

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 421**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08782762 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2134360**

54 Título: **Purificación de partículas similares a virus**

30 Prioridad:

14.03.2007 US 906821 P

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

12.02.2016

73 Titular/es:

**TAKEDA VACCINES, INC. (100.0%)
One Takeda Parkway
Deerfield, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

**VEDVICK, THOMAS S.;
STEADMAN, BRYAN;
RICHARDSON, CHARLES;
FOUBERT, THOMAS R. y
PETRIE, CHARLES R.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 559 421 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

Purificación de partículas similares a virus

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a métodos para extraer y purificar partículas similares a virus (VLP) de fuentes biológicas. Más particularmente, se refiere a métodos para producir VLP de grado comercial a gran escala. Los métodos emplean diversas etapas de purificación que proporcionan VLP purificadas.

10

Antecedentes de la invención

Los Calicivirus, Norovirus y Sapovirus humanos son los principales causantes de la gastroenteritis aguda no bacteriana. A diferencia de Norovirus, se sabe que Sapovirus produce infecciones principalmente en bebés y niños pequeños, aunque cada vez más se encuentran también Sapovirus en poblaciones adultas (Johansson et al., 2005, A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. Scand J Infect Dis. 37(3):200-4). Los Norovirus son Calicivirus humanos no cultivables que han surgido como la causa individual más importante de brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana (Hardy, 1999, Clin Lab Med. 19(3):675-90). La significación clínica de los Norovirus no se había apreciado en su justa medida antes del desarrollo de ensayos diagnósticos moleculares sensibles. La clonación del genoma del virus Norwalk (NV) del genogrupo I prototípico y la producción de partículas similares a virus (VLP) a partir de un sistema de expresión en baculovirus recombinantes dio lugar al desarrollo de ensayos que revelaron infecciones por Norovirus ampliamente extendidas (Jiang et al., Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization. Science 1990; 250; 1580-1583; Jiang et al. 1992, J. Virol. 66(11):6527-32).

15

20

25

Los Norovirus y Sapovirus son virus de ARN monocatenario de sentido positivo que contienen un genoma de ARN no segmentado. El genoma viral codifica tres fases de lectura abiertas, de las cuales las dos últimas especifican la producción de la proteína principal de la cápsida y una proteína estructural menor, respectivamente (Glass et al., The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Human: A Reassessment Using New Diagnostics. J Infect Dis 2000; 181 (Sup 2): S254-S261). Cuando se expresan a altos niveles en sistemas de expresión eucariotas, la proteína de la cápsida de NV, y de determinados otros Norovirus y Sapovirus, se autoensamblan en VLP que imitan estructuralmente a los viriones de Norovirus nativos. Cuando se ven mediante microscopía electrónica de transmisión, las VLP son morfológicamente indistinguibles de los viriones infecciosos aislados de muestras de heces humanas.

30

35

Aunque los Norovirus y Sapovirus no pueden cultivarse *in vitro*, debido a la disponibilidad de las VLP y a su capacidad para producirse en grandes cantidades, se ha efectuado un progreso considerable en la definición de la topografía antigénica y estructural de la cápsida de los Norovirus. Las VLP conservan la auténtica conformación de la proteína de la cápsida viral a la vez que carecen del material genético infeccioso. Por consiguiente, las VLP imitan las interacciones funcionales del virus con receptores celulares, provocando de este modo una fuerte respuesta inmunitaria a la vez que carecen de la capacidad para reproducirse o causar infección. Conjuntamente con el NIH, el Baylor College of Medicine estudió las respuestas inmunitarias humorales, mucosales y celulares a las VLP de Norovirus en voluntarios humanos en un ensayo clínico de Fase I académico patrocinado por los investigadores. Las VLP administradas por vía oral fueron seguras e inmunogénicas en adultos sanos (Ball et al., 1999; Tacket et al. 2003). En otros centros académicos, los experimentos preclínicos en modelos animales han demostrado una potenciación de las respuestas inmunitarias a las VLP cuando se administran por vía intranasal con adyuvantes de exotoxina bacteriana (Guerrero et al., 2001, Recombinant Norwalk Virus-like Particles Administered Intranasally to Mice Induce Systemic and Mucosal (Fecal and Vaginal) Immune Responses. J Virol 2001; 75; 9713; Nicollier-Jamot et al. 2004, Recombinant Virus-like Particles of a Norovirus (Genogroup II Strain) Administered Intranasally and Orally with Mucosal Adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c Mice Induce Specific Humoral and Cellular Th1/Th2-like Immune Responses. Vaccine 2004; 22:1079-1086; Periwal et al. 2003, Enhances Systemic and Mucosal Immune Responses to Recombinant Norwalk Virus- like Particle Vaccine. Vaccine 2003; 21; 376-385).

40

45

50

En la bibliografía se han descrito métodos a pequeña escala para purificar VLP de Norovirus. Por ejemplo, se ha descrito la purificación de VLP de virus Norwalk mediante ultracentrifugación (Jiang et al., 1990; 1992) y se emplea comúnmente por los investigadores en Norovirus en el campo. Sin embargo, aunque se han usado VLP purificadas mediante ultracentrifugación en ensayos clínicos en humanos, el método no es adecuado para producir cantidades a escala comercial de VLP de Calicivirus. Por consiguiente, sigue habiendo la necesidad de proporcionar un sistema de purificación escalable y eficaz capaz de purificar las VLP de varias fuentes biológicas.

55

60 **Sumario de la invención**

Los presentes solicitantes han resuelto la necesidad de sistemas de purificación escalables para VLP de Calicivirus desarrollando métodos cromatográficos adecuados para la purificación eficaz de VLP de Calicivirus. Los métodos de la invención son susceptibles de escalado para la producción comercial de VLP purificadas. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para purificar partículas similares a virus (VLP) de Calicivirus usando un proceso cromatográfico. El proceso cromatográfico utiliza más de un material cromatográfico y puede usar más de una

65

condición de fase móvil. Los materiales cromatográficos y las condiciones de fase móvil pueden tener diferentes propiedades físicas o químicas, haciendo que el proceso cromatográfico sea ortogonal. La invención se define por las reivindicaciones 1-13 adjuntas a la presente descripción.

5 Pueden seleccionarse los materiales cromatográficos y las condiciones de fase móvil para retener a las VLP. Pueden seleccionarse los materiales cromatográficos y las condiciones de fase móvil para que pasen las VLP a su través. Pueden seleccionarse los materiales cromatográficos y las condiciones de fase móvil para retener contaminantes en las preparaciones de VLP. Pueden seleccionarse los materiales cromatográficos y las condiciones de fase móvil para que los contaminantes en las preparaciones de VLP pasen a su través.

10 El proceso cromatográfico de la invención es un proceso cromatográfico de múltiples etapas que emplea dos o más etapas cromatográficas. La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas de la presente invención puede diseñarse para producir VLP que cumplan especificaciones presentes. El método de purificación de la presente invención se usa para purificar VLP en más de aproximadamente un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o más de un 99 % de pureza.

15 La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas puede diseñarse para controlar la composición de VLP resultante. La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas puede diseñarse para reducir los niveles de contaminantes a niveles considerados aceptables por las agencias reguladoras para sustancias farmacológicas de grado farmacéutico. En la invención, el nivel de contaminación del contenido de ADN de la célula hospedadora puede reducirse a menos de un 1 %, o el nivel de contaminación del contenido de proteína de la célula hospedadora puede reducirse a menos de un 5 %. La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas está diseñada para producir VLP cumpliendo con las BPF y adecuadas para ensayos farmacéuticos en seres humanos.

20 La presente invención abarca un método que comprenden poner en contacto una solución que contiene VLP con materiales cromatográficos. En este sentido, puede ponerse en contacto un lisado celular que contiene VLP con el material cromatográfico en el que el lisado celular se filtra o purifica mediante precipitación antes de ponerlo en contacto con el material cromatográfico. La solución o el lisado celular puede centrifugarse sin un gradiente de sacarosa. Una solución aclarada que contiene VLP puede ponerse en contacto con el material cromatográfico. Como alternativa, puede ponerse en contacto una solución que contiene VLP de una etapa cromatográfica con otro material cromatográfico.

25 La solución que contiene VLP puede producirse usando metodologías recombinantes. Por ejemplo, las VLP y las proteínas de VLP pueden producirse en células bacterianas, células de insecto, células de levadura, o células de mamífero.

30 La presente invención puede usar material cromatográfico que comprende resina cromatográfica en solución, resina cromatográfica en una columna o funcionalidad cromatográfica incorporada en una membrana o sobre una superficie. El material cromatográfico puede estar diseñado para la purificación de proteínas o de ácidos nucleicos. El material cromatográfico puede comprender además materiales de intercambio iónico, afinidad, interacción hidrófoba, modo mixto, fase reversa, exclusión por tamaño, y adsorción. El material de adsorción puede ser una resina o una membrana.

35 El material cromatográfico puede comprender un material basado en fosfato de calcio. El material basado en fosfato de calcio puede ser hidroxapatita.

40 El material cromatográfico puede comprender un intercambiador de iones. El intercambiador de iones puede ser un intercambiador catiónico en el que el intercambiador catiónico comprende materiales cromatográficos derivatizados con sulfato, fosfato y carboxilato. El intercambiador iónico puede ser un intercambiador aniónico, en el que el intercambiador iónico comprende material cromatográfico cargado positivamente. El material cromatográfico cargado positivamente puede ser amina cuaternaria (Q) o dietilaminoetano (DEAE).

45 El material cromatográfico puede comprender un material de interacción hidrófoba. El material de interacción hidrófoba puede comprender uno o más grupos funcionales seleccionados entre el grupo que consiste en metilo, etilo, t-butilo y fenilo. En la invención, se usa un material cromatográfico de interacción hidrófoba que es una resina de metil HIC.

50 El material cromatográfico puede comprender un material de fase reversa. El material de fase reversa puede comprender funcionalidad de C2, C4, C8 o C18. El material cromatográfico puede comprender un material cromatográfico de afinidad. El material cromatográfico de afinidad puede comprender anticuerpos, resinas secas y metales. La resina seca puede ser cibacrom azul o poliximina.

55 El material cromatográfico puede comprender un material de exclusión por tamaño en el que el material de exclusión por tamaño es una resina o una membrana. La resina o la membrana pueden comprender poros del mismo o de distinto tamaño.

La presente invención proporciona un método para purificar VLP en el que la solución que contiene VLP puede ajustarse para provocar la retención de las VLP, pasando los materiales contaminantes a través del material cromatográfico. El pH de la solución que contiene VLP puede ajustarse con un tampón a valores más ácidos (por ejemplo, pH de menos de 7). El pH de la solución que contiene VLP puede ajustarse a valores más básicos (por ejemplo, pH de más de 7). El tampón puede comprender fosfato, carboxilato, sulfato, acetato, citrato, tris o bis tris. La concentración del tampón puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 1000 mM.

Puede ajustarse la fuerza iónica de la solución que contiene VLP. La fuerza iónica puede ajustarse mediante aniones y cationes de la serie de Hofmeister, tales como sulfato de amonio. La concentración de sulfato de amonio puede ser mayor de aproximadamente 100 milimolar, o de aproximadamente 1, 2, o 2,4 molar.

La fuerza iónica puede ajustarse mediante la adición de una sal de fosfato. La sal de fosfato puede ser fosfato de sodio. La concentración del fosfato de sodio puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 500 mM. La concentración del fosfato de sodio puede ser de aproximadamente 100 mM.

El pH del material cromatográfico puede ajustarse antes de la aplicación de VLP mediante equilibrado con un tampón para provocar la retención de las VLP. El pH puede ajustarse a valores ácidos (por ejemplo, menores de 7), valores básicos (por ejemplo, mayores de 7), o valores neutros (por ejemplo, iguales a 7). El tampón de equilibrado puede comprender fosfato, carboxilato, sulfato, acetato, citrato, tris o bis tris.

La fuerza iónica del material cromatográfico puede ajustarse para provocar la retención de las VLP. El ajuste puede lograrse mediante la adición de sal. La sal puede comprender cationes y aniones de la serie de Hofmeister, tales como sulfato de amonio. La concentración de sulfato de amonio puede ser mayor de aproximadamente 1, 2, o 2,4 molar.

La fuerza iónica del material cromatográfico puede ajustarse mediante la adición de una sal de fosfato. La sal de fosfato puede ser fosfato de sodio. La concentración del fosfato de sodio puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 500 mM. En una realización, la concentración de fosfato de sodio es de aproximadamente 100 mM.

La concentración de disolvente orgánico de la solución que contiene VLP puede ajustarse para provocar la retención de las VLP.

La presente invención proporciona además métodos para purificar las VLP mediante los cuales las soluciones que contienen VLP y los materiales cromatográficos pueden seleccionarse para provocar la retención de los materiales contaminantes pasando las VLP a través de la resina cromatográfica. Al hacer esto, el pH de la solución que contiene VLP puede ajustarse con un tampón, por ejemplo, ajustando el pH a menos de 7 o a mayor o igual a 7. El tampón puede comprender fosfato, carboxilato, sulfato, acetato, citrato, tris o bis tris. La concentración del tampón puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 1000 mM.

La fuerza iónica de la solución que contiene VLP puede ajustarse para provocar la retención de los materiales contaminantes pasando las VLP a través del material cromatográfico. Esto puede lograrse mediante la adición de sal, en la que la sal puede comprender cationes y aniones de la serie de Hofmeister, tales como fosfato de sodio. La concentración del fosfato de sodio puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 500 mM. La concentración del fosfato de sodio puede ser de aproximadamente 100 mM.

