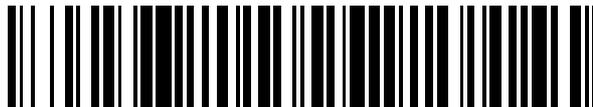


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 168**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/02** (2006.01)

**B01D 61/14** (2006.01)

**B01D 61/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12758663 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2744895**

54 Título: **Eliminación de virus contaminantes en preparaciones AVV**

30 Prioridad:

**08.09.2011 EP 11180594**  
**08.09.2011 US 201161532176 P**

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

**02.02.2016**

73 Titular/es:

**UNIQURE IP B.V. (100.0%)**  
**Meibergdreef 61**  
**1105 BA Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**HERMENS, WILHELMUS THEODORUS**  
**JOHANNES MARIACHRISTIAAN y**  
**SMITH, JAMES PATRICK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 558 168 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**

Eliminación de virus contaminantes en preparaciones AVV.

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a los campos de virología y terapia genética.

En particular, la invención se refiere a un método para eliminar virus contaminantes con forma de barra, como por ejemplo, baculovirus, de preparaciones de virus con una forma esencialmente esférica, como por ejemplo adeno-  
10 vectores víricos asociados a terapias genéticas.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Por cuestiones de seguridad, se usan virus de replicación deficiente en la producción de vectores víricos para su uso en terapias genéticas.

Los virus de replicación deficiente son capaces de infectar una célula humana in vivo y transferir el transgen en la célula, pero son incapaces por replicarse en la célula por sí mismos.

Normalmente esto se consigue eliminando genes víricos que son importantes para la replicación de virus, como por ejemplo, los genes rep y cap.

20 Esto también permite la incorporación de producto(s) genómicos de interés en lugar de los genes víricos.

Para generar partículas de virus en una célula huésped, los genes víricos que se eliminan del virus de replicación deficiente tienen que proporcionarse separadamente, por ejemplo proporcionando virus auxiliares.

25 [0003] El virus adeno-asociado (AAV por sus siglas en inglés) es un virus de replicación no autónoma que pertenece a la familia Parvoviridae y constituye una molécula monocatenaria de ADN con un revestimiento icosaédrico externo de proteína estructural con un diámetro de aprox. 18 a 26 nm.

Los virus AAV de tipo salvaje pueden, o bien integrarse en el genoma de la célula huésped, o bien replicarse en las células huésped en presencia de un virus auxiliar.

Los adenovirus fueron los primeros en ser identificados como posibles virus auxiliares.

30 No obstante, también son aptos otros virus auxiliares de mamíferos con forma esencialmente esférica, tales como los virus del herpes, que son patógenos para seres humanos y animales.

En los últimos años, la producción de vectores de virus adeno-asociados (AAV) mediante sistemas de expresión basados en baculovirus en células de insectos (Urabe et al. [[2002] Hum Gene Ther. 13(16):1935-43) ha experimentado un aumento de popularidad, ya que el sistema es fácilmente exportable a aplicaciones industriales de  
35 terapia genética.

En este sistema de producción se usan normalmente tres baculovirus recombinantes codificando los genes rep de los AAV, los genes cap de los AAV y el producto génico de interés (transgen ADN) flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR por sus siglas en inglés) de AVV.

40 [0004] Una desventaja significativa asociada a la preparación de vectores víricos mediante la utilización de virus auxiliares o sistemas de expresión basados en virus es la formación de una población mezclada de partículas de producto de virus y virus auxiliares, que tiene que ser sometida a otra purificación.

45 La contaminación de virus, como por ejemplo adenovirus o baculovirus, debe evitarse o minimizarse cuando se usan vectores víricos en terapia genética, debido a la patogenicidad potencial y/o inmunogenicidad del virus contaminante.

[0005] Actualmente se conocen en la técnica diferentes métodos para la eliminación del virus auxiliar, no obstante, todos ellos presentan desventajas.

50 Ejemplos de estos métodos son el centrifugado en gradiente de densidad o la inactivación térmica o una combinación de ellos.

No obstante, el centrifugado en gradiente de densidad solo es viable económicamente en volúmenes relativamente pequeños y por tanto este método no puede realizarse a escala industrial.

La inactivación térmica se basa en las estabilidades térmicas diferentes de los AAV y los virus auxiliares.

55 Por ejemplo, el calentamiento de una población mezclada de adenovirus y AAV a 56-65 °C lleva a inactivación térmica más o menos selectiva del virus auxiliar con solo una ligera pérdida en la actividad del AAV.

Desafortunadamente, las proteínas de virus de auxiliar desnaturalizado que todavía estarían presentes en la muestra y tras su uso en la terapia genética son capaces de evocar una respuesta celular inmune celular en el paciente (Smith, C. A. et al. (1996) J. Virol., 70, 6733-6740).

60 [0006] Además, se han desarrollado métodos de cromatografía en columna, incluyendo el intercambio iónico (basado en anión y/o catión) y la cromatografía de afinidad, para purificar vectores AAV.

Esos métodos tienen como resultado preparaciones altamente enriquecidas de vector AAV, pero no pueden ser validados por sí mismos para mostrar una disminución suficiente del virus auxiliar que cumpla los requisitos de regulación de productos farmacéuticos comercializados.

65 [0007] Finalmente, en la patente US 6,479,273 se revela que separación de AAV recombinante y adenovirus, es

decir, dos virus esencialmente esféricos de diámetro sustancialmente diferente, se consigue sometiendo una solución que contiene ambos virus a una o varias filtraciones a través de una membrana de filtro con un tamaño de poro aproximado de 50 nm o una membrana de filtro con un tamaño de poro aproximado de 35 nm. Los rAAV (siglas en inglés de virus adeno-asociados recombinantes) se describen con un diámetro de aprox. 25 nm y se dice que los adenovirus tienen un diámetro de aprox. 65-90 nm, aunque en la bibliografía se han reportado diámetros mayores, por ejemplo de aproximadamente 100 nm, [Kennedy y Parks (2009) Molecular Therapy 17(10):1664-1666 ; Berkowitz (2003) WCBP 7th annual meeting January 7-10 2003, San Francisco, CA].

No obstante, los virus contaminantes resultantes de la producción de vectores AAV mediante un sistema de expresión basado en baculovirus en células de insecto, se derivan del baculoviridae y por ello tienen forma de barra, con una longitud de aproximadamente 260 nm y un diámetro de aproximadamente 20 nm.

Ya que el AVV (recombinante) es sustancialmente esférico y tiene un diámetro de aproximadamente 18 a 26 nm, el baculovirus presenta parcialmente un tamaño similar (en dos dimensiones) al del virus objetivo.

[0008] La publicación internacional WO 2010/148143 divulga la purificación de vectores AAV recombinantes producida, por ejemplo, en un sistema de baculovirus a partir de contaminantes de los virus auxiliares.

WO 2010/148143 divulga que un proceso opcional para vaciar virus adventicios comprende un filtro de limpieza viral, como por ejemplo Viresolve® NFR (50 nm), Pall Ultipore® VF (50 nm) y Asahi 70 nm.

[0009] Los requisitos reguladores, por ejemplo la evaluación de seguridad vírica en productos de biotecnología derivada de líneas celulares de origen humano o animal (ICH Q5A (R1)) por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), requieren que el proceso para la purificación de un fármaco biológico sea capaz de eliminar cualquier virus sin producto.

La eliminación de contaminantes víricos se realiza mediante las fases "limpieza viral" o "eliminación viral" y normalmente se consigue por cromatografía y/o filtración de virus.

Las fases del proceso "inactivación de virus" también se usan para atenuar efectos patógenos potenciales provocados por virus sin producto.

Este contiene normalmente condiciones físicas extremas (por ejemplo: pH, temperatura) y/o condiciones químicas (por ejemplo: detergentes, disolventes).

Los productos farmacéuticos son normalmente proteínas de menos de aproximadamente 200 kDa y los procesos de "eliminación de virus" están bien establecidos.

No obstante, un tipo relativamente nuevo de productos se refieren a productos de terapia genética que comprenden virus de unos mil kDa para los cuales no se han documentado correctamente los procesos de "eliminación de virus".

En particular, no se ha documentado aún un proceso de "eliminación de virus" donde el producto farmacéutico es un virus esférico y el contaminante vírico es un virus en forma de barra.

