentes, uno para el precultivo (etapa a; biorreactor de precultivo) y uno para la infección (etapa b) y el cultivo después de la infección (etapa c; biorreactor de producción) de las células. Una ventaja del uso de dos biorreactores independientes para estas etapas es que solo se requieren aproximadamente 1,5-5, típicamente aproximadamente 2-3 días de cultivo en el biorreactor de producción y, por lo tanto, pueden llevarse a cabo muchas más series de producción al año. Además, la adición de una gran cantidad de medio de cultivo fresco durante la infección es ventajosa porque reduce el volumen de medio de cultivo requerido durante la perfusión en el biorreactor de producción. En realizaciones alternativas también es posible llevar a cabo todas las etapas a-c de la invención en un único biorreactor.

Infección

En los métodos de la invención, las células productoras se infectan con un adenovirus recombinante. Típicamente, la célula productora apropiada se expone al virus en las condiciones óptimas para permitir la absorción de dicho virus. Las condiciones óptimas dependen del tipo de célula y del tipo de adenovirus elegidos. El experto en la técnica sabe cómo determinar las condiciones óptimas, es decir, de agitación, pH, temperatura, oxígeno disuelto (dO_2 o DO) y multiplicidad de infección (MDI). Normalmente, la agitación óptima es de entre aproximadamente 50 y 300 rpm, típicamente de aproximadamente 100-200, por ejemplo, de aproximadamente 150 rpm; una DO típica es del 20-60 %, por ejemplo, del 40 %; el pH óptimo es de entre 6,7 y 7,7; la temperatura óptima es de entre 30 y 39 °C, por ejemplo, de 34-37 °C; y la MDI óptima es de entre 5 y 1.000, por ejemplo, de aproximadamente 50-300. Típicamente, los adenovirus infectan a las células productoras espontáneamente y es suficiente poner a dichas células productoras en contacto con partículas de rAd para la infección de las mismas. Generalmente, se añade al cultivo un inóculo de adenovirus para iniciar la infección y, a continuación, el adenovirus se propaga en las células productoras. Todo ello es cuestión de rutina para el experto en la técnica.

En una cierta realización de la presente descripción, la perfusión se interrumpe antes de la infección y se reanuda después de entre una y 20 horas, por ejemplo, 3-15 horas, por ejemplo cinco horas después de la infección. Esta demora deberá permitir a las partículas víricas la entrada en las células y evitar el arrastre de las partículas víricas fuera del sistema. Las tasas de perfusión después de la infección se definen en términos del nivel de glucosa que se mantiene por medio de la perfusión. Por ejemplo, la concentración de glucosa en el medio se mantiene normalmente entre aproximadamente 2 mmol/l y 20 mmol/l, típicamente entre aproximadamente 5 y 10 mmol/l.

Ventajosamente, fue posible infectar un biorreactor con rAd35 a altas densidades celulares, es decir, superiores a 10×10^6 células viables/ml, conservando a la vez una alta productividad de virus por célula. En ciertos ejemplos, la productividad específica se mantiene entre aproximadamente $0,5 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^5$ PV/célula.

Además, en la presente descripción, la viabilidad del cultivo celular antes de la infección se mantiene superior al 75 %. Lo que significa que al menos el 75 % de la cantidad total de células en el cultivo es viable en el momento de la infección. En ciertos aspectos, la viabilidad del cultivo celular en el momento de infección es al menos del 80 %, en otras realizaciones al menos del 85 %. La viabilidad puede medirse mediante métodos rutinarios a disposición del experto en la técnica, por ejemplo, la exclusión de azul de tripano, el recuento de células Casy y similares.

La densidad celular en el momento de infección es de entre aproximadamente 10×10^6 y 16×10^6 células viables/ml, por ejemplo, de entre aproximadamente 10×10^6 y 15×10^6 células viables/ml, por ejemplo, de entre aproximadamente 10×10^6 y 14×10^6 células viables/ml, por ejemplo, de aproximadamente $12-13 \times 10^6$ células

viabiles/ml. Estas densidades celulares permiten una alta productividad de virus con acumulación limitada de restos celulares y de ADN de las células hospedadoras, lo que da una ventaja a estas realizaciones en el procesamiento posterior del adenovirus recogido. Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso optimizado para la producción de rAd35 que produce un gran número de partículas de rAd35 de buena calidad, a la vez que proporciona un material recogido que aún es manejable con fines de procesamiento posterior.

Según se demuestra por primera vez en esta descripción, a diferencia de la infección con rAd5 a altas densidades celulares (superiores a 10×10^6 células viables/ml), la infección con rAd35 a densidades superiores a 10×10^6 células viables/ml aún aumentó la productividad volumétrica de rAd35 con densidades celulares crecientes de hasta al menos 30×10^6 células viables/ml en el momento de infección, usando células productoras en suspensión con un sistema de perfusión.

En un ejemplo preferido de la descripción se proporciona un método para la producción de al menos 1×10^{12} partículas víricas (PV)/ml de rAd35.

Los procesos permiten la recuperación de rAd35 con una relación entre partículas físicas y partículas infectivas inferior a 30:1, la cual es un parámetro importante para los adenovirus que han de administrarse a humanos. Esto puede medirse como una relación entre partículas víricas (PV) y unidades infecciosas (UI), por ejemplo, mediante un ensayo QPA (Wang y col., 2005). Una relación inferior es ventajosa, ya que en tal caso han de administrarse menos partículas víricas para infectar el mismo número de células. Las regulaciones actuales de la FDA requieren una relación PV/UI inferior a 30:1 y, por consiguiente, los procesos de la invención descritos en este documento son adecuados para preparar grandes cantidades de rAd35 que cumplen este requisito concreto. Los autores de Yuk y col. (2004) describieron números absolutos de partículas víricas inferiores a los desvelados en este documento y además, la relación PV/UI de las muestras desveladas en Yuk y col. (2004) es de aproximadamente 100 (Figura 2A/2B en Yuk y col., 2004). En contraste, nosotros describimos mayores rendimientos absolutos y además relaciones PV/UI significativamente mejores, inferiores a 20:1. Por consiguiente, en ciertos aspectos preferidos, los procesos de la invención proporcionan lotes de rAd35 con una relación PV/UI inferior a 20:1, por ejemplo de entre aproximadamente 20:1 y aproximadamente 5:1.

Métodos para la recogida y la lisis de las células

Después de la infección de un adenovirus, el virus se replica dentro de la célula y de este modo se amplifica. La infección de adenovirus resulta finalmente en la lisis de las células infectadas. Por consiguiente, las características líticas de adenovirus hacen posibles dos modos diferentes de producción del virus. El primer modo es la recogida del virus antes de la lisis celular, con el empleo de factores externos para la lisis de las células. El segundo modo es la recogida del sobrenadante con el virus después de la lisis (prácticamente) total de las células por el virus producido (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.485.958, que describe la recogida de adenovirus sin lisis de las células hospedadoras por un factor externo). Para este último modo se requieren mayores tiempos de incubación con el fin de conseguir la lisis total de las células y, por lo tanto, altos rendimientos de virus. Además, el vertido gradual al medio del contenido de las células hospedadoras puede ser perjudicial para la integridad y rendimiento de los virus obtenidos. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se prefiere emplear factores externos para lisar activamente las células para recoger el adenovirus.