El pH del material cromatográfico puede ajustarse antes de la aplicación de VLP mediante equilibrado con un tampón para provocar la retención de los materiales contaminantes pasando las VLP a través de la resina cromatográfica. El pH puede ajustarse a menos de 7 o a más o igual a 7 con un tampón que puede comprender fosfato, carboxilato, o sulfato.

La fuerza iónica del material cromatográfico puede ajustarse antes de la aplicación de VLP mediante equilibrado con un tampón para provocar la retención de los materiales contaminantes pasando las VLP a través de la resina cromatográfica. La fuerza iónica se ajusta mediante la adición de sal. La sal comprende cationes y aniones de la serie de Hofmeister, tales como fosfato de sodio. La concentración del fosfato de sodio puede ser mayor de aproximadamente 10 mM.

La unión y la elución de las VLP puede controlarse mediante la cantidad de disolvente orgánico presente en la fase móvil. La concentración de disolvente orgánico de la solución que contiene VLP también puede ajustarse para provocar la retención de materiales contaminantes. El disolvente orgánico puede ser un alcohol, tal como metanol, etanol o propanol u otros disolventes orgánicos miscibles en agua, tales como acetonitrilo.

La presente invención proporciona un método para purificar VLP a partir de partículas similares a virus (VLP) de Calicivirus, tales como VLP de Norovirus y Sapovirus. El Norovirus comprende Norovirus del Genogrupo I, Genogrupo II, Genogrupo III, y Genogrupo IV. El Sapovirus comprende cinco Genogrupos (I-V), entre los que solo los Genogrupos I, II, IV, y V se sabe que infectan a seres humanos (Farkas et al., 2004, Genetic diversity among

sapoviruses. Arch Virol. 2004;149:1309-23).

La presente divulgación proporciona además un agente farmacéutico preparado mediante el proceso cromatográfico de múltiples etapas. El agente farmacéutico puede ser una vacuna, tal como una vacuna de Norovirus.

5 La presente divulgación proporciona además un reactivo analítico preparado mediante el proceso cromatográfico de múltiples etapas descrito en el presente documento. El reactivo analítico puede purificarse hasta un nivel de purificación deseado, que puede usarse en un ensayo o kit diagnóstico.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gel de ejemplo que muestra cambios en la pureza de las VLP en función de la etapa cromatográfica.

15 La figura 2 es un gel SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de columna de cromatografía de hidroxilapatita.

La figura 3 es un gel SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de columna de cromatografía de HIC.

La figura 4 es un gel SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de columna de cromatografía de DEAE.

La figura 5 es un gel SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de diafiltración.

20 La figura 6 es una imagen de una micrografía electrónica de transmisión de VLP de virus Norwalk purificadas cromatográficamente. Las partículas son del intervalo de aproximadamente 34 a 38 nM de tamaño.

La figura 7 es una imagen de una micrografía electrónica de transmisión de VLP de virus Norwalk purificadas mediante ultracentrifugación. Estas partículas tienen también un tamaño de 34 a 38 nM.

La figura 8 es una gráfica que muestra espectros de CD de VLP purificadas en columna a 10 °C (línea discontinua) y a 90 °C (línea continua) en función del pH.

25 La figura 9 es una gráfica que muestra la señal de CD de VLP purificadas en columna controlada a 205 nm en función de la temperatura y el pH.

La figura 10 es una gráfica que muestra la señal de CD de VLP purificadas en columna controlada a 222 nm en función de la temperatura y el pH.

30 La figura 11 es una gráfica que muestra espectros de CD a 10 °C (línea discontinua) y a 90 °C (línea continua) en función del pH, de VLP purificadas mediante ultracentrifugación.

La figura 12 es una gráfica que muestra los espectros de CD a 205 nm en función de la temperatura y pH de VLP purificadas mediante ultracentrifugación.

La figura 13 es una gráfica que muestra la señal de CD controlada a 222 nm en función de la temperatura y el pH, de VLP purificadas mediante ultracentrifugación.

35 La figura 14 es un cromatograma de la etapa de purificación de intercambio catiónico usada para VLP de virus Houston.

La figura 15 es un gel de SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de intercambio catiónico de VLP del virus Houston.

40 La figura 16 es un cromatograma de la etapa de purificación por cromatografía de metil HIC usada para VLP del virus Houston.

La figura 17 es un gel de SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de metil HIC de VLP del virus Houston.

La figura 18 es un gel SDS-PAGE/tinción de Coomassie de proteína del virus Houston purificada.

La figura 19 es un cromatograma de HPLC-SEC de proteína del virus Houston purificada.

45 Figura 20. Gel de SDS-PAGE con tinción de plata que muestra la purificación de una preparación de VLP de Houston con una precipitación de sulfato de amonio al 20 %. "Suspensión Am." es la suspensión inicial de sulfato de amonio. "Sob. am." es el sobrenadante resultante cuando se centrifuga la suspensión de sulfato de amonio. "Sob. Citrato" es el material precipitado disuelto. Es interesante el carril "Sob. Am." que destaca la cantidad de material contaminante no precipitado.

50 Figura 21. Gráfica que compara los componentes de la preparación inicial de VLP de Houston con el material de sulfato de amonio precipitado y vuelto a disolver. Cabe destacar la mejora significativa en la pureza en la preparación de sulfato de amonio al 20 % por la disminución en el porcentaje de proteína de célula hospedadora a VLP (% HCP/VLP).

55 Figura 22. Gel de SDS-PAGE con tinción de plata que ilustra el proceso de purificación de VLP de Houston con precipitación seguida por cromatografía de intercambio aniónico. Tal como se muestra comparando el carril 2 con los carriles 5 y 6, la precipitación de las VLP con ajuste de pH aumenta la pureza. El carril 8 ilustra la capacidad de la cromatografía en columna para concentrar las VLP.

60 Figura 23. Gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie que muestra el proceso de purificación de VLP de Laurens con precipitación seguida de cromatografía de intercambio aniónico. Una comparación de los carriles 5 a 8 con el carril 11 ilustra el aumento en la pureza de muestras de VLP de Laurens obtenidas con cromatografía de captura.

65 Figura 24. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus GI a varios valores de pH. Panel A. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus G1 a pH 2. El pico de absorbancia aproximadamente a los 17 min corresponde a la elución de VLP intactas monodispersas. Panel B. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus GI a pH 8. El pico de absorbancia aproximadamente a los 16 min corresponde a la elución de VLP intactas monodispersas. Panel C. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus GI a pH 8,5. El pico de absorbancia aproximadamente a los 33 min corresponde a la elución del fragmento intermedio estable de las VLP. Los cromatogramas muestran los perfiles

de absorbancia a 230 nm (superior) y 280 nm (inferior).

Figura 25. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus GII a varios niveles de pH. Panel A. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus GII a pH 2. El pico de absorbancia aproximadamente a los 17 min corresponde a la elución de VLP intactas monodispersas. Panel B. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus GII a pH 9,5. El pico de absorbancia aproximadamente a los 17 min corresponde a la elución de VLP intactas monodispersas. Panel C. Análisis de SE-HPLC de VLP de Norovirus GII a pH 10. El pico de absorbancia aproximadamente a los 34 min corresponde a la elución del fragmento intermedio estable de las VLP. Los cromatogramas muestran los perfiles de absorbancia a 230 nm (superior) y 280 nm (inferior).

10 Descripción detallada de la invención

Descripción general

La presente invención se refiere a un método para la purificación de partículas similares a virus (VLP) de Calicivirus, incluyendo VLP de Norovirus y VLP de Sapovirus. Por "Norovirus", "Norovirus (NOR)", "norovirus" y equivalentes gramaticales en el presente documento, se entiende miembros del género Norovirus de la familia Caliciviridae. Un Norovirus puede incluir un grupo de virus de ARN monocatenario de sentido positivo no envueltos que pueden ser infecciosos para seres humanos o para especies de mamífero no humanas. Un Norovirus puede provocar gastroenteritis aguda en seres humanos. Los Norovirus también pueden citarse como virus pequeños de estructura redonda (SRSV) que tienen una estructura superficial definida o borde irregular cuando se observan mediante microscopía electrónica. Entre los Norovirus se incluyen al menos cuatro genogrupos (GI-IV) definidos por secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos, que comprenden 15 agrupaciones genéticas. Los genogrupos principales son GI y GII. GIII y GIV están propuestos aunque se aceptan generalmente. El GIII representativo es el bovino, de cepa Jena. GIV contiene un virus, Alphantron, en estos momentos. Para una descripción adicional de los Norovirus véase Vinje et al., J. Clin. Micro. 41:1423-1433 (2003). Por "Norovirus" también se entiende en el presente documento partículas similares a virus de Norovirus recombinantes (rNOR VLP). La expresión recombinante de al menos la proteína de la cápsida de Norovirus codificada por el ORF2 en células, por ejemplo, a partir de un vector de baculovirus en células Sf9, puede dar como resultado el automontaje espontáneo de la proteína de la cápsida en VLP. La expresión recombinante de al menos las proteínas de Norovirus codificadas por el ORF2 y ORF3 en células, por ejemplo, a partir de un vector de baculovirus en células Sf9, puede dar como resultado el automontaje espontáneo de la proteína de la cápsida en VLP. Las VLP son similares estructuralmente a los Norovirus pero carecen del genoma de ARN viral y por lo tanto no son infecciosas. Por consiguiente, "Norovirus" incluye viriones que pueden ser partículas infecciosas o no infecciosas, que incluyen partículas defectuosas o defectuosas-interferentes.

Los ejemplos no limitantes de Norovirus incluyen el virus Norwalk (NV, GenBank M87661, NP₀₅₆₈₂₁), virus Southampton (SHV, GenBank L07418), el virus Desert Shield (DSV, U04469), el virus Hesse (HSV), el virus Chiba (CHV, GenBank AB042808), el virus Hawaii (HV, GenBank U0761 1), el virus Snow Mountain (SMV, GenBank U70059), el virus Toronto (TV, Leite et al., Arch. Virol. 141:865-875), el virus Briston (BV), el virus Jena (JV, AJ01099), el virus Maryland (MV, AY032605), el virus Seto (SV, GenBank AB031013), Camberwell (CV, AF145896), el virus Lordsdale (LV, GenBank X86557), el virus Grimsby (GrV, AJ004864), el virus Mexico (MXV, GenBank U22498), Boxer (AF538679), C59 (AF435807), VA115 (AY038598), BUDS (AY660568), el virus Houston (HoV, AY502023), MOH (AF397156), Parris Island (PiV; AY652979), VA387 (AY038600), VA207 (AY038599), y Operation Iraqi Freedom (OIF, AY675554). Los ejemplos no limitantes de Sapovirus incluyen el virus Sapporo (SV), Houston/86 [U95643] (Hu/SLV/Hou/1986/US), Houston/90 [U95644] (Hu/SLV/Hou 27/1990/US), London 29845 [U95645] (Hu/SLV/Lon 29845/1992/UK), el virus Manchester [X86560] (Hu/SLV/Man/1993/UK), el virus Parkville [U73124] (Hu/SLV/Park/1994/US), el virus Sapporo [U65427] (Hu/SLV/SV/1982/JP). Aún siguen identificándose cepas virales adicionales de Calicivirus y se contemplan para su uso en los métodos de la presente invención (ICTVdb - The Universal Virus Database, versión 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>). Puede usarse un criptograma con fines de identificación y se organiza del siguiente modo: especie hospedadora de la que se aisló el virus/abreviatura del género/abreviatura de la especie/nombre de la cepa/año de aparición/país de origen. (Green et al., Human Caliciviruses, en Fields Virology Vol. 1 841-874 (Knipe y Howley, editores jefe, 4ª ed., Lippincott Williams & Wilkins 2001)). Los ejemplos representativos de purificación de VLP de virus Norwalk y de VLP de virus Houston se discuten en el presente documento.

Por "preparación de VLP" se entiende cualquier solución que contenga VLP, y otros materiales que se pretenden purificar. La preparación de VLP puede producirse mediante una serie de métodos, incluyendo el cultivo en una célula hospedadora *in vivo* incluyendo cualquiera de los métodos por lotes, perfusión, o factoria celular, o *in vivo* en un hospedador animal adecuado. En el caso anterior, pueden cosecharse células infectadas por virus, separarse del medio de crecimiento, y la proteína de las VLP bien separarse en el medio mediante un proceso de brotación o liberarse mediante lisis de las células y separación de los restos celulares. En el último caso, puede eliminarse un tejido u órgano portador del virus y liberarse también las proteínas de VLP mediante la lisis de las células que comprenden el tejido u órgano, y separarse de los restos celulares/de tejido.

Tal como se usa en el presente documento, "partículas similares a virus o VLP" se refieren a partículas similares a virus, fragmentos, o porciones de las mismas producidas a partir de una secuencia codificante de la proteína de la

cápsida de Calicivirus y que comprenden características antigénicas similares a aquellas de las partículas infecciosas de Calicivirus. Las VLP pueden ser cualquier proteína estructural en las que las proteínas estructurales están codificadas por una o más secuencia de ácido nucleico. Las VLP pueden incluir proteínas estructurales individuales, es decir, monómeros de proteína, o dímeros, o complejos de proteína formados espontáneamente tras la purificación de proteínas estructurales recombinantes, es decir, autoensamblaje de VLP intactas, o VLP agregadas. Las VLP también pueden estar en forma de monómeros de cápsida, fragmentos de proteína o peptídicos de VLP o monómeros de cápsida, o agregados o mezclas de los mismos. Estos pueden producirse usando fragmentos de proteínas estructurales o formas mutadas de los mismos, por ejemplo, proteínas estructurales que se han modificado mediante la adición, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos. Las VLP son morfológicamente y antigénicamente similar a viriones auténticos. Las VLP pueden producirse *in vivo*, en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, células de mamífero, levaduras, bacterianas, y de insecto hospedadoras.