[0010] Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de métodos de separación/purificación adicional que sean técnica y económicamente viables para su uso a escala industrial y que sean capaces de eliminar parcial o completamente un virus sin producto de un sistema de expresión basado en virus, a partir de una muestra que contiene AAV, preferiblemente una muestra de AAV recombinante obtenida de un sistema de expresión basado en baculovirus.

Así se reduce la patogenicidad potencial y/o inmunogenicidad del virus sin producto.

En particular existe una necesidad en la técnica de métodos de separación/purificación adicional donde el virus sin producto tiene forma de barra y cuya longitud es varias veces el diámetro del AAV, pero cuyo diámetro es similar al del AAV.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

[0011] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para separar una población de viriones parvovirales de una población de viriones baculovirales, donde el método comprende la fase de filtrado de una muestra que comprende las poblaciones de viriones parvovirales y baculovirales sobre un filtro a través del cual solo pueden pasar los viriones parvovirales.

Se prefiere que el filtro tenga un tamaño de poro nominal de 30 - 40, nuevamente de forma más preferible 32 - 38 nm, y de la forma más preferible de (aproximadamente) 35 nm.

En una forma de realización preferida, el parvovirus es un virus adeno-asociado; de forma más preferible, el baculovirus es Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcmNPV).

[0012] En una forma de realización preferida, el filtro usado en la filtración de la muestra es un filtro de virus o una ultrafiltración.

Se prefiere que el filtro sea de superficie y/o de profundidad.

El filtro usado en un método de la invención preferiblemente comprende un material seleccionado del grupo consistente en: celulosa cuproamónica regenerada, polivinilideno fluoruro, polisulfona, como por ejemplo polietersulfona, por ejemplo polietersulfona modificada o no modificada, politetrafluoroetileno, polipropileno, polietersulfona modificada o no modificada, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida o celulosa regenerada.

En una forma de realización particularmente preferida, el filtro para usar en un método de la invención comprende celulosa cuproamónica regenerada, preferiblemente fibras huecas de celulosa cuproamónica regenerada, de forma más preferible siendo el filtro una membrana Planova™ 35 (Asahi KASEI; www.planovafilters.com).

5 En otra forma de realización preferida, el filtro usado en un método de la invención es un Ultipor™ VF Grade DV50 Virus Removal Filter (Pall Corp. www.pall.com).

[0013] En una forma de realización de un método según la presente invención, la muestra está sujeta un filtrado usando dos o más filtros.

10 [0014] En un método según la invención, la muestra puede ser prepurificada antes de la fase de filtración utilizando un método seleccionado del grupo consistente en un gradiente de densidad, una prefiltración, una fase de cromatografía, preferiblemente cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio de iones y combinaciones de estos métodos.

Es preferible llevar a cabo la prefiltración mediante un filtro con un tamaño de poro de 70 - 200 nm.

15 Preferiblemente, el pH de la muestra que va a ser sometida a un método de la invención es de 6 a 10, preferiblemente de 7 a 9, de forma más preferible de 7,5 a 8,5, de la forma más preferible aproximadamente 8.

En una forma de realización de la invención, se filtra de 1 a 200 ml de muestra por 1 cm<sup>2</sup> de superficie de filtro de virus, preferiblemente 80 a 120 ml por 1 cm<sup>2</sup>.

## 20 Definiciones

[0015] El término "virus" como se utiliza en este caso abarca no solo virus de origen natural o virus que han sido alterados por manipulación genética, es decir, virus recombinantes denominados, sino también partículas de virus, es decir, virus infecciosos y no infecciosos, partículas tipo virus ("VLP" por sus siglas en inglés), tales como

25 partículas tipo papilomavirus conforme a WO 96/11272, y cápsidas que contienen ácidos nucleicos, pero también pueden vaciarse, y partirse, en particular, una o varias veces, preferiblemente en diferentes subunidades o capsómeros, especialmente cuando diferentes capsómeros se asocian o combinan de manera que constituyen al menos aprox. el 50%, preferiblemente al menos el 80%, especialmente aprox. el 90%, de la cápsida.

Los virus que se retiran de la mezcla tienen, en particular, una estructura en forma de barra esencialmente no

30 esférica mientras que los virus que son el producto farmacéutico esencialmente tienen una forma esférica, preferiblemente icosaédrica.

Se entiende además que el término "virus" puede referirse a una población de viriones de este virus, preferiblemente una población homogénea del virus.

35 Así, el término "parvovirus" puede referirse a una población de viriones parvovirales, preferiblemente a una población homogénea de viriones parvovirales.

[0016] Los virus de la familia Parvoviridae son pequeños virus de ADN animal.

La familia Parvoviridae se puede dividir en dos subfamilias: el Parvovirinae, que infecta a vertebrados, y el Densovirinae, que infecta a insectos.

40 Los miembros de la subfamilia Parvovirinae son aquí referidos como parvovirus e incluyen el género Dependovirus.

Como se puede deducir del nombre de su género, miembros del Dependovirus son únicos en el sentido de que normalmente requieren una coinfección con un virus auxiliar como el adenovirus o el virus del herpes para infectar de forma productiva el cultivo celular.

45 [0017] El género Dependovirus incluye virus adeno-asociados (AAV), que infectan normalmente a seres humanos (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, y 6) o primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4), y virus relacionados que infectan a otros animales de sangre caliente (por ejemplo, adeno-virus asociados bovinos, caninos, equinos y ovinos).

50 Hoy es posible diferenciar entre los tipos serológicamente distinguibles de al menos AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8 y AAV-9.

Los vectores AAV constituyen un monocatenario de ADN con un revestimiento icosaédrico externo de proteína estructural con un diámetro de 18 a 26 nm, por lo general de aproximadamente 25 nm.

Se describe más información sobre el parvovirus y otros miembros del Parvoviridae en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Capítulo 69 de Fields Virology (3d Ed. 1996).

55 Por conveniencia, la presente invención es posteriormente ejemplificada y descrita aquí por referencia a los AAV.

No obstante, se entiende que la invención no está limitada a los AAV pero puede igualmente aplicarse a otros parvovirus.

También se entiende que la invención se extiende a virus quiméricos AAV, que comprenden proteínas cápsidas quiméricas y/o virus híbridos AAV (o virus pseudotipados) que también tienen un tamaño similar como al de los parvovirus de tipo salvaje (18 - 26 nm de diámetro).

60 Se da una descripción y algunos ejemplos en WO0028004.

Los ejemplos de virus quiméricos y/o híbridos AAV son para ejemplificar los AAV2/1, AAV2/3, AAV2/4, AAV2/5, AAV2/5.2, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8 y AAV2/9.

65 [0018] El genoma AAV consiste en proteínas codificadoras de genes rep necesarios para la replicación del virus y genes cap que codifican las proteínas estructurales víricas.

Uno o varios de los genes rep necesarios para la replicación (por ejemplo: rep 40, rep 52, rep 68 y/o rep 78) o los genes cap que se necesitan para la estructura cápsida (por ejemplo: VP-1, VP-2 y/o VP-3) pueden, por ejemplo, ser sustituidos en el virus con un transgen cuando se preparan vectores adeno-asociados.

Las regiones ITR que están todavía presentes en los extremos 5' y 3' son necesarias, como elementos activos en cis, para el embalaje del transgen en partículas AAV recombinantes infecciosas y para la replicación del ADN del genoma del AAV recombinante (Kotin, R. M. (1994) Hum Gene Ther. 5(7):793-801 ). Un "vector AAV recombinante parvoviral " (o "vector rAAV" ) se refiere aquí a un vector que comprende una o varias secuencias polinucleótidas de interés, genes de interés o "transgenes" que se flanquean por secuencias de repetición de terminal invertido AAV o parvoviral (ITR). Estos vectores rAAV se pueden replicar y empaquetar en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula huésped de insecto que expresa productos génicos rep y cap (es decir, proteínas Rep y Cap AAV).

Cuando un vector rAAV se incorpora a una construcción de ácido nucleico más grande (por ejemplo en un cromosoma o en otro vector como un plásmido o un baculovirus usado para clonación o transfección), entonces el vector rAAV normalmente es referido como un "pro-vector" que puede ser "rescatado" por replicación y encapsidación en presencia de las funciones de embalaje AAV y funciones de auxiliar necesarias.