Los métodos que pueden usarse para la lisis activa de las células son conocidos por el experto en la técnica y se han expuesto, por ejemplo, en el documento WO 98/22588, págs. 28-35. Algunos métodos útiles a este respecto son, por ejemplo, congelación-descongelación, cizallamiento en sólido, lisis hipertónica y/o hipotónica, cizallamiento en líquido, ultrasonidos, extrusión a alta presión, lisis con detergentes, combinaciones de los anteriores y similares. En un aspecto 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 su modo de empleo 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 detergentes aniónicos, catiónicos, dipolares y no iónicos. Está claro para el experto en la técnica que la concentración del detergente puede variar, por ejemplo, dentro del intervalo de aproximadamente el 0,1 % al 5 % (p/p). En una realización, el detergente usado es Triton X-100.

Para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes, es decir, fundamentalmente de las células productoras, pueden emplearse nucleasas. Las nucleasas ejemplares adecuadas para uso en la presente invención incluyen Benzonase®, Pulmozyme® o cualquier otra ADNasa y/o ARNasa usadas comúnmente en la técnica. En realizaciones preferidas la nucleasa es Benzonase®, que hidroliza rápidamente los ácidos nucleicos por hidrólisis de los enlaces fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos, lo que reduce la viscosidad del lisado celular. Benzonase® puede obtenerse comercialmente de Merck KGaA (código W214950). La concentración en la que se emplea la nucleasa está preferentemente en el intervalo de 1-100 unidades/ml.

Los métodos para la recogida de adenovirus a partir de los cultivos de células productoras se han desvelado extensamente en el documento WO 2005/080556.

De acuerdo con la presente descripción, el momento de recogida es entre aproximadamente 24 y 120 horas después de la infección, por ejemplo, entre aproximadamente 48 y 96 horas después de la infección, por ejemplo, 72 horas después de la infección.

- 5 Métodos de purificación
- En ciertas realizaciones, el adenovirus recogido se purifica adicionalmente. La purificación del adenovirus puede realizarse en varias etapas que comprenden clarificación, ultrafiltración, diafiltración o separación por cromatografía según se describe, por ejemplo, en el documento WO 05/080556. La clarificación puede llevarse a cabo mediante una etapa de filtración que elimina los restos celulares y otras impurezas del lisado celular. La ultrafiltración se usa para concentrar la disolución del virus. La diafiltración o intercambio de tampón mediante el uso de ultrafiltros es una manera de eliminar e intercambiar sales, azúcares y similares. 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 vectores adenovíricos. Los métodos comprenden el crecimiento de células hospedadoras, la infección de las células hospedadoras con adenovirus, la recogida y la lisis de las células hospedadoras, la concentración del lisado crudo, el intercambio del tampón del lisado crudo, el tratamiento del lisado con nucleasa y la purificación adicional del virus mediante cromatografía.
- 10 La purificación puede conseguirse, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad, según se expone, por ejemplo, en el documento WO 98/22588, págs. 59-61.
- 15 Sin embargo, preferentemente la purificación emplea al menos una etapa de cromatografía, según se expone, por ejemplo, en el documento WO 98/22588, págs. 61-70. Se han descrito muchos procesos para la purificación adicional de los adenovirus, en que en dichos procesos se incluyen etapas de cromatografía. El experto en la técnica será consciente de estos procesos y puede variar la manera exacta de empleo de las etapas cromatográficas para optimizar el proceso.
- 20 Por ejemplo, es posible purificar los adenovirus mediante etapas de cromatografía de intercambio aniónico, véase, por ejemplo, el documento WO 05/080556. Para la purificación de adenovirus se prefiere usar al menos una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, el virus puede tener la pureza suficiente. Sin embargo, en ciertas realizaciones se lleva a cabo además una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño para aumentar la consistencia del proceso. Esta etapa puede ser anterior o posterior a la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Obviamente, también pueden combinarse adecuadamente otras etapas de purificación con una etapa de cromatografía de intercambio aniónico.
- 25 El uso de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de adenovirus de ha descrito extensamente y, por lo tanto, este aspecto está claramente al alcance del experto en la técnica. Para la purificación de adenovirus se han empleado y están disponibles muchas matrices cromatográficas diferentes y el experto en la técnica puede determinar fácilmente el material de intercambio aniónico óptimo para la purificación del virus, por ejemplo, guiado por la técnica siguiente.
- 30 La patente de los EE.UU. 5.837.520 (véase también Huyghe y col., 1995, Human Gene Therapy 6: 1403-1416) describe un método para la purificación de adenovirus en el que el lisado de las células hospedadoras se trata con una nucleasa, con cromatografía de intercambio aniónico y de afinidad de iones metálicos a continuación.
- 35 La patente de los EE.UU. 6.485.958 describe el uso de una cromatografía de intercambio aniónico fuerte para la purificación de adenovirus recombinantes.
- 40 Se ha empleado una cromatografía de intercambio aniónico con columnas de lecho fluidizado para la purificación de partículas de adenovirus, véase el documento WO 00/50573. Además, en la patente de los EE.UU. 6.586.226 se ha descrito la cromatografía de intercambio aniónico de lecho expandido y ciertas resinas cromatográficas para cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de partículas de adenovirus.
- 45 Además de las columnas de intercambio aniónico, son adecuados productos para cromatografía de membrana de intercambio aniónico, tales como los producidos por Pall (por ejemplo, la serie MustangTM) y Sartorius (por ejemplo, la serie Sartobind). Para el uso de estos filtros y de sus ventajas en la purificación de adenovirus, véanse, por ejemplo, los documentos WO 03/078592 y WO 2005/080556.
- 50 La patente de los EE.UU. 6.537.793 describe la purificación de partículas adenovíricas a partir de las células hospedadoras mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico y expone especialmente una preferencia por los tipos XL de Q Sepharose como soporte cromatográfico para este fin. En una realización de la presente invención, se purifica adicionalmente un adenovirus mediante una columna de Q Sepharose XL.
- 55 El proceso de purificación puede emplear también adecuadamente una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño.

La solicitud internacional WO 97/08298 describe la purificación de adenovirus con el uso de ciertas matrices cromatográficas para evitar el daño de los virus, incluidas etapas de intercambio aniónico y exclusión por tamaño. La patente de los EE.UU. 6.261.823 describe un método para la purificación de adenovirus, en que la preparación de adenovirus se somete a cromatografía de intercambio aniónico y a continuación a cromatografía de exclusión por tamaño. En la etapa de exclusión por tamaño se consigue una separación en grupo de las partículas víricas de las impurezas de bajo peso molecular.

También es posible emplear un medio de hidroxiapatito para la purificación de adenovirus, véase el documento WO 02/44348.