La presente invención proporciona métodos para la purificación a gran escala de VLP recombinantes. Los métodos incluyen preparar una solución, un lisado celular o sobrenadante de cultivo a partir de la línea celular hospedadora y después pasando el lisado o sobrenadante de cultivo sobre varias combinaciones de materiales o medio de cromatografía. La línea celular hospedadora puede cultivarse en placas de Petri, botellas rotatorias, un biorreactor, o usando otra técnica adecuada para cultivo celular a gran escala.

Un experto en la materia apreciará que en principio, pueden purificarse otras partículas similares a virus usando el proceso de la presente invención adaptando algunas de sus características según sea adecuado para la VLP que se esté purificando. Las VLP adecuadas son aquellas que se purifican fácilmente usando múltiples etapas cromatográficas en el proceso de purificación, materiales cromatográficos, tales como materiales de cromatografía de hidroxilapatita, interacción hidrófoba, intercambio iónico y exclusión por tamaño.

Una "célula bacteriana" se define en el presente documento como incluyente de células procariotas que pueden propagarse en cultivo. La célula bacteriana puede actuar como célula hospedadora para la expresión recombinante de proteínas heterólogas. La célula bacteriana puede transformarse, transfectarse o infectarse con un vector para la expresión de una secuencia de proteína insertada en el vector. Los ejemplos de células bacterianas adecuadas incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, *B. megaterium*, *B. subtilis* y *B. brevis* y varias especies de *Caulobacter*, *Staphylococcus*, y *Streptomyces*.

Una "célula de levadura" se define en el presente documento como incluyente del grupo que consiste en organismos pequeños unicelulares capaces de crecer y reproducirse mediante gemación o división directa (fisión), o mediante crecimiento como filamentos irregulares individuales (micelio). La célula de levadura puede transformarse o transfectarse con un vector heterólogo para la expresión de una secuencia de ácido nucleico insertada en el vector heterólogo. Un ejemplo de una célula de levadura incluye *Saccharomyces cerevisiae*, usado comúnmente para la transfección y expresión de proteínas heterólogas.

Un "cultivo celular de mamífero" se define en el presente documento como incluyente del grupo de células procedentes de una fuente de mamífero capaz de sobrevivir *ex vivo* en un medio de cultivo celular. La célula de mamífero puede ser una célula primaria, procedente directamente de una fuente celular de mamífero. Más normalmente, se immortalizará la célula de mamífero en un cultivo celular de mamífero, es decir, capaz de crecer y dividirse a lo largo de un número indeterminado de pases o divisiones.

Una "célula de insecto" se define en el presente documento como incluyente del grupo de células procedente de una fuente de insecto capaz de sobrevivir *ex vivo* a partir de un hospedador de insecto. La célula de insecto puede transformarse, transfectarse o infectarse con un vector heterólogo para la expresión de una secuencia de proteína insertada en el vector heterólogo. Los ejemplos de células de insecto incluyen células High Five™, células de *Aedes albopictus*, células de *Drosophila melanogaster*, células de insecto Sf9 y células de *Mamestra brassicae*.

La "lisis" se refiere al proceso de apertura de células infectadas por virus por medios químicos, o físicos, o como parte del ciclo viral permitiendo de este modo la recogida de VLP.

Por "material cromatográfico poroso" se entiende virtualmente cualquier tipo de material usado comúnmente en la separación de moléculas basadas principalmente en su tamaño, hidrofobicidad y carga. Tal como se ejemplifica en el presente documento, el "material cromatográfico poroso" incluye dextrano (por ejemplo, resinas Sephadex™), u otros materiales porosos que pueden estar compuestos por diversos materiales incluyendo agarosa, poliestireno, divinilbenceno, polimetacrilato, sílice, polímeros acrílicos alifáticos (por ejemplo, resinas Amberlite™), con diversas derivatizaciones superficiales (por ejemplo, hidrófilas, iónicas, hidrófobas, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, el término "precipitación" se refiere al ajuste de las condiciones de disolución mediante la adición o retirada de sal, la adición de disolvente orgánico, la concentración de la solución que contiene proteína o el ajuste del pH, dando como resultado la precipitación selectiva de moléculas (VLP o contaminante). El material insoluble o precipitado se separa entonces del material soluble usando una serie de técnicas, tales como centrifugación o filtración.

"Cromatografía de hidroxilapatita" se refiere a un método para purificar proteínas que utiliza fosfato de calcio

hidroxilado insoluble, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que forma tanto la matriz como ligandos. Los grupos funcionales consisten en pares de iones de calcio cargados positivamente (sitios C) y agrupaciones de grupos fosfato cargados negativamente (sitios P). Las interacciones entre la hidroxiapatita y las proteínas son complejas y multimodales. En un método de interacción, sin embargo, los grupos amino cargados positivamente sobre las proteínas se asocian con los sitios P cargados negativamente y los grupos carboxilo de las proteínas interactúan mediante complejación de coordinación con sitios C. Shepard, J. of Chromatography 891:93-98 (2000). La hidroxiapatita cristalina fue el primer tipo de hidroxiapatita usada en cromatografía, pero su uso estaba limitado por dificultades estructurales. La cromatografía de hidroxiapatita cerámica (cHA) se desarrolló para superar algunas de las dificultades asociadas con la hidroxiapatita cristalina, tales como los caudales limitados. La hidroxiapatita cerámica tiene una alta durabilidad, buena capacidad de unión a proteínas, y puede usarse con caudales y presiones mayores que la hidroxiapatita cerámica. Vola et al., BioTechniques 14:650-655 (1993).

Por "cromatografía de exclusión por tamaño" se entiende un método para separar moléculas usando material cromatográfico poroso. La cromatografía de exclusión por tamaño puede consistir en uno o más tipos de material cromatográfico poroso usado en una sola etapa, o en uno o más tipos distintos de material cromatográfico poroso usado en múltiples etapas separadas. Tal como se usa en el presente documento, un ejemplo de "cromatografía de exclusión por tamaño", donde se usa más de un material cromatográfico poro es Amberlite™ XAD7HP y Sephadex™ G-50.

Un "material de afinidad" es un material en estado sólido unido a un sustrato o ligando, que a su vez se une selectivamente a una proteína de interés o a una proteína unida a un marcador de afinidad. Tras la unión, la proteína de interés se retiene en la columna u otro aparato de purificación, y por lo tanto puede separarse de cualquier impureza presente en la preparación de VLP. Después del lavado de la matriz de afinidad, la proteína de interés, puede eluirse de la columna o de otro aparato de una manera sustancialmente purificada. Los ejemplos de matrices de afinidad incluyen medio cromatográfico, tal como agarosa, celulosa, Sepharose, Sephadex y otros medios cromatográficos, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, filtros, membranas y otros materiales en estado sólido unidos a ligandos o sustratos que se unen al marcador de afinidad de elección.

Tal como se usa en el presente documento, "purificar" una proteína significa reducir hasta un nivel de pureza dado las cantidades de elementos exógenos o que plantean objeciones, especialmente macromoléculas biológicas, tales como proteínas o ADN, que pueden estar presentes en una muestra de la proteína. Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden usarse para purificar VLP a más de aproximadamente un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de un 99 % de pureza. La presencia de proteínas exógenas puede ensayarse mediante cualquier método adecuado incluyendo, pero sin limitación, electroforesis en gel y tinción o análisis de transferencia de Western, HPLC y/o ELISA. La presencia de ADN puede ensayarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo electroforesis en gel y tinción, proteínas de unión a ADN y/o ensayos que emplean reacción en cadena de la polimerasa.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "material cromatográfico", "medio cromatográfico", "matriz cromatográfica" y "resina cromatográfica" y sus equivalentes gramaticales se usan de manera intercambiable a lo largo de la presente memoria descriptiva.

Descripción del procedimiento de purificación.

La presente invención se refiere a la purificación de partículas similares a virus (VLP) de fuentes de materiales biológicos. Más específicamente, se refiere al uso de métodos cromatográficos como medio para eliminar impurezas y contaminantes que pueden ser perjudiciales para la integridad de las VLP recombinantes o su uso posterior.

La invención divulgada contempla el uso de diversas etapas cromatográficas para purificar VLP a partir de una fuente biológica. Los diferentes materiales cromatográficos, usados en diversos órdenes y combinaciones, están contemplados por la presente invención. La etapa cromatográfica utiliza más de un material cromatográfico. Puede usarse más de una condición de fase móvil. Los materiales cromatográficos y las condiciones de fase móvil pueden tener diferentes propiedades físicas o químicas, y por lo tanto son ortogonales.

Los materiales cromatográficos incluyen, pero sin limitación, intercambio iónico, afinidad, interacción hidrófoba, modo mixto, fase reversa, exclusión por tamaño, y adsorción. La invención contempla muchos medios de soporte, incluyendo agarosa, celulosa, sílice, y poli(estireno-divinilbenceno) (PSDVB). Los métodos cromatográficos que pueden usarse incluyen cromatografía convencional, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía líquida de alta presión), o cromatografía de perfusión. Un experto en la materia también apreciará que el tamaño de la columna (es decir, el diámetro y la longitud) dependerá de varios factores, tales como el volumen de material que se va a cargar, la concentración de VLP que se van a purificar, y de la resolución o pureza deseadas. La invención se define por las reivindicaciones 1-13 adjuntas a la presente descripción.

Preparación de lisado celular

La práctica de la invención emplea técnicas de biología molecular, análisis de proteínas y microbiología, que se encuentran dentro de las capacidades de un experto en la materia. Dichas técnicas se explican en detalle en, por

ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Nueva York, 1995.

Las VLP pueden purificarse a partir de lisados celulares de una serie de fuentes biológicas, incluyendo líneas celulares, tejidos, etc. A menudo, las VLP se purificarán a partir de una preparación de lisado celular producida a partir de células infectadas por virus, donde las células han crecido usando métodos de cultivo celular. Los lisados celulares que contienen VLP pueden producirse usando metodologías recombinantes. Por ejemplo, las VLP y las proteínas de VLP pueden producirse en células bacterianas, células de insecto, células de levadura, o células de mamífero. Por ejemplo, las VLP de Norovirus pueden aislarse a partir de células SF9 infectadas por Baculovirus, etc. Las células pueden infectarse a una alta multiplicidad de infección para optimizar el rendimiento.

Puede utilizarse cualquier método adecuado para liberar proteínas de VLP de células infectadas para preparar un lisado celular que contenga VLP. Las proteínas de VLP también pueden liberarse en el medio de crecimiento mediante un proceso de gemación. Las VLP pueden recuperarse mediante separación a partir de los medios y restos celulares o liberarse a partir de células infectadas usando técnicas conocidas en la técnica. Los métodos para lisar células infectadas por virus pueden incluir el uso de solución hipotónica, solución hipertónica, sonicación, presión, o un detergente. La técnica puede usar un detergente. Dependiendo de la cantidad de ADN y ARN en la muestra, la técnica también puede usar una nucleasa en combinación con un detergente.

Hay numerosos detergentes disponibles para solubilizar células, incluyendo detergentes no iónicos o iónicos. Puede usarse un agente enzimático para tratar el lisado celular que consiste en una o más enzimas, preferentemente una RNasa y/o una DNasa, o una mezcla de endonucleasas, tal como se conoce por un experto habitual en la técnica. Se sabe bien que los ácidos nucleicos pueden adherirse a material celular que puede interferir con el esquema de purificación cromatográfica de la invención causando agregación celular o viral, dando como resultado poca o ninguna recuperación de VLP.

Aclareamiento

Antes de la etapa de aclareamiento, la preparación de lisado celular después del tratamiento con detergente, o si se prefiere, detergente y nucleasa, puede tratarse para eliminar materiales particulados grandes. Esto puede lograrse mediante una serie de procedimientos incluyendo centrifugación a baja velocidad, o filtración. El tipo de filtro o membrana usada (es decir, composición y tamaño de poro) se encuentra dentro del conocimiento del experto en la materia para purificar VLP particulares.

La invención puede implicar el aclareamiento mediante precipitación. Las proteínas de VLP deseadas pueden recuperarse a partir del lisado celular o el sobrenadante de cultivo mediante el uso de técnicas de precipitación bien conocidas para los expertos en la materia, tales como el uso de agentes de precipitación de proteínas incluyendo, pero no exclusivamente, PEG, sulfato de sodio, sulfato de amonio, glicina o temperatura. La precipitación se lleva a cabo preferentemente con concentraciones seleccionadas cuidadosamente de los agentes químicos y esto reduce la precipitación conjunta de proteínas contaminantes. Las proteínas precipitadas se separan entonces a partir de materiales solubles mediante filtración o mediante centrifugación. Las VLP pueden precipitarse reduciendo la fuerza iónica de la solución mediante la adición de agua desionizada. Las VLP pueden precipitarse mediante la adición de sulfato de amonio. Las VLP precipitadas se recogen entonces usando una centrifugación a baja velocidad y se resuspenden en tampón.

La invención puede implicar el aclareamiento usando materiales cromatográficos porosos. Al purificar las VLP a partir de determinados lisados celulares y dependiendo de la cantidad de agregados celulares presentes, puede ser deseable usar un solo material cromatográfico poroso para llevar a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño. En estos casos, puede ser suficiente emplear una etapa de preaclareamiento (es decir, filtración), seguido de cromatografía de exclusión por tamaño usando un solo material cromatográfico poroso hecho principalmente de dextrano, y más preferentemente determinadas resinas Sephadex™. En general, se somete a aclareamiento un lisado celular o sobrenadante de cultivo, obtenido por medios que se conocen bien en la técnica.

La presente invención puede usar material cromatográfico que comprende resina cromatográfica en solución, resina cromatográfica en una columna o funcionalidad cromatográfica incorporada en una membrana o sobre una superficie. Por "membrana" se entiende virtualmente cualquier tipo de material usado comúnmente en la separación de moléculas basadas principalmente en su tamaño. Tal como se ejemplifica en el presente documento, "membrana" incluye filtros u otros materiales porosos que pueden usarse para la separación de moléculas.