[0019] Una "célula de insecto" tal y como se utiliza en este caso se refiere a una célula de insecto que permite la replicación de un vector parvoviral recombinante (rAAV) y que se puede mantener en el cultivo.

Por ejemplo, la línea celular usada puede ser Spodoptera frugiperda, líneas celulares de drosophila, o líneas celulares de mosquito, por ejemplo, líneas celulares derivadas de Aedes albopictus.

Las células de insecto preferidas o líneas celulares son células de las especies de insecto susceptibles a infección por baculovirus, incluyendo por ejemplo e301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, Ha2302, Hz2E5, High Five (Invitrogen, CA, USA) y expresSF+® (US 6,103,526 ; Protein Sciences Corp., CT, USA).

Las condiciones de crecimiento para células de insecto en cultivo, y la producción de productos heterólogos en las células de insecto en cultivo son bien conocidas en la técnica y descritas por ejemplo en las siguientes referencias en ingeniería molecular de células de insectos. La metodología para ingeniería molecular y expresión de polipéptidos en las células de insecto se describe, por ejemplo, en Summers y Smith. 1986.

A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. N. 7555, College Station, Tex. ; Luckow. 1991.

En Prokop et al., Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152 ; King, L. A. and R. D. Possee, 1992, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom ; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Nueva York ; W. H. Freeman and Richardson, C. D., 1995, Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volumen 39 ; US 4,745,051 ; US2003148506 ; y WO 03/074714.

#### Descripción detallada de la invención

[0020] Se puede producir un RAAV recombinante en las células de insecto que utilizan un sistema de expresión basado en baculovirus, donde la célula de insecto se infecta con tres baculovirus recombinantes que albergan el vector AAV rep y cap.

Cuando las células de insecto infectado son cultivadas, los genes AAV de proteína no estructural y los genes AAV de proteína estructural son expresados, el transgen ADN se replica y las partículas AAV recombinantes (partículas rAAV) se empaquetan y ensamblan.

Las partículas rAAV contienen el/los producto(s) de gen de interés (el/los transgen(es)), que es/son flanqueado(s) a ambos extremos por las regiones ITR, en forma de ADN monocatenario.

Al mismo tiempo, el baculovirus recombinante se replica en estas células, algo que generalmente termina en la lisis y muerte de las células infectadas después de unos pocos días.

Los virus resultantes (baculovirus y partículas rAAV) son en parte liberados en el sobrenadante de cultivo celular o lo que queda en las células lisadas.

Por esta razón, las células se rompen generalmente usando métodos de ruptura celular que son conocidos por los expertos en la técnica, tales como congelación y descongelación alternativa o por medio de hidrólisis enzimática, por ejemplo con tripsina, con el fin de lograr una liberación esencialmente completa del virus o mediante lisis con detergente.

[0021] Una desventaja significativa asociada a la preparación de vectores víricos que utilizan un sistema de expresión basado en virus, como un sistema de expresión basado en baculovirus o utilizando un sistema de virus auxiliar, es la formación de una población mezclada de partículas de producto de virus y virus sin producto, cuya población tiene que ser sometida a otra purificación.

Por conveniencia, el palabra "virus auxiliar" se utiliza en este caso para indicarlos 'verdaderos' virus auxiliares usados en la producción de AAV, como por ejemplo el adenovirus o el virus del herpes, o el baculovirus, aunque no está claro aún si el baculovirus tiene funciones auxiliares o solo lleva los genes AAV a las células de insecto.

Se debe evitar la contaminación de baculovirus cuando se usan vectores víricos en terapias genéticas debido a patogenicidad potencial o inmunogenicidad del baculovirus.

- 5 [0022] Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de separación/purificación que es apta, por ejemplo, para obtener un producto parvoviral aprobado por el organismo regulador, que es técnica y económicamente viable a escala industrial y que es capaz de demostrar la reducción, preferiblemente la eliminación, de un virus en forma de barra en una muestra de virus que comprende partículas de virus en forma de barra y partículas de virus esencialmente esféricas, en especial donde las partículas de virus en forma de barra tienen un diámetro similar al de las partículas parvovirales (es decir, las partículas de virus en forma de barra son similares en dos dimensiones, pero no en la tercera dimensión, que debe ser mayor), de modo que la patogenicidad potencial y/o inmunogenicidad del virus auxiliar es reducida.
- 10 Se apreciará por los expertos en la técnica que esto es difícil y no es probable que una mezcla de virus con y sin producto teniendo ambos virus un tamaño similar en dos dimensiones se pueda separar por técnicas de filtración, preferentemente a niveles altos.
- 15 [0023] Por lo tanto, se describe un método para la separación de dos poblaciones de viriones en una muestra, preferiblemente en el que una población de viriones comprende viriones que son de una forma esencialmente esférica y la otra población de viriones comprende viriones que son de una forma similar a una barra, el método que comprende la etapa de la filtración de una muestra que comprende ambas poblaciones de viriones sobre un filtro a través del cual pueden pasar sólo los viriones de una forma esencialmente esférica. Preferiblemente, el virus que tiene forma de barra tiene una proporción de al menos 4:1.
- 20 También se prefiere que el diámetro del virus en forma de barra y el diámetro de la forma esencialmente esférica no difieran más de 12 nm. Se prefiere que el virus esencialmente esférico es un parvovirus y que el virus en forma de barra es un baculovirus. En particular, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para separar una población de viriones parvovirales de una población de viriones baculovirales, donde el método comprende la fase de filtrado de una muestra que contiene las poblaciones de viriones parvovirales y baculovirales sobre un filtro a través del cual solo pueden pasar los viriones parvovirales, donde el filtro tiene un tamaño de poro nominal de 30 - 40 nm.
- 25 [0024] El término "separar" tal y como se utiliza en este caso no implica que ambas partículas separadas sean recuperadas de la muestra. El término "separar" tal y como se utiliza en este caso indica la eliminación parcial o total de las partículas de virus en forma de barra de la muestra, y reducen por lo tanto la contaminación del virus en forma de barra en la muestra de partículas del virus esencialmente esférico. Así, la separación se puede entender como una purificación de las partículas de virus esencialmente esféricas en la muestra.
- 30 En el caso de los baculovirus y parvovirus, se puede decir que el término "separar" tal y como se utiliza en este caso indica la eliminación parcial o total del baculovirus de la muestra, y reducen por lo tanto la contaminación del baculovirus en la muestra que comprende parvovirus. En este caso, la purificación implica la separación del parvovirus de la muestra.
- 35 [0025] El filtrado es una operación física que se usa para separar por ejemplo sólidos de sólidos de diferente tamaño o de fluidos, al interponer un medio por el cual solo los sólidos con un tamaño inferior a un límite de tamaño dado o el fluido pueden pasar. Los sólidos sobredimensionados de la muestra se retienen en el mecanismo de alimentación. El fluido, incluyendo los sólidos que han pasado a través del filtro, se pueden referir como filtrado o permeado.
- 40 [0026] El proceso de "eliminación de virus" aplicado en la presente invención se produce por "filtración", también conocido como "filtración de virus". La "filtración de virus" se entiende como la separación de un producto farmacéutico de un contaminante vírico mediante un filtro, como un filtro de virus o una ultrafiltración. Se entiende que el producto farmacéutico mismo también puede ser un virus, tal como un vector vírico (terapia genética).
- 45 [0027] La filtración de virus es una tecnología de filtración donde se usa una membrana con un tamaño de poro nominal en la escala del nanómetro. Los filtros de virus y ultrafiltros normalmente comprenden membranas con un tamaño de poro nominal en el rango de 30 nanómetros - 1 micrómetro o un peso molecular cortado (MWCO por sus siglas en inglés) en el rango de 10.000 - 750.000 Dalton, preferiblemente en el rango de 10.000 - 500.000 Dalton, de forma más preferible en el rango de 10.000 - 100.000 Dalton. La clasificación del tipo de filtro depende de estructura, material, y vendedor de la membrana. También el tipo de uso podría determinar la clasificación.
- 50 Se pueden usar ultrafiltros en una modo de filtración de flujo tangencial (TFF por sus siglas en inglés), (también conocido como filtración de flujo de cruce; durante la recirculación del fluido de alimentación que comprende la muestra es paralelo al filtro y solo una parte del fluido de alimentación que comprende la muestra se usa para la producción de filtrado, la parte más grande del fluido de alimentación dejará el módulo sin cruzar el filtro) o se usan como un filtro de callejón sin salida (toda la muestra se pasa a través del filtro).
- 55 Un experto en la técnica entenderá muy bien esta terminología.
- 60
- 65

[0028] En la filtración de virus se usa normalmente una diferencia de presión sobre la membrana: presión de transmembrana (caída de presión a través de la membrana) de entre 0,02 y 0,8 MPa, preferiblemente entre 0,02 y 0,1 MPa.