Además podría usarse una etapa de adsorción en fase inversa, según se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/097797, pág. 26.

La solicitud internacional WO 97/08298 describe la purificación de adenovirus con el uso de ciertas matrices cromatográficas para evitar el daño de los virus, incluidas etapas de intercambio aniónico y exclusión por tamaño.

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

Preparar una preparación farmacéutica

En ciertos ejemplos, el adenovirus purificado se formula para obtener una composición farmacéutica. Esto puede hacerse de acuerdo con una diversidad de métodos y usando una diversidad de tampones, todo ello de acuerdo con métodos rutinarios bien conocidos por el experto en la técnica. En general, ello supone incorporar las partículas de adenovirus en una composición farmacéuticamente aceptable que comprenda el adenovirus y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición tal puede prepararse en las condiciones conocidas por el experto en la técnica y en ciertas realizaciones es adecuada para su administración a humanos.

Por ejemplo, el adenovirus puede cambiarse de tampón durante una separación en grupo y finalmente almacenarse en el tampón que también se usa para el estándar mundial de adenovirus (Hoganson y col., Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing, marzo de 2002, págs. 43-48): Tris 20 mM pH 8, NaCl 25 mM, glicerol al 2,5 %.

Obviamente, pueden usarse muchos otros tampones y varios ejemplos de formulaciones adecuadas para el almacenamiento y la administración farmacéutica de preparaciones de (adeno)virus purificados pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente europea n° 0853660 y en las solicitudes de patente internacional WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763.

En ciertos aspectos, los vectores adenovíricos se usan como vacunas y estas se mantienen típicamente en vehículos o excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y su uso está muy extendido en una amplia gama de productos terapéuticos. Preferentemente, se utilizan vehículos que funcionan bien en vacunas. Con mayor preferencia, las vacunas comprenden además un adyuvante. En la técnica se sabe que los adyuvantes aumentan adicionalmente la respuesta inmunitaria a un determinante antigénico administrado y algunas composiciones farmacéuticas que comprenden adenovirus y fosfato de aluminio como adyuvante se desvelan, por ejemplo, en el documento WO 2007/110409.

Para su administración a humanos, el rAd35 obtenido de acuerdo con la invención puede emplearse en composiciones farmacéuticas que comprenden el rAd y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo o excipiente, en las dosis y concentraciones empleadas, no causará ningún efecto indeseado o nocivo en los sujetos a los que se administra. Tales vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, eds., Taylor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3.^a edición, A. Kibbe, ed., Pharmaceutical Press [2000]). Preferentemente el rAd purificado se formula y administra como disolución estéril, aunque también pueden usarse preparaciones liofilizadas. Las disoluciones estériles se preparan por filtración estéril o por otros métodos conocidos de por sí en la técnica. Después, las disoluciones se liofilizan o se introducen en recipientes de dosificación farmacéutica. El pH de la disolución está generalmente en el intervalo de pH 3,0 a 9,5, por ejemplo, un pH de 5,0 a 7,5. Típicamente, el rAd está en una disolución con un tampón farmacéuticamente aceptable adecuado y la disolución del rAd también puede contener una sal. Opcionalmente, puede haber presente un agente estabilizante, tal como albúmina. Puede añadirse un detergente. El rAd puede formularse para obtener una preparación inyectable. Estas formulaciones contienen cantidades eficaces del rAd y son disoluciones líquidas estériles, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas y opcionalmente contienen estabilizantes o excipientes.

La presente invención desvela métodos para la producción de vectores adenovíricos, es decir, rAd35, con rendimientos muy elevados, y hasta donde alcanza nuestro conocimiento, los rendimientos obtenidos y desvelados en este documento no se han descrito anteriormente. En los procesos de la invención se usan biorreactores. El biorreactor con el gran número de partículas adenovíricas por volumen es un producto (intermedio) directo de dicho proceso. Se describe un biorreactor con un volumen de trabajo de entre 2 l y 2.000 l, preferentemente de entre 10 l y 1.000 l, que comprende: el medio de cultivo, las células productoras y al menos 1×10^{12} partículas víricas (PV)/ml de rAd35. El medio de cultivo puede ser cualquier medio de cultivo adecuado para la propagación de las células y la infección con adenovirus, según se describe anteriormente. Los aspectos del volumen del biorreactor, las células productoras y el número de partículas de rAd35 y la relación PV/UI se describen anteriormente para los métodos de la invención. En aspectos preferidos, el biorreactor está conectado a un sistema de perfusión ATF.

En otro aspecto más, se proporciona un método para la producción de al menos 1×10^{12} partículas víricas (PV)/ml de rAd35, en que el método comprende: a) el cultivo de células PER.C6 en suspensión con un sistema de perfusión; b) la infección de dichas células a una densidad de entre 10×10^6 células viables/ml y 16×10^6 células viables/ml con rAd35; c) el cultivo posterior de las células infectadas con un sistema de perfusión para la propagación de dicho rAd35, en que la concentración de partículas víricas de rAd35 alcanza al menos 1×10^{12} PV/ml; y d) la recogida de dicho rAd35. Anteriormente a la presente descripción, se desconocía si tales altos rendimientos de rAd35 eran factibles en absoluto y mucho menos cómo alcanzar tales altos rendimientos. La presente invención desvela que estos rendimientos son posibles de acuerdo con los métodos desvelados en este documento. Preferentemente, la relación entre partículas físicas y partículas infecciosas del rAd35 recogido es inferior a 30:1. Otras realizaciones ventajosas son según se describen para los métodos de acuerdo con la invención según se describe anteriormente.

La invención se explica adicionalmente en los ejemplos siguientes. Los ejemplos sirven para clarificar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 (ejemplo comparativo): infección a altas densidades celulares con un vector de Ad5.

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 2 l con un volumen de 1,5 l y una densidad celular de $0,2$ a $0,5 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se propagaron en el biorreactor a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. El proceso de perfusión ATF se inició a una densidad celular de $4,7 \times 10^6$ células totales/ml. El sistema ATF fue de Refine Technology, Co., East Hanover, NJ, EE.UU. Después de 89 horas, se alcanzó una densidad celular de $12,4 \times 10^6$ células totales/ml. En este momento se recogió una parte de las células y dichas células se centrifugaron durante cinco minutos a 300 g. El sedimento de células se resuspendió a las concentraciones siguientes en medio sin suero:

- $1,3 \times 10^6$ células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml
- 10×10^6 células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml
- 20×10^6 células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml
- 30×10^6 células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

Los agitadores se infectaron con Ad5.CS (un vector de rAd5; Shott y col., 2008) a una MDI de 90 PV/célula y se incubaron a 36 °C, CO₂ al 10 % y 100 rpm. Los días 1 y 2 después de la infección se llevó a cabo una reposición del medio en los agitadores infectados a 10 , 20 y 30×10^6 células viables/ml. Esta reposición de medio se llevó a cabo mediante una etapa de centrifugación durante cinco minutos a 300 g y la resuspensión del sedimento de células en 30 ml de medio fresco por agitador. El día 3 después de la infección se efectuó la recogida de células de los agitadores y se tomaron muestras para análisis por HPLC de intercambio aniónico (AEX-HPLC). La lisis de las células recogidas se realizó mezclando un volumen de muestra de 1 ml de cada agitador con 100 µl de Triton X-100 al 10 % e incubación a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, las muestras se mezclaron con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron por debajo de -65 °C hasta llevar a cabo su análisis por AEX-HPLC para determinar el número de partículas víricas producidas (PV/ml). Los resultados se presentan en la figura 1.