El material cromatográfico puede estar diseñado para la purificación de proteínas o de ácidos nucleicos. El material cromatográfico puede comprender además materiales de intercambio iónico, afinidad, interacción hidrófoba, modo mixto, fase reversa, exclusión por tamaño, y adsorción. Los materiales cromatográficos ejemplares de la presente invención se describen en más detalle más adelante. Debe entenderse que los materiales cromatográficos se proporcionan con fines solo ilustrativos y la invención no debe entenderse como limitada a estos materiales cromatográficos.

Los métodos cromatográficos discutidos más adelante pueden ejecutarse como etapas individuales, o de manera

secuencial, o en tándem. Por "en tándem" se entiende que un eluido de una cromatografía se aplica directamente a la siguiente cromatografía sin una etapa de recogida del eluido intermedia. Como alternativa, las fracciones de un eluido pueden agruparse y recogerse antes de aplicarse a la siguiente cromatografía.

5 Material cromatográfico de hidroxiapatita

El material cromatográfico puede comprender un material basado en fosfato de calcio. El material basado en fosfato de calcio puede ser hidroxiapatita. Hay disponibles comercialmente varios materiales o resinas cromatográficas de hidroxiapatita, y puede usarse cualquier forma disponible del material en la práctica de la presente invención. En una realización de la invención, la hidroxiapatita está en forma cristalina. Las hidroxiapatitas para su uso en la presente invención pueden ser aquellas que se aglomeran para formar partículas y se sinterizan a altas temperaturas en una masa cerámica porosa estable.

El tamaño de partícula de la hidroxiapatita puede variar ampliamente, pero un tamaño de partícula típico se encuentra en el intervalo de 1 µm a 1.000 µm de diámetro, y puede ser de 10 µm a 100 µm. En una realización de la invención, el tamaño de partícula es de 20 µm. En otra realización de la invención, el tamaño de partícula es de 40 µm. En otra realización más de la invención, el tamaño de partícula es de 80 µm.

La invención puede usarse con resina de hidroxiapatita suelta, empaquetada en una columna, o en una cromatografía anular continua. La hidroxiapatita cerámica puede empaquetarse en una columna. La selección de las dimensiones de columna pueden determinarse por el experto en la materia. Puede usarse un diámetro de columna de al menos 0,5 cm con una altura del lecho de aproximadamente 20 cm para purificación a pequeña escala. Puede usarse un diámetro de columna de desde aproximadamente 35 cm a aproximadamente 60 cm. Puede usarse un diámetro de columna de desde 60 cm a 85 cm.

El eluido de la columna de hidroxiapatita que contiene VLP puede agruparse y aplicarse a otra resina cromatográfica, tal como la resina cromatográfica de interacción hidrófoba.

30 Material cromatográfico de interacción hidrófoba

En la invención, un material cromatográfico usado comprende un material de interacción hidrófoba específico, es decir, una resina de interacción hidrófoba de metilo. Los materiales de interacción hidrófoba comprenden uno o más grupos funcionales seleccionados entre el grupo que consiste en metilo, etilo, t-butilo y fenilo.

La cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") es una técnica valiosa para la separación de proteínas en condiciones de alta salinidad (véase, en general, HPLC of Biological Macromolecules. Methods and Applications, Gooding, K. M. et al., Eds., Marcel Dekker, Inc. (1990)). Con respecto a proteínas, la separación por HIC se basa en las interacciones de los restos de aminoácidos hidrófobos de la proteína con restos hidrófobos inmovilizados sobre un soporte cromatográfico. Los restos hidrófobos inmovilizados pueden seleccionarse entre una gran variedad de grupos alquilo y arilo. El PEG es un resto inmovilizado que se usa comúnmente en la cromatografía HIC. La hidrofobicidad del resto aumenta a medida que aumenta la longitud del alquilo. La proteína se adsorbe en la columna con alta salinidad ($\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 1-3 M), y se eluye disminuyendo la fuerza iónica. Los métodos para llevar a cabo HIC se describen por Cameron, G. W. et al. (Meth. Molec. Cell. Biol. 4:184-188 (1993)), Raymond, J. et al. (J. Chromatog. 212:199-209 (1981)), Ochoa, J. I. (Biochimie 60:1-15 (1978)), Roggenbuck, D. et al. (J. Immunol. Meth. 167:207-218 (1994)), Michaelson, S. et al., (Pol. J. Food Nutr. Sci. 3/44:5-44 (1994)), Rippel, G. et al. (J. Chromatog. 668:301-312 (1994)), Szepesy, L. et al., (J. Chromatog. 668:337-344 (1994)), Huddleston, J. G. et al. (Biotechnol. Bioeng. 44:626-635 (1994)), Watanabe, E. et al. (Ann. NY Acad. Sci. 721:348-364 (1994)), todos los cuales se incorporan al presente documento por referencia.

Diversas químicas de columna de HIC disponibles comercialmente que abarcan una gran variedad de hidrofobicidades deben hacer posible encontrar un ligando adecuado que permita la separación cromatográfica. Por ejemplo, las columnas de HIC puede comprarse a través de Synchrom y Bio-Rad (Hercules, Calif.) que abarcan el abanico completo de ligandos alquilo y aromáticos.

55 Material cromatográfico de exclusión por tamaño

El material cromatográfico puede comprender un material de exclusión por tamaño en el que el material de exclusión por tamaño es una resina o una membrana. Tal como se pretende en el presente documento, la cromatografía de exclusión por tamaño implica separar moléculas basándose principalmente en su tamaño. La matriz usada para la exclusión por tamaño es preferentemente un medio de gel inerte que puede ser un material compuesto de polisacáridos reticulados, por ejemplo, agarosa reticulada y/o dextrano en forma de perlas esféricas. El grado de reticulación determina el tamaño de los poros que están presente en las perlas de gel hinchadas. Las moléculas mayores de un determinado tamaño no atraviesan las perlas de gel y por lo tanto se mueven a través del lecho cromatográfico más rápidamente. Las moléculas más pequeñas, tales como de detergente, proteína, ADN y similares, que entran en las perlas de gel en diverso grado dependiendo de su tamaño y forma, quedan retenidas a su paso a través del lecho. Por tanto, las moléculas se eluyen generalmente en orden de tamaño molecular

decreciente.

Las resinas cromatográficas porosas adecuadas para la cromatografía de exclusión por tamaño de virus pueden estar hechas de dextrano, y dextranos reticulados. Las usadas de manera más común son aquellas con el nombre comercial "SEPHADEX" disponibles a través de Amersham Biosciences. El tipo de SEPHADEX, u otra resina cromatográfica de exclusión por tamaño usada va en función del tipo de VLP que se quiera purificar, y de la naturaleza del lisado de cultivo celular que contiene la VLP. También son adecuados otros soportes de exclusión por tamaño de diferentes materiales, por ejemplo, Toyopearl 55F (polimetacrilato, de Tosoh Bioscience, Montgomery Pa.) y Bio-Gel P-30 Fine (BioRad Laboratories, Hercules, Calif.).

Para la cromatografía de exclusión por tamaño se carga un grupo concentrado de VLP parcialmente purificadas sobre una columna que contiene una columna de cromatografía de exclusión por tamaño preparativa adecuada (tal como una columna que contiene resinas Sephadex G200 o Superpose 6) que se han equilibrado en un tampón adecuado (por ejemplo, un tampón fosfato).

La divulgación proporciona materiales cromatográficos que comprenden un intercambiador de iones. Un intercambiador de iones puede ser un intercambiador catiónico en el que el intercambiador catiónico comprende materiales cromatográficos derivatizados con sulfato, fosfato y carboxilato. El intercambiador iónico también puede ser un intercambiador aniónico, en el que el intercambiador aniónico comprende material cromatográfico cargado positivamente. El material cromatográfico cargado positivamente puede ser amina cuaternaria (Q) o dietilaminoetano (DEAE).

Material cromatográfico de intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio aniónico usa un resto orgánico cargado positivamente reticulado covalentemente a un armazón polimérico inerte. Este último se usa como soporte para la resina. Los restos orgánicos representativos se extraen entre grupos de amina primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria; tales como trimetilaminoetilo (TMAE), dietilaminoetilo (DEAE), dimetilaminoetilo (DMAE), y otros grupos, tales como la polietilenimina (PEI) que ya tienen, o tendrán, una carga positiva formal dentro del intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9.

Puede usarse una resina de intercambio aniónico que consiste en DMAE, TMAE, DEAE o grupos de amonio cuaternario. Una serie de resinas de intercambio aniónico vendidas con el nombre comercial Fractogel (Novagen) usan TMAE, DEAE, DMAE como resto cargado positivamente, y un fondo de copolímero de metacrilato. Las resinas que usan resinas de amonio cuaternario y las resinas de amonio cuaternario del tipo vendido con el nombre comercial Q SOURCE-30 (Amersham Biosciences) también pueden usarse. Q SOURCE-30 tiene un soporte hecho de poliestireno reticulado con divinilbenceno.

Se conocen en la técnica varios medios de intercambio aniónico posibles que pueden usarse en dichas columnas, incluyendo resinas de amino o iminio N-cargadas, tales como POROS 50 PI™, Q SEPHAROSE™, cualquier DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria, o resina basada en PEI. Un experto en la materia apreciará que las VLP recombinantes pueden purificarse en una columna de intercambio aniónico bien antes o después de la purificación en otras columnas.

Las resinas cromatográficas de intercambio aniónico pueden usarse en aparatos de cromatografía en columna por gravedad o de cromatografía líquida de alta presión usando flujo radial o axial, columnas de lecho fluido, o en una lechada, es decir, método por lotes. En el último método, la resina se separa de la muestra mediante decantación o centrifugación o filtración o una combinación de métodos.

El principio de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adsorben a intercambiadores iónicos de manera reversible de tal forma que las moléculas pueden unirse o eluirse cambiando el ambiente iónico. La separación en los intercambiadores iónicos se logra normalmente en dos etapas: en primer lugar, la sustancia que se va a separar se une al intercambiador, usando condiciones que dan unión estable y estrecha; después la sustancia se eluye con tampones de diferentes pH, o fuerza iónica, dependiendo de las propiedades de la sustancia que se esté purificando.

Más específicamente, y tal como puede aplicarse a la presente invención, el principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que la afinidad de una VLP para el intercambiador depende tanto de las propiedades eléctricas de la proteína, como de la afinidad relativa de otras sustancias cargadas en el disolvente. De este modo, las proteínas unidas pueden eluirse cargando el pH, alterando de este modo la carga de la proteína, o añadiendo materiales de competición, de los cuales las sales solo son un ejemplo. Debido a que las diferentes sustancias tienen diferentes propiedades eléctricas, las condiciones para la liberación varían con cada especie molecular unida. En general, para tener una buena separación, los métodos de elección son bien elución en gradiente de fuerza iónica continua o elución por etapas. Para un intercambiador aniónico, o bien se disminuye el pH y se aumenta la fuerza iónica o solo se aumenta la fuerza iónica. Para un intercambiador catiónico, pueden aumentarse tanto el pH como la fuerza iónica. La elección real del procedimiento de elución es normalmente un resultado de ensayo y error y de consideraciones de estabilidad de las VLP que se estén purificando.

Un experto en la materia apreciará que el tipo de intercambiador aniónico, y los tampones y sales usadas para unir y eluir las VLP también irán en función del tipo de VLP que se pretende purificar.

5 Material cromatográfico de intercambio Catiónico

En la cromatografía de intercambio catiónico, se une un grupo funcional negativo al medio de soporte insoluble. Por consiguiente, los medios cromatográficos de intercambio catiónico se unen a contraiones positivos cuando el periodo de incubación es un periodo de tiempo suficiente para permitir que los grupos cargados positivamente se unan y alcancen el equilibrio con el medio intercambiador catiónico cargado negativamente. Las moléculas neutras y los aniones no se unen al medio de intercambio catiónico. Después de la unión electrostática de especies que poseen una carga neta positiva, se lava el medio catiónico, eliminando las moléculas sin unión del medio. Los iones unidos se eluyen entonces lavando el medio con concentraciones crecientes de iones positivos o alterando el pH del medio. También se contempla el uso de diversos medios de intercambio catiónico, tales como cualquier resina de intercambio catiónica basada en sulfo, fosfo, carboxi o carboximetilo unidas a numerosos medios de soporte bien conocidos en la técnica.

La cromatografía de intercambio iónico puede usarse en modo de unión o de flujo a través.

20 Material cromatográfico de afinidad

El material cromatográfico puede comprender un material cromatográfico de afinidad. El material cromatográfico de afinidad puede comprender anticuerpos, resinas colorantes, y metales. La resina seca puede ser cibacrom azul o poliximina.

25 La cromatografía de afinidad es una técnica que proporciona purificación específica de ligando de un compuesto diana. Como tal, la técnica explota las propiedades características estructurales y funcionales de las macromoléculas uniéndose a las moléculas basándose en estas características específicas en determinadas condiciones.

30 Se contemplan diversas matrices de columna de afinidad diferentes. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos dirigidos contra VLP para generar medios de columna de afinidad que a su vez pueden usarse para purificar las VLP. Además, el material cromatográfico de afinidad puede comprender resinas secas, y metales. La resina seca puede ser cibacrom azul o poliximina.

35 Se contempla el uso de heparina como grupo adsorbente. Los medios de cromatografía por afinidad que contienen heparina están disponibles comercialmente a través de diversas fuentes. Por ejemplo, PerSeptive Biosystems, Inc. (Framingham, Mass.) comercializa un medio basado en heparina (POROS 20HE™). Cuando se usa POROS 20HE™ como medio de cromatografía por afinidad, la solución que contiene las VLP se aplica al medio de afinidad y posteriormente se eluye con una concentración de sal adecuada.