La diferencia de presión se puede llevar a cabo por la velocidad de flujo aplicada a la muestra (es decir, por una bomba).

Cuando el filtro se acciona en modo TFF, una presión de transmembrana también se modula sometiendo la muestra a presión antes de la membrana por estrechamiento de la línea de retención, o después de la membrana (es decir, en el filtrado) usando una bomba.

Estas operaciones pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

[0029] En una forma de realización preferida de la invención, la población de viriones que tienen una forma esencialmente esférica son viriones que tienen simetría icosaédrica y un diámetro de aproximadamente 18-25 nm.

Así, en una forma de realización preferida de la presente invención, la población de viriones que tiene una forma esencialmente esférica es una población de viriones parvovirales, preferiblemente virus adeno-asociados.

[0030] La "proporción" de una forma es la proporción de su dimensión más larga a su dimensión más corta.

De este modo los objetos simétricos son descritos por solo 2 mediciones, como la longitud y diámetro de una barra.

Alternativamente o en combinación con cualquiera de las otras formas de realización de la presente invención, en una forma de realización preferida de la invención la proporción del virus con forma de barra es al menos 4:1, preferiblemente al menos 5:1, de forma más preferible al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 11:1 al menos 12:1, o aproximadamente 13:1.

En una población de viriones conformados en forma de barra, tal como baculovirus, que son separados utilizando un método de la invención, preferiblemente los viriones tienen un diámetro de 18 - 30 nm, de forma más preferible 20 - 27 nm, de forma más preferible 20 - 25 nm, de forma más preferible 20 - 23 nm y una longitud de 70 nm - 300 nm, preferiblemente de 80 nm - 280 nm, 90 nm - 260 nm, 100 nm - 260 nm, 120 nm - 260 nm, 140 nm - 260 nm, 160 nm - 260 nm, 180 nm - 260 nm, 200 nm - 260 nm, 220 nm - 260 nm, 240 nm - 260 nm.

De forma más preferible, los viriones tienen un diámetro de 20 - 23 nm y una longitud de 180 - 280 nm, en particular un diámetro de aproximadamente 20 nm y una longitud de aproximadamente 120-260 nm.

[0031] Una población de viriones conformados en forma de barra de la presente invención es preferiblemente una población de viriones que pertenecen a la familia del baculoviridae.

El nombre baculoviridae fue propuesto debido a la forma de barra de sus viriones, que se deriva del latín baculum = bastón, caña, báculo.

El baculovirus mejor estudiado es el virus Autographa californica mononucleo polyhedrosis (AcMNPV), que es de forma asimétrica y tiene un diámetro de aproximadamente 20 - 120-260 nm (es decir, aproximadamente 20 nm en dos dimensiones y aproximadamente 120-260 nm en la tercera dimensión, o alternativamente y dicho de forma más preferible: tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm y una longitud de aproximadamente 120-260 nm).

Los virus que se clasifican como género baculoviridae son Alphabaculoviruses, Betabaculoviruses, Deltabaculoviruses y Gammabaculoviruses y sus miembros respectivos son el lepidóptero NPV, lepidóptero GV, himenóptero NPV y el díptero NPV.

Ya que distintos baculovirus han sido determinados para tener un genoma de diferente longitud, se sugiere que longitud de la cápsida puede ser flexible en respuesta a la longitud de genoma que varía entre 80 kb y 160 kb.

Los ejemplos de baculovirus que podrían separarse de una población de viriones parvovirales tal y como se define aquí utilizando un método de la presente invención se proporcionan en la tabla 1 (basados en Baculovirus Molecular Biology de G.F. Rohrmann; segunda edición; 26 de enero de 2011; capítulo 1: "Introduction to the baculoviruses and their taxonomy").

Tabla 1: tamaño del genoma y predicción del contenido ORF\* en baculovirus seleccionados

Tipo de virus	Nombre del virus	Referencia	Tamaño (kb)	Marco abierto de lectura u ORF(>50 aa)
Grupo I (12 miembros)**	EppoMNPV	Hyink O. et al.; J Gen Virol. 2002,83(Pt 4):957-71. [PubMed]	119	136
	AnpeNPV	Fan Q. et al.; Virology. 2007;366(2):304-15. [PubMed]	126	145
	AcMNPV	Ayres M.D. et al.; Virology. 1994;202:586-605. [PubMed]	134	~150
Grupo II (16 miembros)	AdhoNPV	Nakai M. et al.; Virology. 2003;316(1):171-83. [PubMed]	113	125
	SeMNPV	Ijkel W.F.J. et al.; J. Gen. Virol. 1999;80:3289- 3304. [PubMed]	136	139
	AgseNPV	Jakubowska A.K. et al.; J Gen Virol. 2006;87(Pt 3):537-51. [PubMed]	148	153
	LdMNPV	Kuzio J. et al.; Virology. 1999;253:17-34. [PubMed]	161	163

	LeseNPV	Xiao H., Qi Y.; Virus Genes. 2007;35(3):845-56 . [PubMed]	168	169
GV (10 members)_	AdorGV	Wormleaton S., Kuzio J., Winstanley D.; Virology. 2003;311(2):350-65 . [PubMed]	100	119
	CrleGV	Lange M., Jehle J.A.; Virology. 2003;317(2):220- 36 . [PubMed]	111	124
	CpGV	Luque T. et al.; J Gen Virol. 2001;82(Pt 10):2531- 47 . [PubMed]	124	143
	XecnGV	Hayakawa T. et al.; Virology. 1999;262:277-297 . [PubMed]	179	181
Hmenopteros NPV (3 miembros)	NeleNPV	Lauzon H.A. et al.; J Gen Virol. 2005;86:945-61 . [PubMed]	82	89
	NeabNPV	Duffy S.P. et al.; J Virol. 2006;80(14):6952-63. [PubMed]	84	93
	NeseNPV	Garcia-Maruniak A. et al.; J Virol. 2004;78(13): 7036-51 . [PubMed]	86	90
Dípteros NPV (1 miembro)	CuniNPV	Afonso C.L. et al.; J Virol. 2001;75:11157-65 . [PubMed]	108	109

\*Seleccionados a partir de unas 40 secuencias de genoma (2008); \*\*Los números entre paréntesis indican el número total de genomas en la categoría; grupo 1: uno de dos linajes mayores de lepidóptero NPV; este se distingue de otros baculovirus usando una proteína de fusión de revestimiento diferente, gp64. Otros genes son también únicos a este linaje; grupo 2: uno de dos linajes mayores de lepidóptero NPV; los miembros usan una proteína de fusión (F) para iniciar la infección; GV: Virus granuloso: un linaje de baculovirus patógeno para lepidópteros, que normalmente tienen un único virión por cuerpo de occlusión en forma de ovoide; NPV: virus de poliedrosis nuclear: el tipo más distribuido de baculovirus. Los NPV se replican en el núcleo y normalmente producen cuerpos de occlusión en forma de poliedro que contienen más de un virión.