El rendimiento volumétrico de una infección a una densidad celular de 10×10^6 células viables/ml fue diez veces mayor que a 1×10^6 células/ml. En cierto modo, esto fue inesperado, dado el efecto de la densidad celular descrito en publicaciones anteriores a densidades muy inferiores (es decir, de aproximadamente $0,5$ - 3×10^6 células/ml, por ejemplo, Maranga y col., 2005; Kamen y col., 2004; Altaras y col., 2005). Sin embargo, a partir de 10×10^6 células/ml se observó un efecto de la densidad celular y los rendimientos volumétricos disminuyeron.

Por lo tanto, con un Ad5 recombinante se observa un efecto de la densidad celular en el sistema de perfusión.

Ejemplo 2 (ejemplo comparativo): infección con rAd35 a bajas densidades celulares ($1-1,6 \times 10^6$ células viables/ml).

5 En el ejemplo 1 se usó rAd5. Sin embargo, se conocen diferentes serotipos de adenovirus que han sido descritos con distintos fines. Estos serotipos pueden tener propiedades diferentes y, por lo tanto, los procesos útiles para un serotipo no siempre son necesariamente adecuados para otro serotipo. Esto puede ser especialmente relevante en los procesos a escala industrial, en los que diferencias pequeñas en apariencia pueden tener gran importancia económica. Un serotipo especialmente ventajoso para uso, por ejemplo, en vacunas, es Ad35 y en los ejemplos
10 siguientes analizamos la posibilidad de mejora de los rendimientos de un rAd35 para obtener grandes cantidades del mismo. Este ejemplo muestra la infección con un vector de rAd35 a bajas densidades celulares como comparación con los ejemplos siguientes en los que las células se infectan a mayores densidades celulares.

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio
15 de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular biorreactores de 10 l con un volumen de 5 l y una densidad celular de 0,2 a $0,35 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se propagaron en el biorreactor a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. Cuatro días después de la inoculación (habiendo alcanzado una densidad celular de entre 2 y $3,5 \times 10^6$ células viables/ml), la suspensión celular se diluyó con 5 l de medio fresco y se infectó
20 a continuación con rAd35.TB-S (un vector de rAd35; Radošević y col., 2007) a una MDI de 70 PV/célula. La propagación del virus se llevó a cabo a 36 °C, pH 7,3 y una DO del 40 %. Tres días después de la infección se tomaron muestras de los biorreactores para el recuento de células y la determinación de la producción de virus. Para liberar el virus, una muestra de 1 ml de cada biorreactor se mezcló con 100 µl de Triton X-100 al 10 % y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, las muestras se mezclaron con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a
25 lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron a una temperatura por debajo de -65 °C hasta su análisis por AEX-HPLC. Se llevaron a cabo un total de diez series de producción en el biorreactor que se analizaron de acuerdo con el proceso descrito anteriormente y estas series de producción dieron resultados consistentes (no se muestra). La producción media de partículas víricas
30 fue de $2,3 \times 10^{11}$ PV/ml.

Para una demanda anual de aproximadamente $1,5 \times 10^{19}$ PV, con este rendimiento tendrían que procesarse aproximadamente 65.000 l. Esto requeriría grandes instalaciones y, por lo tanto, una gran inversión inicial durante el desarrollo de las vacunas.

35 Ejemplo 3: estudio de la factibilidad de un proceso de infección de rAd35 a altas densidades celulares ($>10 \times 10^6$ células viables/ml).

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio
40 de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 2 l con un volumen de 1,5 l y una densidad celular de 0,2 a $0,5 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se propagaron en el biorreactor a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. La perfusión de medio se inició a una densidad celular de $6,8 \times 10^6$ células
45 totales/ml con un sistema ATF. Después de 70 horas se alcanzó una densidad celular de $36,8 \times 10^6$ células totales/ml. En este momento se llevaron a cabo las infecciones siguientes:

• Infección en agitadores a densidades celulares de:

50 - $1,3 \times 10^6$ células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

- 10×10^6 células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

- 20×10^6 células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

55 - 30×10^6 células viables/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

• Infección a la escala de un biorreactor de 2 l, a $8,7 \times 10^6$ células totales/ml (viabilidad del 84 %)

60 - Una hora después de la infección del biorreactor se extrajo una muestra de dicho biorreactor y se transfirió a dos agitadores de 250 ml, 30 ml/agitador

Para el proceso de infección en agitadores de 250 ml, se recogió una parte de la suspensión celular del biorreactor de 2 l y esta suspensión se centrifugó durante cinco minutos a 300 g. El sedimento de células se resuspendió a las concentraciones mencionadas anteriormente en medio fresco sin suero. Los agitadores se infectaron con Ad35.TB-S a una MDI de 70 PV/célula y se incubaron a 36 °C, con CO₂ al 10 % y 100 rpm. Los días 1 y 2 después de la
65 infección se llevó a cabo una reposición del medio en los agitadores infectados a 10, 20 y 30×10^6 células

viabiles/ml. Esta reposición de medio se llevó a cabo mediante una etapa de centrifugación durante cinco minutos a 300 g y la resuspensión del sedimento de células en 30 ml de medio fresco por agitador. El día 3 después de la infección se efectuó la recogida de células de los agitadores y se tomaron muestras para análisis por AEX-HPLC. La lisis de las células recogidas se realizó mezclando un volumen de muestra de 1 ml de cada agitador con 100 µl de Triton X-100 al 10 % e incubación a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, las muestras se mezclaron con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron por debajo de -65 °C hasta llevar a cabo su análisis por AEX-HPLC.