40 Los materiales cromatográficos discutidos anteriormente pueden usarse como etapas individuales, o de manera secuencial, o en tándem. La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas de la presente invención puede diseñarse para producir VLP que cumplan especificaciones presentes. El método de purificación de la presente invención se usa para purificar VLP en más de aproximadamente un 70 %, 80, 90 %, 95 % o 99 % de pureza.

45 La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas puede diseñarse para controlar la composición de VLP resultante. La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas puede diseñarse para reducir los niveles de contaminantes a niveles considerados aceptables por las agencias reguladoras para sustancias farmacológicas de grado farmacéutico. El nivel de contaminación del contenido de ADN de la célula hospedadora puede reducirse a menos de un 1 % en una realización de la invención. El nivel de contaminación del contenido de proteína de la célula hospedadora puede reducirse a menos de un 5 % en una realización adicional de la invención. La secuencia del proceso cromatográfico de múltiples etapas está diseñada para producir VLP cumpliendo con las BPF y adecuadas para ensayos farmacéuticos en seres humanos.

55 La presente divulgación proporciona además un método para poner en contacto una solución que contiene VLP con un material cromatográfico. En este sentido, pueden ponerse en contacto los medios de cultivo o un lisado celular que contiene VLP con el material cromatográfico en el que los medios de cultivo o el lisado celular se filtran o purifican mediante precipitación antes de ponerlos en contacto con el material cromatográfico. La solución o el lisado celular puede centrifugarse sin un gradiente de sacarosa. Una solución aclarada que contiene VLP puede ponerse en contacto con el material cromatográfico. Como alternativa, se pone en contacto una solución que contiene VLP de una etapa cromatográfica con otro material cromatográfico.

65 Se contempla el uso de un medio de hidroxiapatita en conjunción con un medio de cromatografía de interacción hidrófoba para purificar partículas de VLP del medio celular liberado durante el proceso de lisis. El lisado celular puede cargarse en una columna de hidroxiapatita (Bio-Rad, CHT). Dichas columnas están comercialmente

disponibles en diversos tamaños. Después de la purificación sobre la columna de hidroxiapatita, el material que contiene las VLP se pasa sobre una columna de interacción hidrófoba (HIC). Entonces se lava y eluye la columna. La muestra de VLP purificada puede analizarse, por ejemplo, mediante SDS-PAGE con tinción de plata o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) respecto de su pureza.

5 Puede usarse un medio de hidroxiapatita conjuntamente con un medio cromatográfico de interacción hidrófoba y después en conjunción con un medio cromatográfico de intercambio aniónico para purificar partículas de VLP para uso farmacológico. Los presentes inventores han descubierto que esta combinación es particularmente adecuada para purificar virus Norwalk de Genotipo I en un nivel escalable comercialmente. Además, los presentes inventores han descubierto que la cromatografía de intercambio catiónico seguida de metil HIC es particularmente adecuada para purificar virus Houston.

15 Antes de poner en contacto el material cromatográfico con la preparación de VLP en cada etapa, puede ser necesario ajustar parámetros, tales como pH, fuerza iónica, y temperatura y en algunos casos, la adición de sustancias de diferentes tipos. El ajuste de estos parámetros se encuentra dentro del conocimiento de un experto en la técnica y puede lograrse en la solución que contiene VLP o medio cromatográfico. Por ejemplo, el pH de la solución que contiene VLP puede ajustarse con un tampón. El pH puede ajustarse a valores bien ácidos (por ejemplo, pH menor de 7) o valores básicos (por ejemplo, pH mayor de 7). En algunas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la solución de un material cromatográfico a un valor neutro (por ejemplo, pH igual a 7). El
20 tampón usado para ajustar el valor de pH puede comprender fosfato, carboxilato, sulfato, acetato, citrato, tris o bis tris y la concentración del tampón puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 1000 mM.

25 Un método de la presente divulgación puede implicar el ajuste de la fuerza iónica de la solución que contiene VLP. La fuerza iónica puede ajustarse mediante la adición de una sal que comprende cationes y aniones de la serie de Hofmeister. La sal puede ser una sal de fosfato, tal como fosfato de sodio, fosfato de calcio, y fosfato de potasio. La sal de fosfato puede ser fosfato de sodio. La concentración de la sal puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 500 mM. En una realización, la concentración de fosfato de sodio es de aproximadamente 100 mM.

30 Como alternativa, puede llevarse a cabo una etapa adicional en un material cromatográfico lavándolo con una solución (por ejemplo, un tampón para ajustar el pH, fuerza iónica, etc., o para la introducción de un detergente) para proporcionar las características necesarias para la purificación de la preparación de VLP. Por ejemplo, el pH del material cromatográfico puede ajustarse antes de la aplicación de VLP mediante equilibrado con un tampón. El pH puede ajustarse a menos de 7 o a más o igual a 7 con un tampón que comprende fosfato, carboxilato, o sulfato.

35 La fuerza iónica del material cromatográfico puede ajustarse mediante la adición de sal. La sal comprende cationes y aniones de la serie de Hofmeister, tales como sulfato de amonio. La concentración de sulfato de amonio puede ser mayor de aproximadamente 1, 2, o 2,4 molar.

40 La fuerza iónica del material cromatográfico puede ajustarse mediante la adición de una sal de fosfato. La sal de fosfato puede ser fosfato de sodio. La concentración del fosfato de sodio puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 500 mM. La concentración del fosfato de sodio puede ser de aproximadamente 100 mM. La concentración de disolvente orgánico de la solución que contiene VLP puede ajustarse durante los procesos de fase reversa.

45 El ajuste de los parámetros de la solución que contiene VLP o del material cromatográfico puede provocar la retención o el pase a través de las VLP y contaminantes. La solución que contiene VLP o el material cromatográfico pueden seleccionarse para provocar la retención de las VLP con materiales contaminantes que pasan a través del material cromatográfico. La solución que contiene VLP o el material cromatográfico pueden seleccionarse para provocar la retención de los materiales contaminantes con las VLP pasando a través del material cromatográfico.
50 Dichas características pueden utilizarse para operar las etapas cromatográficas bien en "modo de flujo a través" o "modo de unión" o una mezcla de los mismos. La expresión "modo de flujo a través" se refiere a una técnica de separación de preparación de VLP en la que al menos una VLP contenida en la preparación está prevista para que fluya a través de una resina o soporte cromatográfico, mientras que al menos un contaminante o impureza potencial se une a la resina o soporte cromatográfico. Puede usarse el flujo a través, por ejemplo, en cromatografía de
55 hidroxiapatita y cromatografía de intercambio iónico.

"Modo de unión" se refiere a una técnica de separación de una preparación de VLP en la que al menos una VLP contenida en la preparación se une a una resina o soporte cromatográfico, mientras que al menos un contaminante o impureza fluye a través. Puede usarse el modo de unión, por ejemplo, en cromatografía de hidroxiapatita y
60 cromatografía de intercambio iónico.

La presente divulgación proporciona métodos para eliminar materiales contaminantes a partir de preparaciones de VLP usando cromatografía de hidroxiapatita o cromatografía de interacción hidrófoba en modo de unión, modo de flujo a través, o una combinación de los mismos. Dicha práctica tiene aplicación a la purificación a gran escala de preparaciones de VLP.

En la cromatografía de hidroxiapatita en modo de unión, el método usa un soporte de hidroxiapatita cargado con

fosfato a pH neutro y baja fuerza iónica para unir VLP. Entonces se lava la columna con un tampón fosfato para eliminar las impurezas unidas débilmente. A continuación, las VLP se eluyen de manera selectiva usando un tampón fosfato de alta fuerza iónica que contiene de 100 a 200 mM de fosfato. Finalmente, la resina se regenera opcionalmente usando una solución de hidróxido de sodio y fosfato de potasio.

5 En la cromatografía de hidroxiapatita en modo de flujo a través, una preparación de VLP se intercambia en tapón en un tampón de carga a un pH adecuado. Entonces se deja fluir la preparación de VLP a través de una columna de hidroxiapatita, mientras que las impurezas se unen a la columna. La columna se lava de manera opcional posteriormente y se limpia para permitir que VLP adicionales pasen a través de la columna y se purifiquen.
10 Finalmente, la columna puede desmontarse opcionalmente y después regenerarse usando un tampón, tal como solución de hidróxido de sodio y fosfato de potasio.

15 En la combinación de unión/cromatografía de hidroxiapatita en modo de flujo a través, el medio de hidroxiapatita se equilibra y lava con una solución, de este modo proporcionando las características necesarias para la purificación de la preparación de VLP.

20 Antes del equilibrado y la cromatografía, el medio de cromatografía de hidroxiapatita puede equilibrarse previamente en una solución seleccionada, por ejemplo, una solución de sal y/o tampón. El equilibrado previo cumple la función de desplazar una solución usada para regenerar y/o almacenar el medio de cromatografía. Un experto en la materia será consciente de que la composición de la solución equilibrada previamente depende de la composición de la solución de almacenamiento y de la solución que se va a usar para la posterior cromatografía. Por lo tanto, las soluciones de equilibrado previo adecuadas pueden incluir el mismo tampón o sal usado para llevar a cabo la cromatografía, opcionalmente, a una concentración mayor que la usada para llevar a cabo la cromatografía.

25 Antes de que se aplique la muestra a la columna, el medio de cromatografía de hidroxiapatita puede equilibrarse en el tampón o sal que se usará para cromatografiar las VLP. La cromatografía (y carga de la proteína que se va a purificar) puede tener lugar en diversos tampones o sales incluyendo sales de sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, cloruro, fluoruro, acetato, fosfato, y/o citrato y/o tampón Tris. Dichos tampones o sales pueden tener un pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. En algunas realizaciones, el equilibrado puede tener lugar en una solución que comprende un tampón de Tris o de fosfato de sodio. De manera opcional, el tampón de fosfato de sodio está a una concentración de entre aproximadamente 0,5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar, más preferentemente a una concentración entre aproximadamente 15 milimolar y 35 milimolar. Preferentemente, el equilibrado tiene lugar a un pH de al menos aproximadamente 5,5. El equilibrado puede tener lugar a pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,6, preferentemente a pH entre aproximadamente 6,5 y 7,5. Lo más preferentemente, la solución comprende un tampón de fosfato de sodio a una concentración de aproximadamente 25 milimolar y a un pH de aproximadamente 6,8.

40 La puesta en contacto de una preparación de VLP con la resina de hidroxiapatita bien en modo de unión, modo de flujo a través, o combinaciones de los mismos puede llevarse a cabo en una columna de lecho empaquetado, una columna de lecho fluido/expandido que contiene la matriz de fase sólida, y/o en una simple operación por lotes donde la matriz de fase sólida se mezcla con la solución durante un determinado tiempo.

45 Después de poner en contacto la resina de hidroxiapatita con la preparación de VLP se lleva a cabo opcionalmente un procedimiento de lavado. Sin embargo, en algunos casos, puede omitirse el procedimiento de lavado, ahorrándose una etapa de procesamiento así como el lavado de la solución. Los tampones de lavado empleados dependerán de la naturaleza de la resina de hidroxiapatita, del modo de la cromatografía de hidroxiapatita que se está empleando, y por lo tanto puede determinarse por un experto habitual en la técnica. En el modo de flujo a través y la combinación de modo de unión/flujo a través, el flujo a través de VLP purificadas obtenido después de un lavado opcional de la columna puede agruparse con otras fracciones de VLP purificadas.

50 En modo de unión, la VLP puede eluirse de la columna después de un procedimiento de lavado opcional. Para la elución de la VLP de la columna, la presente invención usa un tampón fosfato de alta fuerza iónica. Por ejemplo, el tampón de elución puede contener fosfato de sodio de 1 a 300 mM, en otra realización, puede contener fosfato de sodio de 50 a 250 mM, en otra realización, puede contener fosfato de sodio de 100 a 200 mM, en otra realización, puede contener fosfato de sodio de 150 mM. El pH del tampón de elución puede variar de 6,4 a 7,6. En una realización, el pH puede ser de 6,5 a 7,3, en otra realización, el pH puede ser de 7,2, y en otra realización, el pH puede ser de 6,8. El tampón de elución puede alterarse para la elución de las VLP de la columna en un gradiente continuo o por etapas. Los componentes del tampón pueden ajustarse según el conocimiento de la persona experta en la materia.

60 Tanto en el modo de unión como en el de flujo a través, y combinaciones de los mismos, puede limpiarse opcionalmente una matriz de fase sólida, es decir, desmontarse y regenerarse, después de la elución o el flujo a través de las VLP. Este procedimiento se lleva a cabo normalmente de manera regular para minimizar la acumulación de impurezas en la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar la matriz para evitar la contaminación del producto con microorganismos.

65 La etapa de cromatografía de hidroxiapatita puede llevarse a cabo en primer lugar, en segundo lugar la etapa de

cromatografía de interacción hidrófoba, y en tercer lugar la etapa de cromatografía de intercambio aniónico o de exclusión por tamaño.

5 Las VLP se recuperan generalmente a partir de una etapa de hidroxapatita en las fracciones de unión, flujo a través o una mezcla de los mismos. La concentración de sal y el pH de dichas fracciones puede ajustarse entonces para la purificación sobre una columna de interacción hidrófoba o para la purificación sobre cualquier otra columna de afinidad adecuada. Puede añadirse sulfato de amonio a una concentración final del 8 % p/v a las VLP agrupadas y se agita la muestra hasta que se disuelve todo el sulfato de amonio. Se equilibra una columna que contiene 250 ml de resina HIC con cinco VC de fosfato de sodio 100 mM, sulfato de amonio 2,4 M pH 6,8 y se carga la suspensión de VLP. La columna se lava con aproximadamente tres VC de tampón C hasta que se observa un valor inicial estable y después se lava con 10 VC de fosfato 100 mM al 70 %, pH 6,8. Las VLP pueden eluirse de la columna con fosfato 150 mM.