- [0032] En una forma de realización preferida de la invención, la población de viriones baculovirales es una población de Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcmNPV).  
 En los sistemas de producción AAV, el baculovirus elegido es Autographa californica multiple nucleopolyhedrosis virus (AcmNPV).  
 5 AcmNPV es el baculovirus más estudiado.  
 El virus fue originalmente aislado del bobinador alfalfa (un lepidóptero) y contiene un 134 kbp de genoma con 154 marcos de lectura abiertos.  
 La proteína mayor de cápsida VP39 junto con algunas proteínas menores forma un nucleocápsido en forma de barra (21 nm x 260 nm) que incluye el ADN con una proteína p6.9.  
 10 En el proceso de producción de AAV en el que media el baculovirus, siete de los genes actualmente seleccionados para replicación AAV parecen estar relacionados con la replicación de baculovirus (lef-1, lef-2, lef-11, dna-pol, lef-3, lef-7, y dbp, y tres se han descrito como factores de transactivación de codificación (p35, ie-1, ie-2).
- [0033] En una forma de realización preferida de la invención, el diámetro del virión en forma de barra y el diámetro del virión con forma esencialmente esférica difieren menos de 12 nm en tamaño, preferiblemente menos de 11, 10, 9, 8, 7, 6,5 nm, por lo cual el virión con forma esférica preferiblemente tiene el mayor diámetro de los dos.  
 Así, por ejemplo, en la forma de realización preferida de la invención donde una población de viriones parvovirales es separada de una población de viriones baculovirales, preferiblemente virus adeno-asociados, los dos tipos de viriones son de tamaño parcialmente similar, ya que el diámetro de un parvovirus (por ejemplo AAV) y un baculovirus (en dos dimensiones) difieren menos de 5 nm.  
 20
- [0034] Un filtro para usar en la presente invención es una membrana con un tamaño de poro nominal de preferiblemente 1,2 a 3,3 veces el diámetro del virus en forma de barra (es decir, el diámetro de la dimensión más corta, no la longitud del virus con forma de barra).  
 Los términos, "tamaño de poro" "tasa de eliminación", "tasa efectiva" "tamaño nominal de poro" o "poro que permite a las partículas con un tamaño mínimo específico ser eliminadas" como se usan por diferentes fabricantes de filtros, son términos equivalentes con motivo de la presente invención y aquí se pueden usar de forma intercambiable.  
 25
- [0035] Preferiblemente, la membrana tiene un tamaño de los poro de al menos 1,3, 1,4, 1,5 veces el diámetro del virus en forma de barra pero menor que 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,7, 2,5, 2,3, 2,1, 1,9, 1,8 veces el diámetro del virus en forma de barra.  
 De forma más preferible, la membrana tiene un tamaño de poro de 1,6 a 1,7 veces el diámetro del virus en forma de barra.  
 30 En una forma de realización preferida, el filtro usado en un método de la presente invención tiene un tamaño de poro de 30 a 40 nm, de forma más preferible 32 a 38 nm, de forma aún más preferible 34 a 36 nm, de la forma más preferible 35 nm.  
 35

Un ejemplo de un filtro de virus tiene un tamaño de poro de 35 nm, como por ejemplo la membrana Asahi-Kasai Planova 35N ([www.planovafilters.com](http://www.planovafilters.com)). En otra forma de realización preferida, el filtro para usar en un método de la invención es un Ultipor™ VF Grade DV50 Virus Removal Filter (Pall Corp.; [www.pall.com](http://www.pall.com)).

5 [0036] En una forma de realización preferida, un filtro para usar en la presente invención es un filtro de virus o un ultrafiltro.

Un filtro de virus es normalmente un filtro donde los poros tienen un tamaño en la escala nanométrica. Preferiblemente, un filtro de virus es un filtro donde los poros tienen un tamaño en la escala nanométrica y donde las fibras tienen poros asimétricos en estos, que capturan partículas de ciertos tamaños y dejan pasar partículas

10 menores a través de él.  
Ejemplos de filtros de virus que se pueden emplear en la presente invención son la membrana Planova 35N. Ejemplos de ultrafiltros son Pellicon 2 o Pellicon 3 (Millipore), Sartocoon (Sartorius) y Centracette (Pall).

15 [0037] En una forma de realización preferida de la presente invención, el filtro, por ejemplo un filtro Planova 35N, emplea una superficie o mecanismo de profundidad o una combinación de ambos para la discriminación de los virus de diferentes morfologías.

La filtración en la superficie se basa en el tamaño de poro e implica que, durante la filtración, las partículas con un diámetro mayor que el diámetro de poro se retienen en la superficie en el lado "que fluye" del filtro y se forma un "bloque".

20 En cambio, en la filtración de profundidad se retienen partículas dentro del filtro medio debido a la composición de la capa de fibra individual: normalmente en el flujo lateral la capa consiste en fibras gruesas y fuera del flujo lateral la capa consiste en fibras finas.

Los filtros de profundidad son la variedad de filtros que usan un medio de filtración porosa para retener partículas a lo largo de todo el medio, justo antes de la superficie del medio.

25 Estos filtros se usan normalmente cuando el fluido a filtrar contiene una alta carga de partículas porque, con respecto a otros tipos de filtros, pueden retener una gran masa de partículas antes de quedar bloqueadas.

[0038] Cabe señalar que se entiende "la membrana de filtro" como el material de filtro real que realiza el tamizado en todos filtros.

30 Ventajosamente, las membranas de filtro usadas son compuestas por celulosa preferentemente regenerada, por ejemplo celulosa cuproamónica regenerada, preferiblemente fibras huecas de celulosa cuproamónica regenerada, pero otros materiales adecuados son el polivinilideno fluoruro, politetrafluoroetileno, polipropileno, sulfona de poliéter modificada o no modificada, acetato de celulosa, nitrato de celulosa o poliamida.

35 Ejemplos de tales membranas con un tamaño de poro que permite la eliminación de partículas con un tamaño de aprox. de 40-400 nm son las membranas Ultipor VF Pall GmbH, 63303 Dreieich, que tienen tamaños de poro nominales de aproximadamente 50 nm o 20 nm, las membranas microporosas Asahi Chemical's Bemberg de Asahi Chemical Industry Ltd., Tokio, Japón, que tienen tamaños de poro nominales de aprox. 15, 19, 35 o 72 nm, o las membranas correspondientes de otros fabricantes, como Sartorius AG, 37075 Gottingen o Schleicher y Schuell GmbH, 37582 Dassel.

40 En una forma de realización preferida de la invención, el filtro comprende celulosa cuproamónica regenerada, polivinilideno fluoruro, polisulfona, politetrafluoroetileno, polipropileno, sulfona de poliéter modificada o no modificada, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida o celulosa regenerada, preferiblemente donde el filtro contiene fibras huecas de celulosa cuproamónica regenerada o polivinilideno fluoruro.

45 [0039] Un método de la presente invención es especialmente adecuado para purificar una población de viriones parvovirales a partir de una población de viriones baculovirales.

De hecho, un filtro de virus con un tamaño de poro de 35 nm, por ejemplo la membrana Asahi-Kasai Planova 35N, es particularmente ventajosa en un método de la invención para separar partículas rAAV y baculovirus.

50 En especial estos filtros hacen posible no solo la eliminación esencialmente cuantitativa de baculovirus infecciosos de al menos 5 logaritmo 10 de la población mezclada sino también el conseguir un rendimiento elevado de aproximadamente > 90%, de partículas rAAV.

[0040] Una reducción en la graduación de un virus en forma de barra, es decir, el factor por el que la graduación del virus a eliminar disminuye, es preferiblemente de al menos 5 registros, por ejemplo después de que una población

55 mezclada de viriones rAAV y viriones baculovirales  $10 \times 10^5$  hayan sido separados conforme a un método de la invención, ninguno de los viriones baculovirales fueron luego detectados en el filtrado.

Preferiblemente, la reducción en la graduación de un virus en forma de barra que se consigue por un método de la invención de al menos 5.5 registros, al menos 6 registros, al menos 6.5 registros, al menos 7 registros, al menos 8 registros, al menos 9 registros, de la forma más preferible al menos 10 registros.

60 La graduación se puede determinar por métodos generales conocidos en la técnica, como por ejemplo por un ensayo de dosis infecciosa en cultivo de tejidos al 50% (TCID<sub>50</sub>).

Por ejemplo, la graduación de baculovirus infecciosos de una población de viriones baculovirales en una muestra se puede determinar usando un ensayo TCID<sub>50</sub>.

65 Este método se basa en la infección de monocapas de células de insecto Sf9 con baculovirus infecciosos en una muestra de control positiva.

Se diluye en serie la muestra de control positiva en el medio de cultivo utilizado para infectar las células.

Las células se incuban a +28°C durante 7 días.