Las células restantes en el biorreactor de 2 l se diluyeron con medio fresco sin suero hasta una concentración celular de $8,7 \times 10^6$ células totales/ml (viabilidad del 84 %). El biorreactor se infectó con Ad35.TB-S a una MDI de 70 PV/célula y se incubó a 36 °C, pH 7,3 y una DO del 40 %. El sistema ATF se inició 15 horas después de la infección con una tasa de reposición del medio de un volumen de biorreactor por día. Los días 1, 2, 3 y 4 después de la infección se tomaron muestras del biorreactor para el recuento celular (contador de células CASY) y la determinación de la producción de virus mediante AEX-HPLC. La preparación de las muestras se llevó a cabo según se describe anteriormente. Las muestras se almacenaron por debajo de -65 °C hasta llevar a cabo su análisis por AEX-HPLC. Aproximadamente una hora después de la infección del biorreactor, se tomó una muestra de al menos 60 ml del biorreactor de 2 l y se iniciaron dos infecciones (en agitadores de 250 ml) con un volumen de 30 ml por agitador. Los días 1 y 2 después de la infección se efectuó una reposición del medio para mimetizar el sistema de perfusión. Esta reposición de medio se llevó a cabo mediante una etapa de centrifugación durante cinco minutos a 300 g y la resuspensión del sedimento de células en 30 ml de medio fresco por agitador. El día 3 después de la infección se efectuó la recogida de células de los agitadores y se tomaron muestras para análisis por AEX-HPLC. La preparación de las muestras se realizó según se describe anteriormente. Las muestras se almacenaron por debajo de -65 °C hasta llevar a cabo su análisis por AEX-HPLC.

Los resultados se presentan en la figura 2. Los resultados demuestran que la infección entre $1,3 \times 10^6$ células viabiles/ml y 30×10^6 células viabiles/ml es posible. A diferencia de los resultados con rAd5, los rendimientos totales de rAd35 aumentaron al aumentar la densidad celular en el momento de infección incluso por encima de las muestras de 10×10^6 células viabiles/ml. A 30×10^6 células viabiles/ml se alcanzó un rendimiento volumétrico de $1,4 \times 10^{12}$ PV/ml.

Los resultados indican claramente que las infecciones con Ad35.TB-S a altas densidades celulares, es decir, de 10×10^6 o superiores, son posibles. Las infecciones produjeron altos rendimientos volumétricos incluso a 30×10^6 células viabiles/ml.

Se señala que se observa una disminución de la productividad unitaria desde 120.000 PV/célula a $1,3 \times 10^6$ células hasta 47.000 PV/célula a 30×10^6 células viabiles/ml. Los agitadores iniciados a partir de una suspensión celular que se había infectado en el biorreactor muestran un rendimiento de recogida de $8,0 \times 10^{11}$ PV/ml y una productividad unitaria de 92.000 PV/célula. Los resultados en el biorreactor de 2 l son algo inferiores: se alcanza un rendimiento de recogida de 5×10^{11} PV/ml, lo cual es una productividad unitaria de 57.000 PV/célula.

Ejemplo 4: factibilidad de la infección a altas densidades celulares con otro vector de rAd35.

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 2 l con un volumen de 1,5 l y una densidad celular de 0,2 a $0,5 \times 10^6$ células viabiles/ml. Las células se propagaron en el biorreactor a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. El proceso de perfusión ATF se inició a una densidad celular de $5,1 \times 10^6$ células totales/ml. Después de 70 horas se alcanzó una densidad celular de 25×10^6 células totales/ml. En este momento se recogió una parte de las células. Las células se centrifugaron durante cinco minutos a 300 g y el sedimento de células se resuspendió a las concentraciones siguientes en medio fresco sin suero:

- $1,3 \times 10^6$ células viabiles/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

- 10×10^6 células viabiles/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

- 20×10^6 células viabiles/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

- 30×10^6 células viabiles/ml, 30 ml/agitador, dos agitadores de 250 ml

Los agitadores se infectaron con Ad35.eGFP (un rAd35 que contiene otro transgén, es decir un gen GFP) a una MDI de 70 PV/célula y se incubaron a 36 °C, CO₂ al 10 % y 100 rpm. Los días 1 y 2 después de la infección se llevó a cabo una reposición del medio en los agitadores infectados a 10 , 20 y 30×10^6 células viabiles/ml. Esta reposición de medio se llevó a cabo mediante una etapa de centrifugación durante cinco minutos a 300 g y la resuspensión del sedimento de células en 30 ml de medio fresco por agitador. El día 3 después de la infección se efectuó la recogida

de células de los agitadores y se tomaron muestras para análisis por AEX-HPLC. La lisis de las células recogidas se realizó mezclando un volumen de muestra de 1 ml de cada agitador con 100 µl de Triton X-100 al 10 % e incubación a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, las muestras se mezclaron con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron por debajo de -65 °C hasta llevar a cabo su análisis por AEX-HPLC. Los resultados se presentan en la figura 3. Los resultados demuestran que las infecciones a altas densidades celulares también son factibles con otro vector de rAd35 (Ad35.eGFP). Los rendimientos volumétricos (figura 3) y la productividad unitaria (datos no mostrados) estuvieron en el mismo intervalo que para el vector Ad35.TB-S.

Ejemplo 5: otros experimentos de infección a altas densidades celulares con un vector de rAd35.

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 2 l a una densidad celular de $0,25 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se propagaron en el biorreactor de 2 l a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. Una vez alcanzada una densidad celular de aproximadamente $3,7 \times 10^6$ células totales/ml (día 4 después de la inoculación), se inició un proceso ATF. Después de 67 horas, se alcanzó una densidad celular de $40,7 \times 10^6$ células totales/ml. En este momento se recogió una parte de la suspensión celular y las células restantes se diluyeron con medio fresco en el biorreactor de 2 l hasta una densidad celular de $12,7 \times 10^6$ células totales/ml (con una viabilidad del 87 % y, por tanto, 11×10^6 células viables/ml). A continuación, el biorreactor de 2 l se infectó con Ad35.TB-S a una MDI de 70 PV/célula y se incubó a 36 °C, pH 7,3 y una DO del 40 %. El sistema ATF se inició 15 horas después de la infección con una tasa de reposición del medio de cinco volúmenes del recipiente por día. Los días 1, 2, 3 y 4 después de la infección se tomaron muestras del biorreactor de 2 l para el recuento celular y la determinación de la producción de virus mediante AEX-HPLC. Para liberar el virus, una muestra de 1 ml se mezcló con 100 µl de Triton X-100 al 10 % y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, la muestra se mezcló con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron a una temperatura por debajo de -65 °C hasta su análisis por AEX-HPLC. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: resultados del ejemplo 5.

Día tras infección	Recuento de células ($\times 10^6$ células totales/ml)	AEX-HPLC (PV/ml)	QPA (UI/ml)	AEX/QPA (PV/UI)
0	12,70	NA	NA	NA
1	22,18	por debajo del LdC	$1,77 \times 10^9$	-
2	9,20	$1,34 \times 10^{12}$	$8,5 \times 10^{10}$	15,8
3	10,10	$1,46 \times 10^{12}$	$8,3 \times 10^{10}$	17,6
4	7,60	$1,43 \times 10^{12}$	$8,3 \times 10^{10}$	17,2

Los resultados demostraron que las infecciones a densidades celulares superiores a 10×10^6 células viables/ml son factibles en biorreactores acoplados a un sistema de perfusión y que es posible aumentar el rendimiento volumétrico casi siete veces en comparación con un proceso por lotes (ejemplo 2). No se observó ninguna pérdida prematura de células del cultivo infectado, lo que indica que el proceso ATF es un sistema apropiado para el cultivo de las células infectadas.