15 Cabe destacar que el orden del medio cromatográfico no se considera importante para la última purificación de las partículas de VLP. Asimismo, también puede usarse una columna de exclusión por tamaño de manera opcional para purificar adicionalmente la muestra. Los rendimientos obtenidos usando dichas combinaciones son predecibles basándose en los rendimientos obtenidos usando las etapas de purificación en columna individuales.

20 Las VLP eluidas de una columna HIC pueden someterse a etapas adicionales de exclusión por tamaño según sea necesario. El eluido purificado mediante la combinación de cromatografía de hidroxapatita y cromatografía HIC puede purificarse adicionalmente mediante una cromatografía de intercambio aniónico de DEAE.

25 Cualquiera o todas las etapas cromatográficas de la invención puede llevarse a cabo mediante cualquier medio mecánico. La cromatografía puede llevarse a cabo en una columna. La columna puede ejecutarse con o sin presión y de arriba a abajo o de abajo a arriba. La dirección del flujo de fluido en la columna puede revertirse durante el proceso de cromatografía. La cromatografía también puede llevarse a cabo usando un proceso por lotes en el que el soporte sólido se separa del líquido usado para cargar, lavar, y eluir la muestra mediante cualquier medio adecuado, incluyendo gravedad, centrifugación, o filtración. La cromatografía también puede llevarse a cabo poniendo en contacto la muestra con un filtro que adsorbe o retiene algunas moléculas en la muestra de manera más fuerte que otras.

Finalmente, el eluido de la columna de intercambio aniónico puede filtrarse mediante un diafiltro o un filtro de flujo tangencial para concentrar el filtrado.

35 Etapas opcionales adicionales

Aunque la cromatografía de hidroxapatita y de interacción hidrófoba pueden usarse conjuntamente para separar las VLP, la purificación puede usarse en combinación con otras técnicas de purificación de proteínas. Pueden ser deseables una o más etapas precedentes a la etapa de hidroxapatita para reducir la provocación de carga de los contaminantes o impurezas. Pueden ser deseables una o más etapas de purificación después de la etapa de interacción hidrófoba para eliminar contaminantes o impurezas adicionales.

45 Puede combinarse opcionalmente un procedimiento de purificación de hidroxapatita con otras etapas de purificación, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, cromatografía de exclusión por tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración de eliminación viral, y/o cromatografía de intercambio iónico.

50 Los métodos de purificación adicionales pueden incluir filtración, precipitación, evaporación, destilación secado, absorción de gas, extracción de disolvente, extracción por prensado, adsorción, cristalización, y centrifugación. Otros métodos de purificación pueden incluir cromatografía adicional utilizando cromatografía por lotes o en columna. Además, la purificación adicional puede incluir combinaciones de cualquiera de las anteriores, tales como, por ejemplo, combinaciones de diferentes métodos de cromatografía, combinaciones de cromatografía con filtración, combinaciones de cromatografía con precipitación, o combinaciones de tratamiento en membrana con secado.

55 La elución de las VLP puede controlarse mediante técnicas conocidas en la técnica, incluyendo densidad óptica, microscopía electrónica de transmisión, o dispersión de luz. Adicionalmente, las propiedades biológicas de las VLP antes y después de la purificación pueden determinarse usando ensayos bien establecidos. Más específicamente, la pureza e identidad de las VLP pueden medirse usando diversos métodos analíticos, incluyendo electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico no reductora (SDS-PAGE), cromatografía de exclusión por tamaño, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), electroforesis capilar, espectrometría de masas MALDI (ionización por desorción láser asistida por matriz), ELISA (ensayo inmunosorbente asociado a enzimas), o dicroísmo circular.

65 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Un experto en la materia podría, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden efectuarse muchos cambios en las realizaciones específicas y obtener un resultado similar sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1. Purificación de virus del Genogrupo I de Norovirus

Descripción general del método

5 El proceso de purificación consiste en 3 etapas de cromatografía. Las etapas usan mecanismos ortogonales que dan como resultado procesos escalables que producen VLP altamente purificadas. La primera etapa de la purificación es una etapa de captura que usa resina de hidroxapatita (CHT) de Bio-Rad. La etapa de CHT concentra las VLP de Norwalk, elimina los componentes del medio, e intercambia el producto a un tampón fosfato. Después de la adición de sulfato de amonio, la cromatografía de interacción hidrófoba de metilo (HIC) proporciona la mayoría de la purificación, tal como se muestra en la figura 1. La tercera etapa cromatográfica es una cromatografía de intercambio iónico de DEAE operada en modo de flujo. En las condiciones usadas, las VLP de Norwalk no se unen a la columna y se retienen los contaminantes residuales (endotoxina, ácido nucleico, y proteínas). La etapa final en el proceso de purificación es una ultrafiltración en donde el tampón fosfato se reemplaza por agua para inyección. La sustancia farmacológica en bruto (VLP de Norwalk) se almacena como una suspensión de 0,5 a 1,5 mg/ml a 2-8 °C.

15 Puede llevarse a cabo una serie de pruebas en las VLP purificadas cromatográficamente para determinar si hay alguna diferencia entre las VLP purificadas cromatográficamente y las VLP purificadas por ultrafiltración. Estos métodos incluyen microscopía electrónica de transmisión y caracterización fisicoquímica, incluyendo puntos de fusión mediante espectros de dicroísmo circular, dispersión de luz dinámica, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía líquida de alto rendimiento. Los procedimientos de purificación por cromatografía se indican generalmente a continuación. El proceso de purificación puede normalizarse para cualquier escala. Los caudales lineales listados son independientes del diámetro de columna.

Purificación de VLP

25 Una fermentación de 15 l produce 10 l de medio condicionado. El proceso de purificación descrito a continuación está diseñado para manipular 5 l. Para purificar los 10 l completos, se llevan a cabo 2 campañas usando 5 l con cada una durante un periodo de dos semanas.

30 Cromatografía en columna de HA: Se cargan cinco litros de sobrenadante de cultivo en una columna empaquetada con 500 ml de resina de hidroxapatita (Bio-Rad, CHT), equilibrada pasando 10 volúmenes de columna de tampón de fosfato de sodio 5 mM (tampón A) con un caudal de 80 ml/min. El sobrenadante de cultivo se carga sobre la columna y se lava con dos volúmenes de columna (VC) de tampón A. Se usan 150 mM de fosfato (tampón B) para eluir las VLP de Norwalk de la columna CHT. Las VLP de Norwalk se eluyen como un solo pico en tampón B. Las fracciones (1 VC cada una) se recogen durante el ciclo cromatográfico y se analizan mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contienen las VLP se agrupan para la siguiente etapa en la purificación. Las SDS-PAGE con tinción de Coomassie de las fracciones de cromatografía de hidroxapatita se muestran en la figura 2. La mayoría de las VLP de Norwalk se eluyen en las 4 fracciones de volumen de columna eluido con el tampón B 100 %. Estas fracciones agrupadas se usaron para la etapa 2 de purificación de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

40 Cromatografía en columna HIC: A las fracciones de VLP agrupadas de la etapa de cromatografía CHT, se les añade amonio sólido a una concentración final del 8 % p/v y se agita la muestra hasta que se disuelve todo el sulfato de amonio.

45 La adición de sulfato de amonio facilita la adsorción de la proteína en la resina Methyl HIC de BioRad. Se equilibra una columna que contiene 250 ml de resina HIC con cinco VC de fosfato de sodio 100 mM, sulfato de amonio 2,4 M pH 6,8 (tampón C) y se carga la suspensión de VLP. La columna se lava con aproximadamente tres VC de tampón C hasta que se observa un valor inicial estable y después se lava con 10 VC de fosfato 100 mM al 70 %, pH 6,8 (tampón D). Las VLP de la columna de HIC eluyen en tres a cuatro VC de tampón B al 100 %. Durante la elución se recogen fracciones de 250 ml (1 VC) y se analizan mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contienen VLP se agrupan y usan en la etapa cromatográfica de DEAE. La SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de columna de HIC se muestra en la figura 3.

60 Cromatografía en columna de DEAE: Las fracciones agrupadas, que contienen las VLP parcialmente purificadas a partir de la columna de HIC metilo, se cargan directamente sobre una columna empaquetada con 270 ml de resina DEAE Sephadex. Se bombea tampón fosfato a pH 6,5 a un caudal de 40 ml/min haciendo que las VLP eluyan en el volumen vacío (flujo a través). Las proteínas contaminantes interactúan con la resina y se eluyen posteriormente en la cromatografía. Las fracciones (1/4 VC cada una) se recogen tras la carga de la muestra y tan pronto como la señal del detector UV se eleva por encima del valor inicial. Las fracciones se analizan mediante SDS-PAGE y las fracciones que contienen VLP se agrupan para el intercambio de tampón mediante diafiltración. La SDS-PAGE/tinción de Coomassie de fracciones de columna de DEAE se muestra en la figura 4.

65 Diafiltración: En la etapa de purificación final de VLP de Norwalk, que eluyen de la columna de DEAE, se diafiltran y concentran. Este procedimiento implica colocar las VLP en un aparato de diafiltración celular agitado higienizado. El volumen de líquido se reduce en un 50 % y se añade agua para inyección de nuevo al volumen original. Este proceso se repitió un total de 10 veces. La parte retenida contiene las VLP de Norwalk diafiltradas. Este material se somete después a un proceso de esterilizado por filtración. Se extraen alícuotas para las pruebas de CC y su

liberación. La SDS-PAGE/tinción de Coomasie de fracciones de diafiltración se muestra en la figura 5.

Contenido de VLP: Se usan geles de SDS-PAGE teñidos con Coomasie exhaustivamente purificados para identificar fracciones que contienen VLP. Durante la purificación, se supone que una fracción contiene VLP si se observa una banda que migra con un peso molecular similar como material de referencia de VLP ejecutado sobre el mismo gel. Se agrupan solo aquellas fracciones donde la banda de VLP tiene una intensidad equivalente a o mayor que la intensidad la referencia de VLP.

Concentración de proteínas: La concentración de proteína en proceso (etapa de ultrafiltración) se determina mediante un ensayo cromogénico basado en una reacción de ácido bicinónico con proteína. Los reactivos de ensayo se obtienen de Pierce.

Las especificaciones de las VLP de virus Norwalk purificadas cromatográficamente mediante el método descrito anteriormente se muestran en la Tabla 1. Las VLP de Norwalk purificadas cromatográficamente también se compararon con las VLP purificadas mediante el método de ultracentrifugación usando microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectros de CD. Los resultados se muestran en las figuras 6-13.

Tabla 1

Prueba	Especificación	Resultado
Identidad	Confirmada para a. Peso molecular mediante banda de proteína de SDS-PAGE entre 49 y 62 kDa b. Proteína de 49 a 62 kDa detectada mediante transferencia de Western	Cumple Cumple
Concentración de proteína	0,5 mg/ml a 1,5 mg/ml	1,40 mg/ml
Pureza	Mayor del 90 %, cromatografía de exclusión por tamaño	> 99 %
ADN de célula hospedadora	<100 pg/ml	<100 pg/ml
ADN de baculovirus	<100 pg/ml	>31 y < 62 pg/ml
Proteína de célula hospedadora	No más del 5 %	< 0,3 %
Endotoxina	Menos de 640 EU/ml	>320 y < 640 EU/ml
pH	< 7,0	5,4

20 Ejemplo 2. Purificación de virus del Genogrupo II de Norovirus

Descripción general del método

El proceso de purificación de Houston también usa mecanismos ortogonales que dan como resultado procesos escalables que producen VLP altamente purificadas. A diferencia del proceso de purificación de Norwalk que utiliza HA, HIC e intercambio aniónico, se observó que un proceso en 2 columnas funciona bien para VLP de virus Houston de genogrupo II.4.

Para purificar VLP de Houston, se aclara medio condicionado que contiene las VLP bien mediante filtración o centrifugación y se cargan sobre una resina SP FF de intercambio catiónico equilibrada con 20 mM de tampón de citrato fosfato, pH 4,0. Después de un lavado con tampón de elución al 20 % (citrato fosfato 20 mM, cloruro sódico 1 M), las VLP se eluyen usando una etapa de gradiente y tampón de elución al 100 %.

Las fracciones de la columna de intercambio catiónico que contienen las VLP de Houston se agrupan y se ajusta la fuerza iónica mediante la adición de sulfato de amonio al 15 % (p/v). Este material agrupado entonces se carga en una columna que contiene resina HIC metilo con tampón fosfato a pH 6,8 que contiene sulfato de amonio 2,4 M (tampón A). Después de cargar, se usa una elución de gradiente de 3 etapas para eluir las VLP de la resina HIC. En la primera etapa, se usa tampón de elución al 40 % (fosfato de sodio 100 mM) para eluir contaminantes. A continuación, se estratifica el gradiente hasta tampón de elución al 70 %, lo que hace que las VLP eluyan y finalmente se ajusta el gradiente a tampón de elución al 100 % para asegurar que se completa la elución y que se eluye cualquier contaminante restante. El pico de elución que contiene VLP de la cromatografía HIC metilo en tampón de elución al 70 % se dializa entonces en tampón de citrato fosfato 20 mM y cloruro de sodio 150 mM a pH 6,0.

Basándose en ejecuciones de producción a pequeña escala, el proceso da como resultado de 5 a 15 mg de VLP purificadas de matraces rotatorios de 200 y 500 ml y da como resultado una pureza de VLP mayor del 90 % mediante SDS-PAGE.