Posteriormente, los sobrenadantes se transfieren a placas recién preparadas con monocapas de células de insecto Sf9 y se incuban incubados a +28°C durante 7 días.

5 Al producirse infección, las células infectadas no son capaces de permanecer unidas entre sí y a la superficie de placa y forman células sueltas, es decir, que muestran efecto citopatógeno (CPE), que se pueden observar al microscopio.

La graduación en el registro 10 TCID50/ml se calcula utilizando el método Spearman-Kärber.

10 [0041] Preferiblemente, al menos el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% de la población de viriones de forma esencialmente esférica se recuperan utilizando un método de la invención.

Así, preferiblemente al menos el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% de la población de viriones de forma esencialmente esférica se recuperan en el eluido (o filtrado).

15 [0042] En una forma de realización preferida de la invención, la muestra se filtra a través de dos o más filtros.

[0043] Una muestra que comprende las poblaciones de viriones es separada normalmente de un sobrenadante del cultivo (por ejemplo, el medio de cultivo) desde un sistema de expresión basado en virus, por ejemplo, en un cultivo de células de insecto que producen viriones AAV, células de insecto de un sistema de expresión basado en virus para producir viriones AAV, o una combinación de sobrenadante del cultivo y células de insecto.

20 Preferiblemente, la muestra está sujeta a ciclos de congelación-descongelación antes de usarse en un método de la presente invención.

De forma más preferible, la muestra está sujeta a una prepurificación previa a su uso en el método de la presente invención.

25 Este puede aumentar el rendimiento a través de la filtración de la población de viriones de forma esencialmente esférica (por ejemplo, los viriones parvovirales, preferiblemente AAV) y también se cree que es ventajoso para la duración de la vida útil del filtro.

Así, en una forma de realización preferida, la muestra está libre de contaminantes celulares.

30 [0044] Así, en una forma de realización preferida, el método comprende la prepurificación de la muestra comprendiendo las poblaciones de viriones, por ejemplo, mediante centrifugado, uno o varios gradientes de densidad, prefiltración y/o cromatografía.

Preferiblemente, la muestra se prepurifica en caso de que la muestra sea, por ejemplo, un sobrenadante de un cultivo rAAV, por ejemplo por prefiltración para eliminar partículas mayores y donde el baculovirus y las partículas rAAV se retienen en el filtrado.

35 Ventajosamente, una prefiltración, como se describe detalladamente más abajo, se realiza antes de la separación real de las poblaciones de viriones como se describe anteriormente aquí.

En una forma de realización preferida, la muestra es prepurificada utilizando un método seleccionado del grupo consistente en un gradiente de densidad, una prefiltración, una fase de cromatografía, preferiblemente cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio de iones, y combinaciones de estos métodos.

40 Ejemplos de tales métodos de purificación incluyen Brument et. al., 2002, Molecular Therapy, Kaluduv et. al., 2002, Human Gene Therapy, Potter et. al., 2002, Methods in Enzymology y Cecchini et. al., 2010, Human gene therapy.

Preferiblemente, la prepurificación comprende el gradiente de densidad y una o varias prefiltraciones y/o fases de centrifugado.

45 Preferiblemente, la prepurificación comprende una o varias prefiltraciones en combinación con una o varias fases de cromatografía.

[0045] Se le da una preferencia particular a una prepurificación de la muestra usando uno o varios filtros de membrana que permiten que las poblaciones de viriones a separar separada pasen pero que sin embargo retengan las mayores impurezas.

50 En general, la prepurificación impide o hace más difícil el bloqueo del filtro usado en un método de la invención que contribuye a la separación posterior de las poblaciones en forma de barra y viriones esencialmente esféricos.

Se puede bloquear el filtro durante la separación de las poblaciones de viriones por constituyentes del cultivo de virus en la muestra que son no eliminados, o no son adecuadamente eliminados, previo sometimiento de la muestra a un método de la invención.

55 El centrifugado a baja velocidad puede no ser suficiente para eliminar adecuadamente tales constituyentes, por lo tanto se prefiere otra prepurificación de la muestra para minimizar el bloqueo del filtro.

[0046] Preferiblemente la prepurificación se realiza por prefiltración.

60 El filtro de membrana para la prepurificación de una muestra que comprende AAV y baculovirus y que es sometido a un método de la invención, tiene preferiblemente un tamaño de poro de 70 a 200 nm, de forma más preferible de 80 a 180 nm, de 90 a 150 nm, de 100 a 130 nm.

Por ejemplo, un filtro de membrana con un tamaño de poro de aproximadamente 100 nm, tal como el filtro Ultipor N66 (Pall GmbH, 63303 Dreieich), es particularmente adecuado para la prepurificación de una población mezclada de partículas rAAV y baculovirus.

65 Así, en una forma de realización preferida, la prefiltración se efectúa mediante un filtro con un tamaño de poro de 70 a 200 nm.

[0047] Los métodos adecuados y los medios para la prepurificación dependen del filtro que se usa en el método de la invención para separar las poblaciones de viriones parvovirales y baculovirales como se ha descrito anteriormente aquí, y pueden ser evaluados por el experto en la materia.

5 Las condiciones después de la prepurificación deben ser de modo que 1) el filtro permanezca integral, 2) el parvovirus sea estable, 3) las concentraciones de sal sean cercanas a lo fisiológico y 4) la caída de presión sobre el filtro no sea tan grande que cause que el parvovirus (por ejemplo AAV) sea una lisis y así ya no sea funcional.

[0048] En otra forma de realización preferida, el pH de la muestra es de 6 a 10, preferiblemente de 7 a 9, de forma más preferible de 7,5 a 8,5, en particular aproximadamente 8,0.

10 Si es necesario, el pH de la muestra se ajusta con tampones adecuados, por ejemplo tampones Tris/HCl (tris(hidroximetil)amina-metano), al pH como se especifica anteriormente.

Preferiblemente, el pH de la muestra es aproximadamente 8,0, ya que produce un buen rendimiento de AAV después de la filtración.

15 [0049] En una forma de realización preferida de la invención, la muestra tiene pH de 6-8,5 (esencialmente fisiológico) para asegurar que el AAV sea estable.

Un tampón con un pH en esta gama debería preferiblemente también tener una conductividad adecuada para el parvovirus particular.

20 Normalmente, la conductividad requerida depende del serotipo de AAV y del transgen.

El experto en la materia es capaz de determinar de un tampón adecuado en base a cada caso.

Normalmente, la conductividad básica debería ser comparable a conductividad fisiológica, es decir, 137mM NaCl.

Ejemplos de soluciones de tampón adecuadas son MES, Trizma, Bis-Tris, HEPES, PBS y Bis-Tris propano.

25 [0050] En una forma de realización preferida, al menos 0,5 ml de la muestra se filtra por 1 cm<sup>2</sup> de superficie de filtro, preferiblemente 1 a 100 ml por 1 cm<sup>2</sup>.

No obstante, esta depende en alto grado de la pureza y concentración de los virus en la muestra a separar y en más eventos ya que la filtración se aplica al final del proceso de corriente de más de 1 L que se pueden filtrar por 1 cm<sup>2</sup>.

30 Alternativamente o en combinación con cualquiera de las otras formas de realización preferidas, en una forma de realización preferida de la invención al menos 1-10 ml, preferiblemente 1-5 ml, en particular aproximadamente 1,5 ml, de la muestra se filtra por 1 cm<sup>2</sup> de la superficie de filtro.

En general, esto consigue un rendimiento elevado de partículas rAAV, por ejemplo, mientras al mismo tiempo se realiza la eliminación de los baculovirus.

35 [0051] Así, la presente invención proporciona un método que produce separación/purificación de una población de viriones de forma esencialmente esférica y una población de viriones en forma de barra de manera simple y económica y cuyo método se pueden aplicar a escala industrial.

Un método de la invención se puede emplear bajo condiciones particularmente moderadas y produce un rendimiento elevado de viriones de forma esencialmente esférica mientras que los viriones en forma de barra se reducen o incluso se eliminan en el filtrado.

40 Otra ventaja de la presente invención es que los viriones que han sido purificados conforme a la invención pueden, por ejemplo, ser empleados directamente como vectores víricos para terapias genéticas, ya que están adecuadamente libres de otros virus, por ejemplo de baculovirus.