Un requisito de la FDA para los lotes de rAd es una relación PV/UI < 30. El análisis de QPA (ensayo de potencia basado en PCR cuantitativa; Wang y col., 2005) demostró que todas las muestras satisfacían este requisito. Por el contrario, las muestras desveladas en Yuk y col. (2004) tenían una relación PV/UI de aproximadamente 100 (figura 2A/2B en dicho documento). La relación entre partículas físicas y partículas infecciosas es un parámetro importante para los adenovirus y se prefiere una relación más baja para los lotes de rAd. Los lotes preparados en este ejemplo tienen consistentemente una relación tan baja, de entre aproximadamente 15:1 y 18:1.

Para una demanda anual de aproximadamente $1,5 \times 10^{19}$ PV, con un rendimiento de aproximadamente $1,5 \times 10^{12}$ PV/ml, tendrían que procesarse aproximadamente 10.000 l. Estos volúmenes pueden procesarse en instalaciones de 1.000 l o menos y, por lo tanto, esto reducirá el compromiso de gasto inicial durante el desarrollo de las vacunas.

Ejemplo 6: otros experimentos de infección a altas densidades celulares con un vector de rAd35 con tasas de perfusión reducidas.

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres

a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 2 l a una densidad celular de $0,59 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se propagaron en el biorreactor de 2 l a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. Una vez alcanzada una densidad celular de aproximadamente $2,9 \times 10^6$ células totales/ml (día 4 después de la inoculación), se inició un proceso ATF. Después de 118 horas de perfusión se alcanzó una densidad celular de 29×10^6 células totales/ml. En este momento se recogió una parte de la suspensión celular y las células restantes se diluyeron con medio fresco en el biorreactor de 2 l hasta una densidad celular de $16,4 \times 10^6$ células totales/ml (con una viabilidad del 82 % y, por tanto, $13,4 \times 10^6$ células viables/ml). A continuación, el biorreactor de 2 l se infectó con Ad35.TB-S a una MDI de 70 PV/célula y se incubó a 36 °C, pH 7,3 y una DO del 40 %. El sistema ATF se inició 15 horas después de la infección con una tasa de reposición del medio de dos volúmenes del recipiente por día. Los días 1, 2 y 3 después de la infección se tomaron muestras del biorreactor de 2 l para el recuento celular y la determinación de la producción de virus mediante AEX-HPLC. Para liberar el virus, una muestra de 1 ml se mezcló con 100 µl de Triton X-100 al 10 % y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, la muestra se mezcló con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron a una temperatura por debajo de -65 °C hasta su análisis por AEX-HPLC. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Los resultados demostraron que las infecciones a densidades celulares superiores a 10×10^6 células viables/ml son factibles en biorreactores acoplados a un sistema de perfusión y que es posible aumentar el rendimiento volumétrico casi diez veces en comparación con un proceso por lotes (ejemplo 2). No se observó ninguna pérdida prematura de células del cultivo infectado, lo que indica que el proceso ATF es un sistema apropiado para el cultivo de las células infectadas.

Tabla 2: resultados del ejemplo 6.

Día tras infección	Recuento de células ($\times 10^6$ células totales/ml)	AEX-HPLC (PV/ml)	QPA (UI/ml)	AEX/QPA (PV/UI)
0	16,4	NA	NA	NA
1	21,4	por debajo del LdC	por debajo del LdC	NA
2	29,18	$1,34 \times 10^{12}$	$2,23 \times 10^{11}$	6,0
3	31,50	$2,26 \times 10^{12}$	$3,16 \times 10^{11}$	7,2

Un requisito de la FDA para los lotes de rAd es una relación PV/UI < 30. El análisis de QPA (ensayo de potencia basado en PCR cuantitativa; Wang y col., 2005) demostró que todas las muestras satisfacían este requisito. Por el contrario, las muestras desveladas en Yuk y col. (2004) tenían una relación PV/UI de aproximadamente 100 (figura 2A/2B en dicho documento). La relación entre partículas físicas y partículas infecciosas es un parámetro importante para los adenovirus y se prefiere una relación más baja para los lotes de rAd. Los lotes preparados en este ejemplo tienen consistentemente una relación tan baja, inferior a 10:1.

Para una demanda anual de aproximadamente $1,5 \times 10^{19}$ PV, con un rendimiento de aproximadamente 2×10^{12} PV/ml, tiene que procesarse la recogida de menos de 7.500 l. Estos volúmenes pueden procesarse en instalaciones de 1.000 l o menos y, por lo tanto, esto reducirá el compromiso de gasto inicial durante el desarrollo de las vacunas.

Ejemplo 7: otros experimentos de infección a altas densidades celulares con un vector de rAd35 con tasas de perfusión reducidas.

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 2 l a una densidad celular de $0,44 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se propagaron en el biorreactor de 2 l a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. El sistema ATF se inició cuatro días después de la inoculación a una densidad celular de aproximadamente $2,72 \times 10^6$ células totales/ml. Después de 144 horas de perfusión se alcanzó una densidad celular de $30,5 \times 10^6$ células totales/ml. En este momento se recogió una parte de la suspensión celular y las células restantes se diluyeron con medio fresco en el biorreactor de 2 l hasta una densidad celular de $16,2 \times 10^6$ células totales/ml (con una viabilidad del 81 % y, por tanto, $13,1 \times 10^6$ células viables/ml). A continuación, el biorreactor de 2 l se infectó con Ad35.TB-S a una MDI de 70 PV/célula y se incubó a 36 °C, pH 7,3 y una DO del 40 %. El sistema ATF se inició cinco horas después de la infección con una tasa de reposición del medio de dos volúmenes del recipiente por día. Los días 2, 3 y 4 después de la infección se tomaron muestras del biorreactor de 2 l para el recuento celular y la determinación de la producción de virus mediante AEX-HPLC. Para liberar el virus, una muestra de 1 ml se mezcló con 100 µl de Triton X-100 al 10 % y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, la muestra se mezcló con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron a una temperatura por debajo

de -65 °C hasta su análisis por AEX-HPLC. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3: resultados del experimento 7.

Día tras infección	Recuento de células (x 10 ⁶ células totales/ml)	AEX-HPLC (PV/ml)	QPA (UI/ml)	AEX/QPA (PV/UI)
0	16,19	NA	NA	NA
1	20,40	NA	NA	NA
2	24,14	1,42 x 10 ¹²	1,77 x 10 ¹¹	8,0
3	24,60	2,20 x 10 ¹¹	1,82 x 10 ¹¹	12,1
4	16,26	1,90 x 10 ¹²	1,51 x 10 ¹¹	12,5

Los resultados demostraron de nuevo que las infecciones a densidades celulares superiores a 10 x 10⁶ células viables/ml son factibles en biorreactores acoplados a un sistema de perfusión y que es posible aumentar el rendimiento volumétrico casi diez veces en comparación con un proceso por lotes (ejemplo 2). Además, con los ejemplos 6 y 7 se demostró que la tasa de perfusión después de la infección puede limitarse a dos volúmenes del recipiente por día, sin comprometer la producción de virus.