La tabla 2 resume este proceso de purificación para el Norovirus de genogrupo II, virus Houston. Las figuras 14 y 15 proporcionan los resultados de la etapa de intercambio catiónico, mientras que las figuras 16 y 17 proporcionan los resultados de la etapa de cromatografía de HIC metilo. Las figuras 18 y 19 proporcionan una SDS-PAGE y HPLC-SEC de la proteína de virus Houston purificada.

5

Tabla 2

Condiciones de cultivo	MDI = 1 3 x 10 ⁶ células/ml se añade NaCl a 150 mM en el día 7 Se recoge el sobrenadante	
Protocolo de purificación	1ª etapa: Resina SP FF de intercambio catiónico	Tampón de equilibrado: citrato fosfato 20 mM, pH 4,0 Tampón de elución: citrato fosfato 20 mM, cloruro de sodio 1 mM, pH 4,0 Gradiente por etapas: 1ª etapa - lavado con tampón de elución al 20 %; 2ª etapa - lavado con tampón de elución al 100 %
	2ª etapa: Resina HIC metilo - el material de partida contiene sulfato de amonio al 15 %	Tampón de equilibrado: fosfato de sodio 100 mM, sulfato de amonio 2,4 M, pH 6,8 Tampón de elución: fosfato de sodio 100 mM pH 6,8 Muestra cargada con la adición de sulfato de amonio al 15 % (p/v). Gradiente por etapas: 1ª etapa - lavado con tampón de elución al 40 %; 2ª etapa - lavado con tampón de elución al 70 %; 3ª etapa - lavado con tampón de elución al 100 %.
	3ª etapa: Diálisis al tampón	Pico de elución obtenido mediante cromatografía HIC metilo con tampón de elución al 70 % dializado en tampón citrato fosfato 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6,0.
Rendimientos finales	20-30 mg de proteína purificada/l	

Además del proceso indicado en la tabla 2, ha sido posible precipitar de manera selectiva VLP de Houston disminuyendo la fuerza iónica del medio condicionado mediante la adición de agua desionizada. Esto ofrece una ventaja significativa porque la rápida reducción de volumen proporcionó procesos de precipitación. Una vez precipitados, las VLP pueden separarse usando centrifugación o filtración. Las VLP precipitadas se resuspenden entonces en un tampón adecuado y se purifican adicionalmente usando los métodos cromatográficos descritos anteriormente. Se prevé el desarrollo de un método de purificación escalable usando al menos dos y posiblemente las tres técnicas cromatográficas. El objetivo de este desarrollo de purificación podría ser obtener un esquema de purificación que podría proporcionar VLP funcionales que son idénticas en cuanto a calidad a las VLP producidas normalmente mediante ultracentrifugación y podrían producirse a gran escala para la fabricación comercial de las VLP de Houston.

Los datos preliminares presentados anteriormente demuestran que los métodos cromatográficos podrían ser útiles para la purificación de VLP del virus Houston. Se demostró que las VLP se unen a varias resinas y también podrían eluirse con los tampones adecuados. La etapa siguiente en el desarrollo sería determinar la combinación y orden en el que estas cromatografías se usarían para producir un producto más puro. Asimismo, se llevarán a cabo experimentos adicionales para determinar las modificaciones necesarias para estas técnicas cromatográficas para obtener el máximo rendimiento de las VLP. EL método finalizado se usaría entonces en la producción a gran escala y purificación de VLP del virus Houston.

Ejemplo 3. Purificación de VLP de G.II mediante precipitación de sulfato de amonio

Se dividió una preparación parcialmente purificada de VLP en alícuotas de 1 ml. Se añadió sulfato de amonio a cada alícuota para lograr una concentración final del 10 % al 35 % (p/v). Las muestras se colocaron en un rotador y se mezclaron de arriba a abajo a 4 °C durante toda la noche. Las muestras se inspeccionaron visualmente para signos de precipitación. Se extrajo una alícuota de 20 ml y se marcó como "Suspensión de am.". La suspensión de sulfato de amonio se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min, a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante resultante y se marcó como "Sob. Am.". El sedimento precipitado se disolvió en un tampón citrato, pH 7,0, se colocó en un rotador y se mezcló de arriba a abajo a 4 °C durante 2 h. Las muestras se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 min. El sobrenadante resultante se extrajo y se marcó como "Sob. Citrato". La figura 20 ilustra un gel de SDS-PAGE con tinción de plata de muestras tomadas en distintos momentos durante el proceso de purificación. Las dos bandas en el carril de "Sob. Citrato" reflejan las VLP de Houston purificadas.

La etapa de precipitación de sulfato de amonio mejoró significativamente la pureza de las VLP tal como se muestra en la figura 21. El porcentaje de proteína de célula hospedadora (HCP) a proteína de VLP se redujo en

aproximadamente la mitad como resultado de la precipitación de sulfato de amonio.

Ejemplo 4. Purificación de VLP de Genogrupo II de Norovirus mediante precipitación seguida de cromatografía de amina cuaternaria (Q)

5 *Proceso de purificación de VLP de Houston*

10 Se cultivó un cultivo en suspensión de 1 litro de células SF9 hasta una densidad de $1,7 \times 10^7$ células/ml y se infectaron a una MDI (multiplicidad de infección) de 0,5 ufp/célula con solución madre de baculovirus recombinante que codifica la secuencia de VP1 de Houston. Se dejó que la infección procediese a una viabilidad de menos del 20 % (figura 22, carril 2). Se recogieron las VLP de Houston, se purificaron, y se concentraron del modo siguiente. El pH del cultivo se redujo a 5,5 usando HCl (carril 3) para precipitar las VLP. Después el cultivo a pH 5,5 se centrifugó a 1.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante (carril 4) se decantó y se desechó. A continuación, el sedimento restante se resuspendió en Tris 20 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, a pH 8 (carril 5). El sedimento resuspendido se centrifugó entonces a 1.000 x g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se marcó como "extracto de VLP de Houston" (carril 6). El proceso de precipitación dio como resultado una mejora significativa en la pureza, tal como se ilustra por la banda individual en el carril 6 en comparación con las múltiples bandas observadas en el material de partida en el carril 2 (figura 22).

20 Después de la recogida, el extracto de VLP de Houston se diluyó a 1:2 con agua y se cargó en una membrana Q100. El tampón de la fase móvil fue Tris 20 mM, pH 6,5 y el tampón de elución fue Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 6,5. Después de cargar, la columna se lavó con tampón de elución al 20 % (figura 22, carril 7) seguido de tampón de elución al 50 % (carril 8). El gel de SDS-PAGE con tinción de plata ilustrado en la figura 22 muestra que las VLP de Houston se concentran mediante esta etapa de cromatografía de captura (compárense el carril 8 con el carril 2).

25 *Proceso de purificación de VLP de Laurens*

30 El proceso de recogida de VLP indicado anteriormente para las VLP de Houston se aplicó a un cultivo de SF9 infectado con solución madre de baculovirus recombinante que codifica la secuencia de VP1 del virus Laurens de GII.4, dando como resultado un extracto de VLP de Lauren (figura 23, carril 11). El sedimento resuspendido se diluyó a 1:2 con agua y se cargó en una membrana Q100. El tampón de la fase móvil fue Tris 20 mM, pH 6,8 y el tampón de elución fue Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 6,8. Los carriles 2 a 10 de la figura 23 ilustran las fracciones recogidas durante la elución de gradiente por etapas de la membrana Q100. Las VLP eluyeron en las fracciones de tampón de elución al 40 % (carriles 5-8). Tal como se observaron con Houston, las VLP de Laurens podrían purificarse y concentrarse usando ajuste de pH y cromatografía de captura.

Ejemplo 5. Cambios dependientes de pH en la estructura de VLP de GI y GII de Norovirus

40 Para optimizar adicionalmente los procedimientos de purificación de VLP, la estabilidad de las VLP de las cepas GI y GII de Norovirus se expusieron a intervalos de pH de aproximadamente pH 2 a aproximadamente pH 10.

45 Las VLP intactas tienen una masa de aproximadamente 10 MDa. Las VLP intactas expuestas a determinadas condiciones de pH y analizadas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC) muestra una transición a un fragmento intermedio estable con una masa de aproximadamente 220 kDa en relación a patrones de tamaño de proteína globular. Las condiciones completamente desnaturizantes provocan un desensamblaje adicional del fragmento intermedio al monómero de aproximadamente 60 kDa. Para explorar adicionalmente el intervalo de pH al que las VLP de Norovirus permanecerían intactas, el pH de las soluciones que contienen VLP de GI de Norovirus o de VLP de GII de Norovirus se ajustó incrementalmente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 antes del análisis con SE-HPLC. Adicionalmente, el tampón de columna de SE-HPLC se ajustó al mismo pH para el análisis.

50 Las VLP de GI de Norovirus expuestas a condiciones de pH que varían de pH 2 (figura 24A) a pH 8 (figura 24B) muestran un solo pico de absorbancia aproximadamente a los 17 min que representa VLP intactas monodispersas. Las VLP expuestas a pH 8,5 (figura 24C) producen un pico de absorbancia aproximadamente a los 33 min, lo que representa fragmentos de VLP intermedios estables de menor orden. Estos resultados demuestran que las VLP de GI de Norovirus permanecen intactas de pH 2 a 8, y se desensablan en el fragmento intermedio estable entre pH 8 y 8,5.

60 Las VLP de GII de Norovirus expuestas a condiciones de pH en el intervalo de pH 2 (figura 25A) a pH 9,5 (figura 25B) producen picos de absorbancia individuales aproximadamente a los 17 min, mientras que las VLP expuestas a pH 10 (figura 25C) muestran picos de absorbancia individuales aproximadamente a los 34 min. Por lo tanto, estos resultados demuestran que las VLP de GII de Norovirus permanecen intactas en el intervalo de pH de 2 a 9,5, y se desensablan en el fragmento intermedio estable entre pH 9,5 y 10.

65 Los hallazgos de estos experimentos permiten seleccionar condiciones que dan como resultado VLP intactas o fragmentos de las mismas ajustando el pH de la solución que contiene las VLP. Dichas condiciones pueden facilitar

el proceso de purificación.

Ejemplo 6. Precipitación de las proteínas de VLP usando polietilenglicol (PEG)

5 De un modo similar al observado para la precipitación de VLP mediante la adición de sal (ejemplo 3), pueden producirse resultados similares usando otros aditivos, tales como polietilenglicol, para provocar la precipitación selectiva y solubilización de las VLP.

10 Para determinar la concentración óptica de la masa y concentración de polietilenglicol (PEG), se añaden PEG con masas moleculares en el intervalo de 200 a 20.000 a soluciones que contienen VLP en cantidades que dan como resultado concentraciones finales de PEG del 0 al 50 % de PEG en aumentos del 5 %. Después de cada adición de PEG al 5 %, las soluciones que contienen VLP se centrifugan a 10.000 g, y se obtienen muestras de los sobrenadantes. Las muestras de sobrenadante se someten a análisis SDS-PAGE, ELISA, y/o HPLC para evaluar la pureza y concentración total de las VLP.

15 Las VLP se encontrarán inicialmente en el sobrenadante. A medida que aumenta la concentración de PEG, las VLP y proteínas contaminantes precipitarán en varios grados. Cuando se observan sedimentos, se recogen los sedimentos decantando el sobrenadante. El sedimento resuspendido en tampón y la pureza de las VLP se analiza mediante SDS-PAGE. El contenido total de VLP en los sedimentos resuspendidos se evalúa mediante ELISA o
20 HPLC. Se prepara una tabla o gráfica de la pureza relativa del sobrenadante y sedimento frente a la masa y concentración de PEG. La masa de PEG óptima y la combinación de concentración de PEG se selecciona basándose en las condiciones que dan como resultado la máxima pureza con un rendimiento o recuperación del producto aceptable.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para purificar partículas similares a virus (VLP) de Calicivirus usando un proceso cromatográfico de múltiples etapas, en el que el proceso cromatográfico de múltiples etapas utiliza más de un material cromatográfico y en el que una etapa del proceso comprende poner en contacto una solución que contiene VLP con una resina de interacción hidrófoba-metilo (HIC), en el que el proceso cromatográfico de múltiples etapas purifica dichas VLP hasta más de aproximadamente el 70 %.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la fuerza iónica de la solución que contiene las VLP se ajusta para provocar la retención de las VLP con materiales contaminantes que pasan a través del material de interacción hidrófoba-metilo.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la fuerza iónica se ajusta mediante la adición de sulfato de amonio.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que dichas VLP se purifican en más del 90 %.
5. El método de la reivindicación 1, en que las VLP de Calicivirus son VLP de Norovirus.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que las VLP de Norovirus son VLP del genogrupo I de Norovirus o VLP del genogrupo II de Norovirus.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de múltiples etapas comprende una etapa de cromatografía de intercambio catiónico seguida por dicha etapa de HIC de metilo.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que las VLP son VLP del genogrupo II de Norovirus.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho virus del genogrupo II de Norovirus es un virus Houston.
- 30 10. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de múltiples etapas se lleva a cabo en lisado celular o en el sobrenadante de cultivo producido usando metodologías recombinantes.
11. El método de la reivindicación 10, en el que las VLP se producen en células bacterianas, células de insecto, células de levadura o células de mamífero.
- 35 12. El método de la reivindicación 11, en el que el nivel de contaminantes del contenido de ADN de célula hospedadora es menor del 1 %.
- 40 13. El método de la reivindicación 11, en el que el nivel de contaminantes del contenido de proteína de célula hospedadora es menor del 5 %.