45 Aunque pequeñas fracciones residuales de ADN de baculovirus pueden permanecer en el filtrado, este ADN no se asocia con baculovirus competentes de replicación sino que se asocia a ADN coenvasado en el rAAV y esto consecuentemente no representa baculovirus infecciosos.

[0052] En una forma de realización preferida, los constituyentes de baculovirus, como por ejemplo proteínas libres de baculovirus y partículas subvíricas, disminuyen por el método de la invención.

50 Esto es particularmente ventajoso, ya que estos constituyentes son capaces de inducir una respuesta inmune específica cuando los vectores víricos se usan en terapia genética en pacientes.

[0053] Alternativamente o en combinación con formas de realización anteriormente descritas, es una forma de realización de la invención que el método de la presente invención se puede aplicar para separar poblaciones diferentes de más de dos de viriones, como por ejemplo cuando un sistema de expresión baculoviral se usa utilizando más de un vector baculoviral diferente y dando así como resultado múltiples tipos de viriones baculovirales.

El método de la presente invención como se ha descrito anteriormente puede utilizarse para separar poblaciones de baculovirus de la población de virión parvoviral.

60 Así, la presente invención también se refiere a un método para separar al menos dos poblaciones de viriones en una muestra, preferiblemente donde una o varias poblaciones de viriones comprenden viriones que tienen forma esencialmente esférica y una o más de otras poblaciones de viriones comprenden viriones que tienen forma de barra, el método comprende la fase de filtración de una muestra con poblaciones de viriones sobre un filtro a través del cual solo pueden pasar viriones de forma esencialmente esférica.

65 [0054] En este documento y en sus reivindicaciones, el palabra "comprender" y sus conjugaciones se usan en un

sentido no limitativo y significan que los elementos tras la palabra están incluidas, pero que se excluyen los elementos no mencionados específicamente.

Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "uno" o "una" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que solo haya un elemento.

5 El artículo indefinido "uno" o "una" normalmente significa "al menos uno/una".

[0055] Los siguientes ejemplos se ofrecen solo para uso ilustrativo y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

10 Descripción de las figuras

[0056]

Figura 1: recuperación de GC y TP durante la filtración de virus.

15 La figura muestra la recuperación de un % como entrada de copias genómicas y partículas totales del filtrado incluyendo la corrección hecha para volúmenes de muestra, el lavado después del uso de la membrana y la agrupación de las partes alícuotas anteriormente mencionadas.

Figura 2: reducción de baculovirus durante la filtración de virus

20 La figura muestra el título de baculovirus tal y como se mide con TCID50 del material máximo de baculovirus, la alimentación del filtro de virus (eluido de AIEX enriquecido), nanofiltrado como función de volumen de filtración (XML) y el grupo final del filtro de virus filtrado y lavado del filtro de virus.

Los filtrados y los grupos finales son los máximos títulos posibles si el ensayo positivo devuelve buenos positivos de baculovirus.

## Ejemplos

25 Ejemplo 1

[0057] El vector viral adeno-asociado (AAV) se produce después de la infección de células de insecto con tres baculovirus recombinantes como los previamente descritos por Urabe et al., 2002 (Hum. Gene Ther 13(16):1935-1943).

[0058] Tres días después de la infección del cultivo celular fue lisado por detergente y posteriormente la nucleasa fue tratada mediante la adición de 9U/ml de benzonasa (Merck) e incubación según las recomendaciones del fabricante.

35 [0059] El volumen lisado crudo fue posteriormente clarificado por filtración con filtros Pall Profile® Star y Pall Supor® (Pall Corporation) en serie.

Se realizó una incubación de reducción vírica en presencia de detergente al menos a 28°C.

Este material fue purificado mediante una cromatografía de afinidad usando AVB Sepharose HP, GE Healthcare.

40 Brevemente, el lisado celular filtrado se aplicó a una columna de 20 cm de diámetro (BPG 200/500, GE Healthcare) con aproximadamente 6 cm altura de lecho a una velocidad lineal de 150 cm/hr.

La columna se lavó con suero salino tamponado con fosfato hasta que la curva de absorbancia UV volvió a la línea base y se estabilizó.

45 Las partículas rAAV adsorbidas fueron eluidas en medios ácidos (50 mM de citrato sódico ajustado con HCl a pH 3,0) y el eluido de columna fue ajustada inmediatamente con 1/10 volúmenes de 1M Tris-Cl (pH 8,0).

[0060] Para esto se neutralizó el eluido un 10% con máximo baculovirus, fabricado tal y como se describe anteriormente en Urabe et al. (2002; supra) después de la clarificación por centrifugado a 1900g durante 15 minutos y filtrado a través de un tapón de filtro de 0,2 µm (Corning), añadido para proporcionar una población mezclada de Baculovirus y AAV para la alimentación del filtro de virus.

[0061] Antes de su uso, se preparó un filtro Planova 35N según las recomendaciones del fabricante. En resumen, la solución de almacenamiento fue eliminada y todo aire purgado mediante la adición de 40 ml de 60 mM Tris/HCL pH 8.0 y el procedimiento de descarga fue realizado según las recomendaciones del fabricante.

55 [0062] La velocidad del flujo de alimentación al filtro de virus se fijó en 5 ml/min como recomienda el fabricante (ver tabla 2) utilizando una bomba peristáltica.

Durante la filtración de virus, la presión de la alimentación y flujo del filtrado fueron monitoreados (ver tabla 2).

60 Tabla 2: rendimiento en la filtración de virus

Tiempo de proceso (min)	Velocidad de la bomba (r.p.m.)	Presión de alimentación (mBar)	Volumen procesado (mL)	Flujo de filtrado (mL/min)
0	3	160	0	5
10	3	160	50	5
20	3	160	100	5

30	3	160	150	5
40	3	160	200	5
50	3	160	250	5
60	3	160	300	5
70	3	160	350	5
80	3	160	400	5

[0063] Las muestras fueron recogidas después de filtrar 50, 250 y 400 ml, tomados para la titulación de baculovirus mediante el ensayo TCID50 para uso de baculovirus infecciosos usando líneas celulares Sf9.

5 Los resultados se muestran en TCID50: 50% dosis infecciosa en cultivo de tejido, que indica la cantidad de virus que se requieren para producir un efecto citopático en el 50% de cultivo de tejido inoculado de células sf9.

[0064] Se tomaron muestras de aproximadamente 1 ml en el filtrado; estas fueron analizadas en las Copias Genómicas (de aquí en adelante, GC) del gen de interés en AAV, y Partículas Totales (de aquí en adelante, TP) de AAV, para controlar sus recuperaciones asociadas.

10 El análisis de GC y TP fue realizado como se describe más abajo.

[0065] Para determinar la concentración de copias genómicas en las muestras, se multiplican por diez las disoluciones en serie y se prepara un trabajo calificado estándar, el ADN extraño se quita por digestión de ADNasa y el ADN encapsidado liberado por digestión de proteinasa K.

15 El ADN vírico liberado es luego purificado utilizando MagneSil Blue®.

Posteriormente, el ADN se amplifica con PCR cuantitativo (q-PCR) usando imprimadores específicos para la secuencia de genoma del vector.

La amplificación de ADN se monitorea en tiempo real por inclusión del tinte de unión de ADN fluorescente SYBR verde.

20 La cantidad de ADN presente en una muestra se puede calcular por comparación de valores Ct hallados para la muestra de prueba que se encuentran para el trabajo de estándar.

Se usa un diseño de ensayo de líneas paralelas para probar las disoluciones en serie de la muestra de prueba contra el trabajo calificado estándar, que da una proporción.

25 Esta proporción se transforma en la concentración de copia genómica (gc/mL) utilizando el contenido de genoma de trabajo estándar.

[0066] El número total de partículas AAV (partículas completas con un genoma correcto (partículas de vector) y partículas vacías) se determina usando la cromatografía de filtración en gel.

30 La filtración en gel HPLC se lleva a cabo usando BioBasic SEC-1000 (Thermo Electron Corporation) en un índice de flujo de 1 mL/min con una fase acuosa de D-PBS a 25°C.

La elución se monitorea con una absorbencia de UV a 214 nm.