Para una demanda anual de aproximadamente 1,5 x 10¹⁹ PV, con un rendimiento de aproximadamente 2 x 10¹² PV/ml, tiene que procesarse la recogida de menos de 7.500 l. Estos volúmenes pueden procesarse en instalaciones de 1.000 l o menos y, por lo tanto, esto reducirá el compromiso de gasto inicial durante el desarrollo de las vacunas.

Ejemplo 8: otros experimentos de infección a altas densidades celulares con un vector de rAd5 a una escala de 50 l.

A partir de una colección de trabajo de células PER.C6®, las células se descongelaron y se propagaron en un medio de cultivo sin suero en un incubador humidificado a 37 °C y con CO₂ al 10 %. Se llevó a cabo un subcultivo cada tres a cuatro días hasta alcanzar la densidad celular suficiente para inocular un biorreactor de 10 l a una densidad celular de 0,52 x 10⁶ células viables/ml. Las células se propagaron en el biorreactor de 10 l a 37 °C, con una DO del 40 % y un pH de 7,3. El sistema ATF se inició al alcanzarse una densidad celular de aproximadamente 5,3 x 10⁶ células totales/ml (cuatro días después de la inoculación). Después de 169 horas de perfusión se alcanzó una densidad celular de 77 x 10⁶ células totales/ml. En este momento la suspensión celular de 10 l se diluyó con medio fresco en un biorreactor de 50 l hasta una densidad celular de 15,5 x 10⁶ células totales/ml (con una viabilidad del 81 % y, por tanto, 12,6 x 10⁶ células viables/ml). A continuación, el biorreactor de 50 l se infectó con Ad35.TB-S a una MDI de 70 PV/célula y se incubó a 36 °C, pH 7,3 y una DO del 40 %. El sistema ATF se inició cinco horas después de la infección con una tasa de reposición del medio de dos volúmenes del recipiente por día. Los días 2 y 3 después de la infección se tomaron muestras del biorreactor de 50 l para el recuento celular y la determinación de la producción de virus mediante AEX-HPLC. Para liberar el virus, una muestra de 1 ml se mezcló con 100 µl de Triton X-100 al 10 % y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, la muestra se mezcló con 2,42 µl de Benzonase/MgCl₂, a lo que siguió una etapa de incubación posterior de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron a las muestras 100 µl de sacarosa al 50 %. Después de una etapa de centrifugación de cinco minutos a 2.500 g, las muestras se almacenaron a una temperatura por debajo de -65 °C hasta su análisis por AEX-HPLC. Los resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: resultados del ejemplo 8.

Día tras infección	Recuento de células (x 10 ⁶ células totales/ml)	AEX-HPLC (PV/ml)	QPA (UI/ml)	AEX/QPA (PV/UI)
0	15,5	NA	NA	NA
2	21,4	1,67 x 10 ¹¹	1,15 x 10 ¹¹	14,6
3	23,5	1,84 x 10 ¹²	1,99 x 10 ¹¹	9,2

Los resultados demostraron de nuevo que las infecciones a densidades celulares superiores a 10 x 10⁶ células viables/ml eran factibles en biorreactores de 50 l acoplados a un sistema de perfusión y que a una escala de 50 l era posible aumentar el rendimiento volumétrico casi diez veces en comparación con un proceso por lotes (ejemplo 2). De este modo, se demostró que la escala del proceso desarrollado podía aumentarse. Los volúmenes de producción que deben procesarse anualmente con el fin de satisfacer la demanda anual del virus pueden producirse con el proceso actual. Para una demanda anual de aproximadamente 1,5 x 10¹⁹ PV, con un rendimiento de aproximadamente 2 x 10¹² PV/ml, tiene que procesarse la recogida de menos de 7.500 l. Estos volúmenes pueden procesarse en instalaciones de 1.000 l o menos y, por lo tanto, esto reducirá el compromiso de gasto inicial durante el desarrollo de las vacunas.

Referencias

Altaras NE, Aunins JG, Evans RK, Kamen A, Konz JO, Wolf JJ. Production and formulation of adenovirus vectors. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* Vol. 99, 2005.

- 5 Cortin V, Thibault J, Jacob D, Garnier A. High-Titer adenovirus vector production in 293S Cell Perfusion culture. *Biotechnol. Prog.* Vol. 20, 2004.

Estape D, Wilde F. Comparison of campaign vs concurrent large-scale cell culture facilities. *Pharmaceutical Engineering.* Vol. 26, nº 5, septiembre/octubre 2006.

- 10 Furey J. Scale-up of a cell culture perfusion process - A low-shear filtration system that inhibits filter-membrane fouling. *Genetic Engineering News.* Vol. 22, nº 7, abril 2002.

- 15 Henry O, Dormond E, Perrier M, Kamen A. Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures. *Biotechnology and bioengineering,* Vol. 86, nº 7, junio 2004.

Hodge G. Disposable bioprocessing: State of the Industry, Economics and a novel manufacturing platform case study (Presentation). NC Bio. Ctr. BPD Conference, 18 de noviembre de 2004.

- 20 Kamen A, Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process. *The journal of gene medicin* Vol. 6, 2004.

Maranga L, Aunins JG, Zhou W. Characterization of changes in PER.C6 cellular metabolism during growth and propagation of a replication-deficient adenovirus vector. *Biotechnology and Bioengineering,* Vol. 90, nº 5, junio 2005.

- 25 Radosevic K, Wieland CW, Rodriguez A, Weverling GJ, et al. Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. *Infect. Immun.* 75: 4105-4115 (2007).

- 30 Shott JP, McGrath SM, Pau MG, Custers JH, et al. Adenovirus 5 and 35 vectors expressing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein elicit potent antigen-specific cellular IFN-gamma and antibody responses in mice. *Vaccine* 26: 2818-2823 (2008).

Página web de las Naciones Unidas: <http://esa.un.org/unpp/index.asp?panel=2> (marzo 2008).

- 35 Wang F, Puddy AC, Mathis BC, Montalvo AG, et al. Using QPCR to assign infectious potencies to adenovirus based vaccines and vectors for gene therapy: toward a universal method for the facile quantitation of virus and vector potency. *Vaccine* 23: 4500-4508 (2005).

- 40 Xie L, Metallo C, Warren J, Pilbrough W, Peltier J, Zhong T, Pikus L, Yancy A, Leung J, Aunins JG, Zhou W. Large-Scale propagation of a replication-defective adeno vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 cell culture under sparging conditions. *Biotechnology and bioengineering,* Vol. 83, nº 1, 5 de Julio de 2003.

- 45 Yallop C, Crowley J, Cote J, Hegmans-Brouwer K, Lagerwerf F, Gagne R, Martin JC, Oosterhuis N, Opstelten DJ, Bout A. Per.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins. *Modem Biopharmaceuticals - Design, Development and Optimization.* Vol. 3, 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 producción de un adenovirus recombinante del serotipo 35 (rAd35) en un biorreactor, comprendiendo el método:
- 5 a) el cultivo de células PER.C6 en suspensión en un biorreactor con un sistema de perfusión;
- b) la infección de dichas células en un biorreactor a una densidad de entre 10×10^6 células viables/ml y 16×10^6 células viables/ml con rAd35;
- 10 c) el cultivo posterior de las células infectadas en un biorreactor con un sistema de perfusión para la propagación de dicho rAd35; y
- d) la recogida de dicho rAd35.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células en la etapa b) se infectan con rAd35 a una densidad de entre aproximadamente 10×10^6 y 14×10^6 células viables/ml.
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho sistema de perfusión en la etapa c) es un sistema de perfusión de flujo tangencial alterno (ATF).
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende:
- e) la purificación del rAd35 y, opcionalmente,
- 25 f) la preparación de una composición farmacéutica que contiene el rAd35 purificado.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho adenovirus recombinante carece de al menos una porción de la región E1 y comprende un ácido nucleico heterólogo.
- 30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho sistema de perfusión en la etapa a) es un sistema de perfusión de flujo tangencial alterno (ATF).
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la etapa a) se realiza en un primer biorreactor y las etapas b) y c) se realizan en un segundo biorreactor.
- 35

Fig. 1

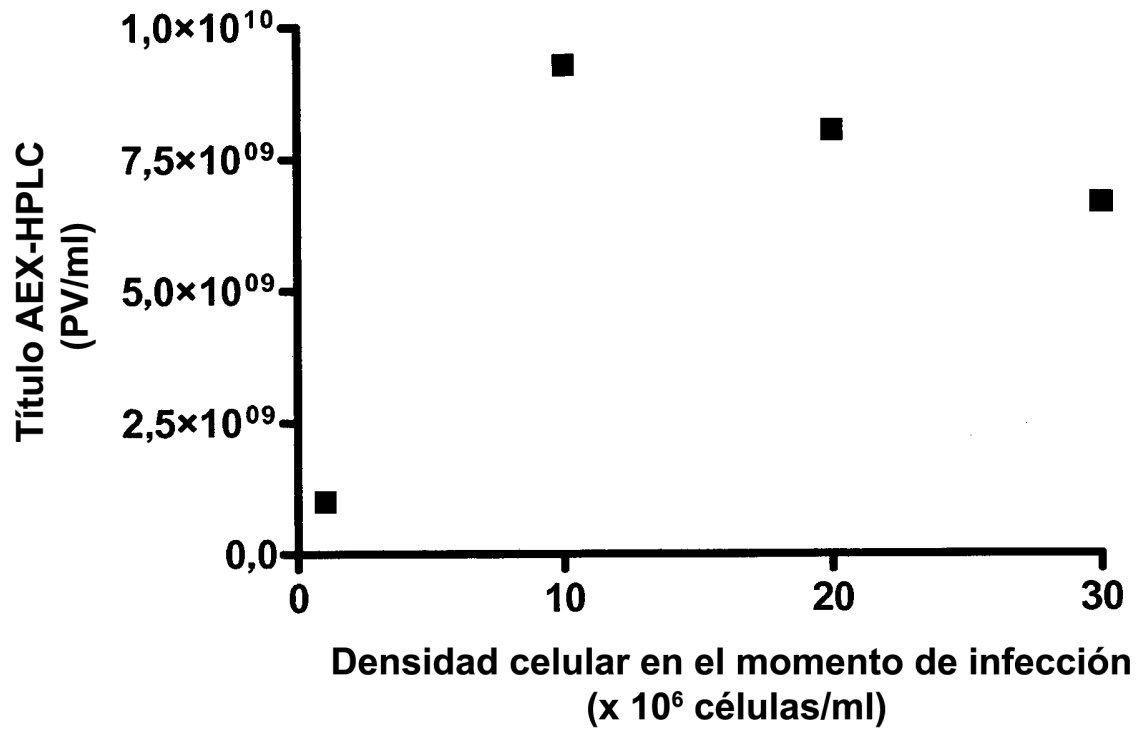


Fig. 2

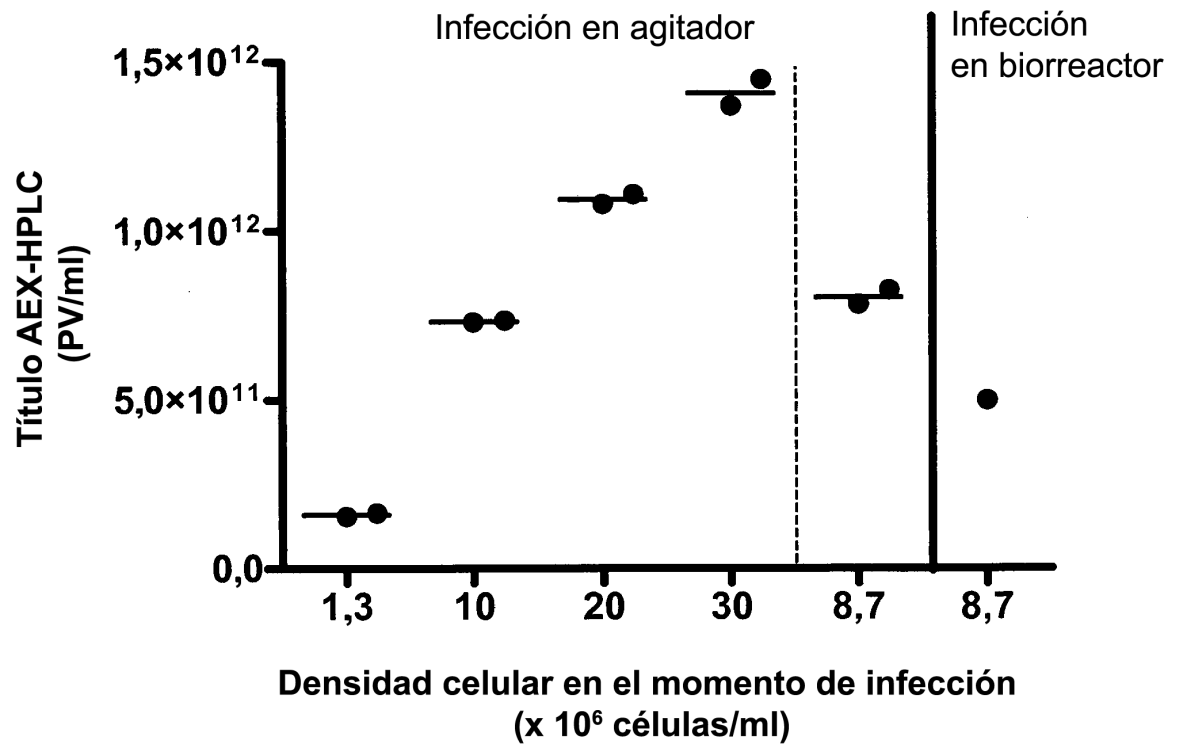


Fig. 3