Las áreas de valor máximo de las muestras de prueba son cuantificadas utilizando una curva de calibración de un trabajo calificado estándar con una cantidad conocida de partículas AAV por mL.

35 [0067] El filtro Planova 35N se lava con 10 ml de 60 mM Tris/HCl pH 8,0 según instrucciones de fabricación.

El lavado fue agrupado con el filtrado y la prueba para títulos infecciosos de baculovirus mediante el ensayo TCID50.

El lavado fue probado para luego determinar el título con GC y TP antes de ser agrupado con el material filtrado.

La agrupación del filtrado y el lavado se mezclaron a mano para asegurar su homogeneidad y probar para más tarde la determinación de título GC y TP.

40 Se calculó y mostró la recuperación de títulos GC y TP en la figura 1

[0068] La graduación de baculovirus infecciosos de muestras se determina usando un ensayo de dosis infecciosa en cultivo de tejido 50% (TCID50).

45 Este método se basa en la infección de monocapas de células de insecto Sf9 con baculovirus infecciosos en una muestra de prueba.

Se usa una disolución en serie en 3 pliegues en un medio de cultivo de la muestra de prueba para infectar las células en octuplicado.

La placa se incubó a +28°C durante 7 días.

Posteriormente, los sobrenadantes se transfieren a placas recién preparadas e incubados a +28°C durante 7 días.

50 Como producto de la infección, las células infectadas no son capaces de permanecer fijadas unas a las otras y a la superficie de placa y forman células sueltas, es decir, el efecto citopatógeno (CPE) mostrado se puede observar al microscopio.

La graduación en el registro 10 TCID50/ml se calcula utilizando el método Spearman-Kärber.

55 Resultados

[0069] Los resultados para titulación de Baculovirus están en la figura 2

[0070] La solución máxima tiene un título de baculovirus infecciosos de 8,1 registro 10 TCID50 /mL.

## ES 2 558 168 T3

A la solución máxima se le añade un 10% en el eluido de ALEX enriquecido, de 7,62 registro 10 TCID50 /mL.

El valor del nanofiltrado TCID50 desciende con al menos 6 s, hasta por debajo de 1,511 registro 10 TCID50 /mL, el nivel de cuantificación de este ensayo en particular.

- 5 Por lo tanto, la nanofiltración da al menos una reducción en el Baculovirus de 6 logaritmos, por lo que la nanofiltración es una operación unitaria realizable para la discriminación de dos virus con tamaños comparables en dos dimensiones.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para separar una población de viriones parvovirales de una población de viriones baculovirales, donde el método comprende la fase de filtrado de una muestra con poblaciones de viriones parvovirales y baculovirales sobre un filtro, donde el filtro tiene un tamaño de poro nominal de 30 - 40 nm.
2. Método según la reivindicación 1, donde el parvovirus es un virus adeno-asociado.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el baculovirus es Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcmNPV).
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el filtro es un filtro de virus o un ultrafiltro.
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el filtro es un filtro de superficie y/o de profundidad.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el filtro comprende un material seleccionado del grupo consistente en: celulosa cuproamónica regenerada, polivinilideno fluoruro, polisulfona, politetrafluoroetileno, polipropileno, sulfona de poliéter modificada o no modificada, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida o celulosa regenerada.
- 20 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el filtro tiene un tamaño de poro nominal de 32 - 38 nm.
- 25 8. Método según las reivindicaciones 6 o 7, donde el filtro comprende celulosa cuproamónica regenerada, preferiblemente fibras huecas de celulosa cuproamónica regenerada, donde de forma más preferible el filtro es una membrana Planova 35 o un filtro Ultipor DV50.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra está sujeta a una filtración con dos o más filtros.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra anterior a la fase de filtración es prepurificada utilizando un método seleccionado del grupo consistente en un gradiente de densidad, una prefiltración, una fase de cromatografía, preferiblemente cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio de iones, y combinaciones de estos métodos.
- 35 11. Método según la reivindicación 10, donde la prefiltración se efectúa mediante un filtro con un tamaño de poro de 70 - 200 nm.
- 40 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el pH de la muestra es de 6 a 10, preferiblemente de 7 a 9, de forma más preferible de 7.5 a 8.5, de la forma más preferible 8.
- 45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde 1 a 200 ml de muestra se filtran por 1 cm<sup>2</sup> de superficie del filtro de virus, preferiblemente de 80 a 120 ml por 1 cm<sup>2</sup>.

Fig. 1

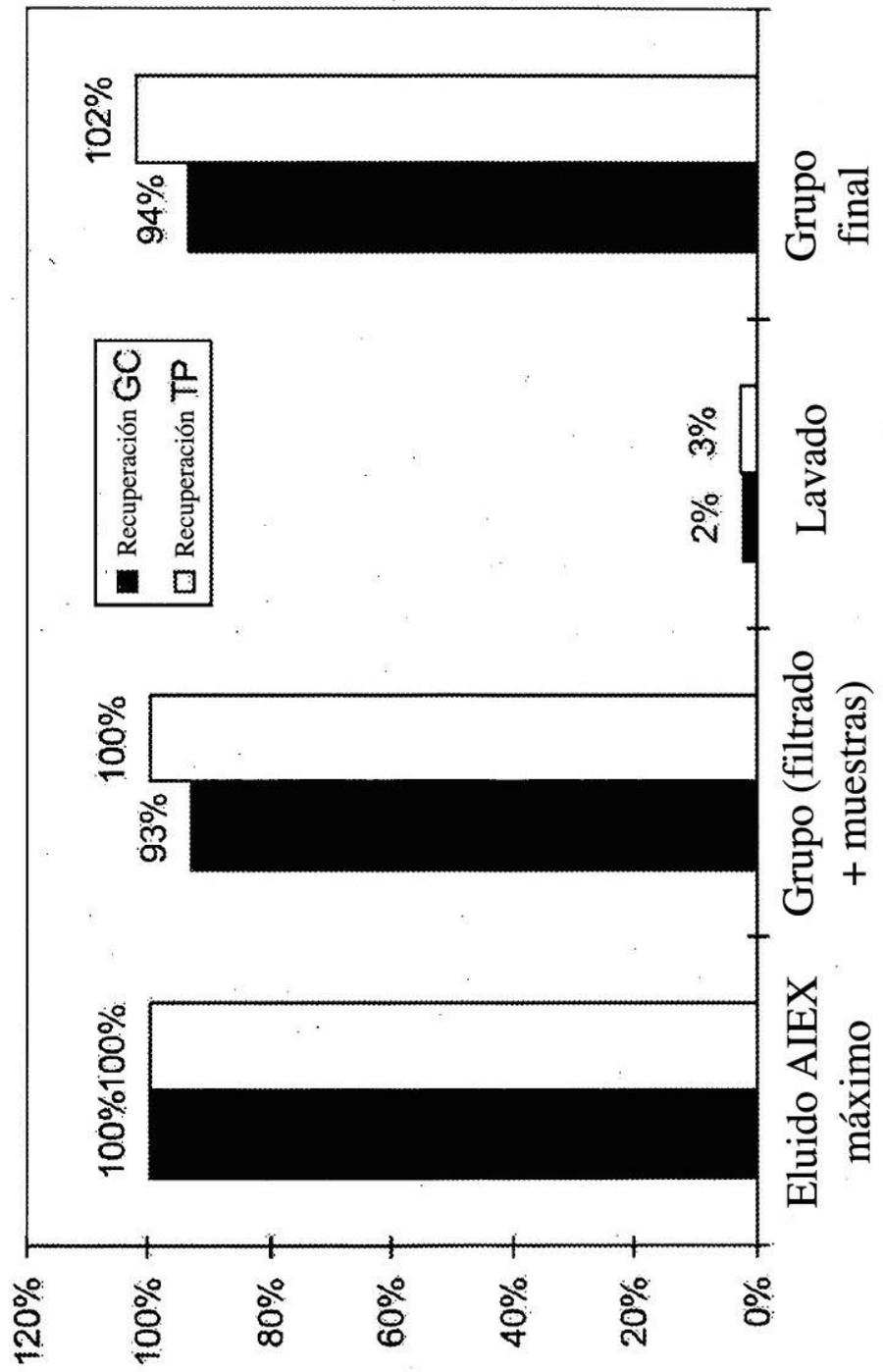


Fig. 2