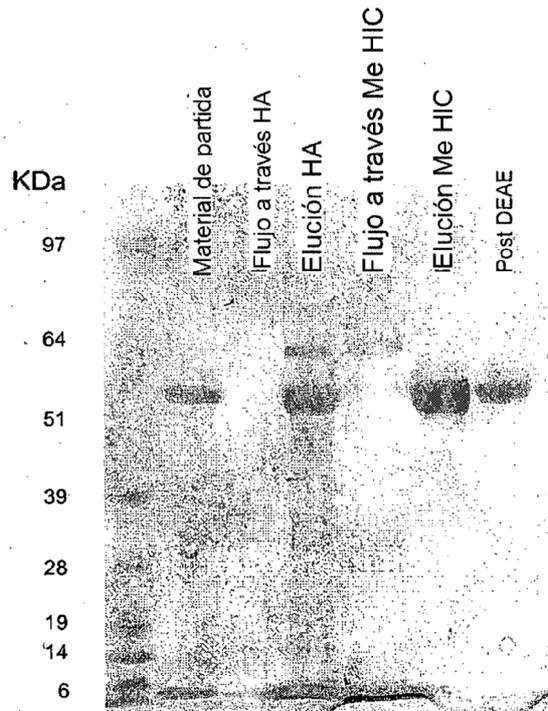
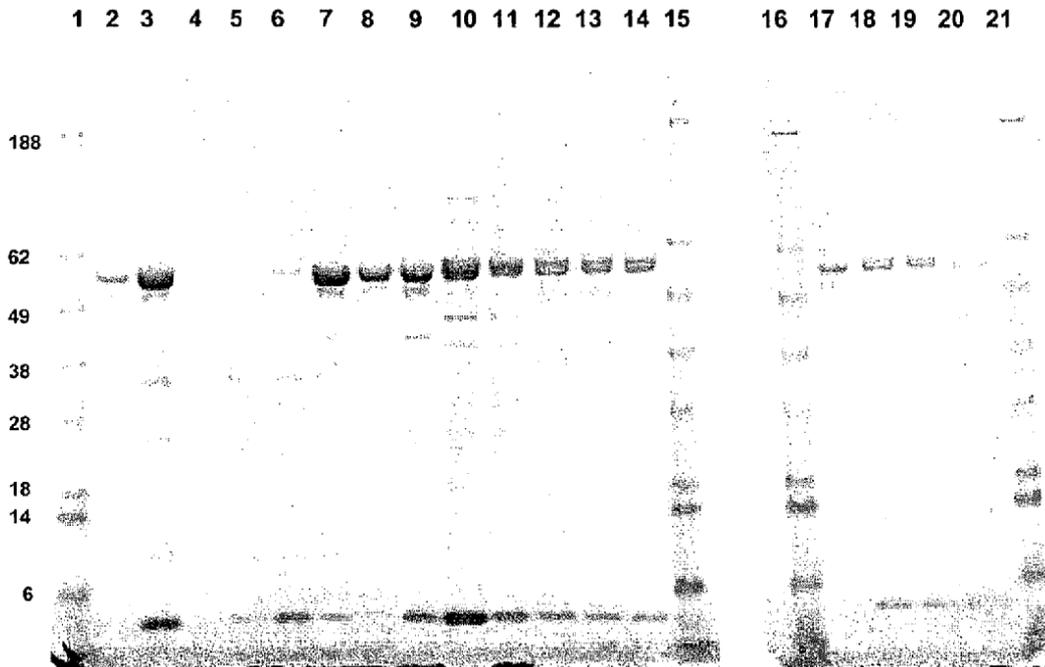


Figura 1



Carril	ID Muestra
1.	Marcador PM
2.	VLP estándar
3.	Muestra aplicada de HXA
4.	Fracción 1 flujo a través de HXA
5.	Fracción 2 flujo a través de HXA
6.	Fracción 3 flujo a través de HXA
7.	Fracción 1 lavado de HXA
8.	Fracción 2 lavado de HXA
9.	Fracción 1 elución de HXA
10.	Fracción 1 elución de HXA (diluido a 1:5)
11.	Fracción 1 elución de HXA (diluido a 1:10)
12.	Fracción 2 elución de HXA
13.	Fracción 3 elución de HXA
14.	Higienización de HXA
15.	Marcador PM
16.	Marcador PM
17.	Estándar VLP 817-73
18.	Fracción 7 elución de HXA
19.	Fracción 8 elución de HXA
20.	Higienización de HXA
21.	Marcador PM

Figura 2

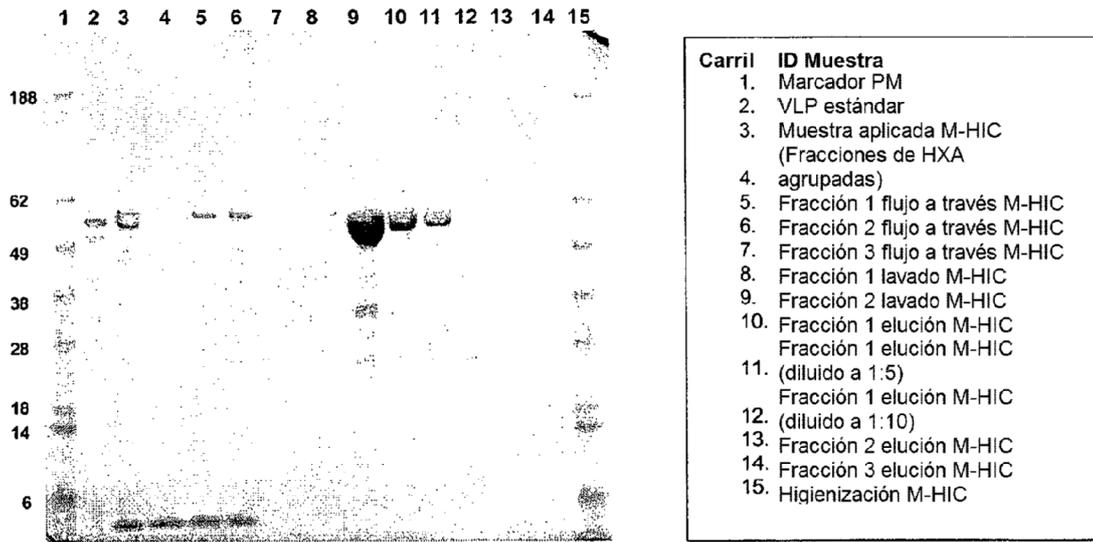
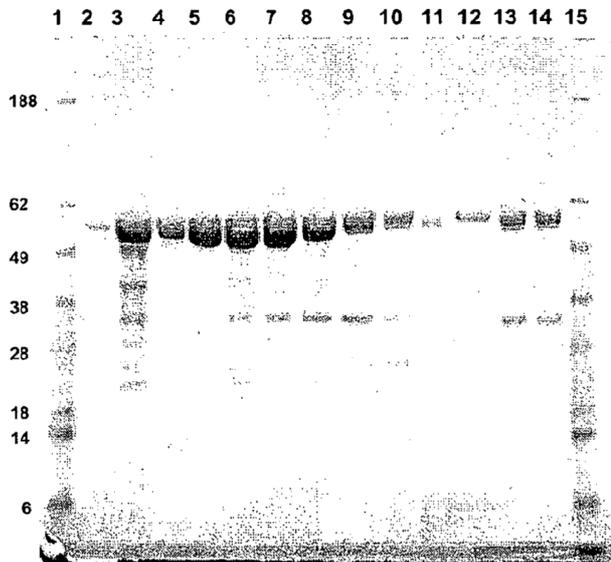


Figura 3



Carril	ID Muestra
1.	Marcador PM
2.	VLP estándar
3.	Muestra aplicada DEAE
4.	Fracción 1 flujo a través DEAE
5.	Fracción 2 flujo a través DEAE
6.	Fracción 3 flujo a través DEAE
7.	Fracción 1 lavado DEAE
8.	Fracción 2 lavado DEAE
9.	Fracción 3 lavado DEAE
10.	Fracción 4 lavado DEAE
11.	Fracción 5 lavado DEAE
12.	Higienización DEAE
13.	Grupo VLP Grupo 45-06002B
14.	Concentrado inicial VLP
15.	Permeado (IC) 45-06002B Marcador PM

Figura 4

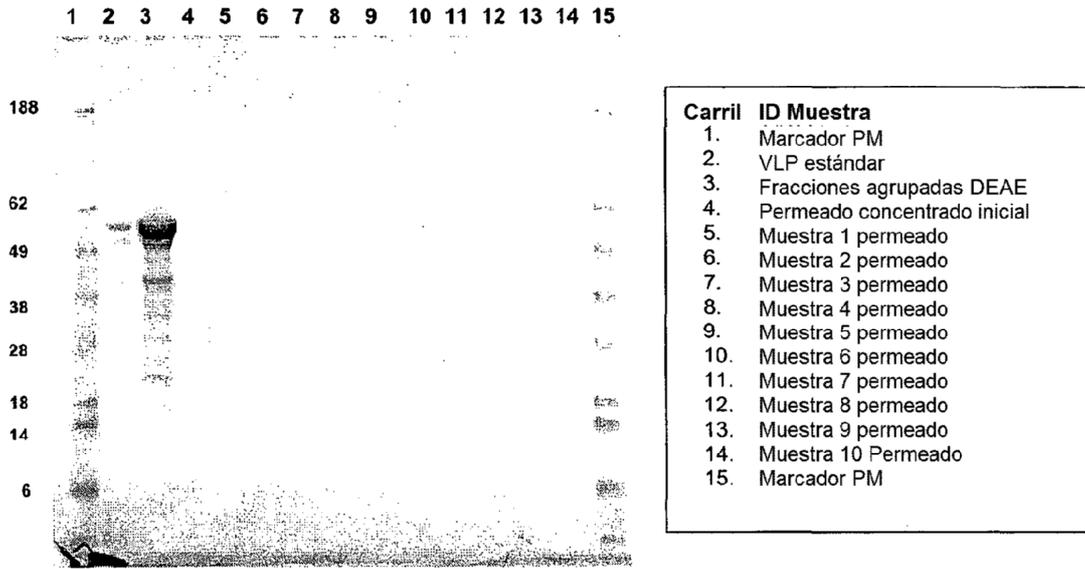


Figura 5

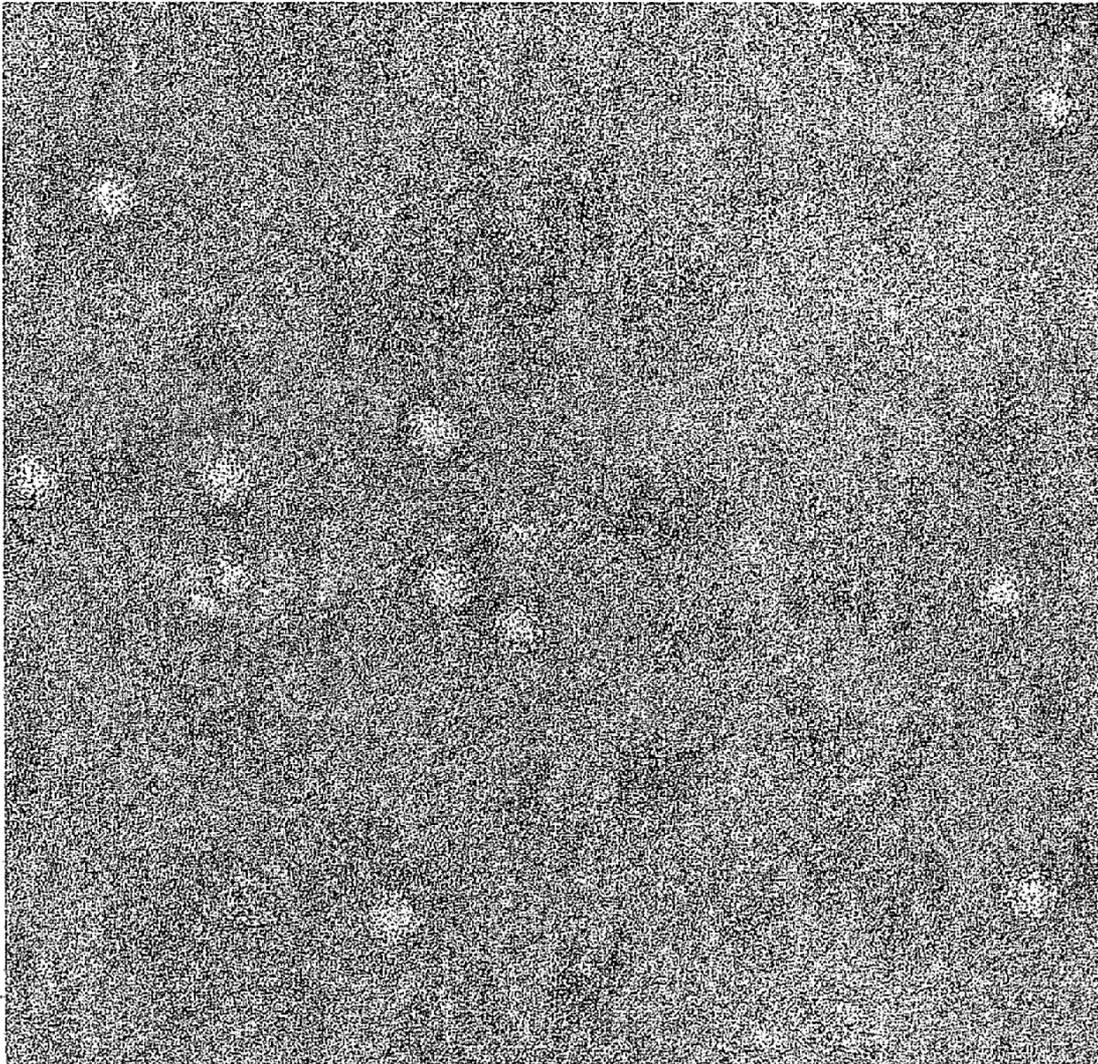


Figura 6

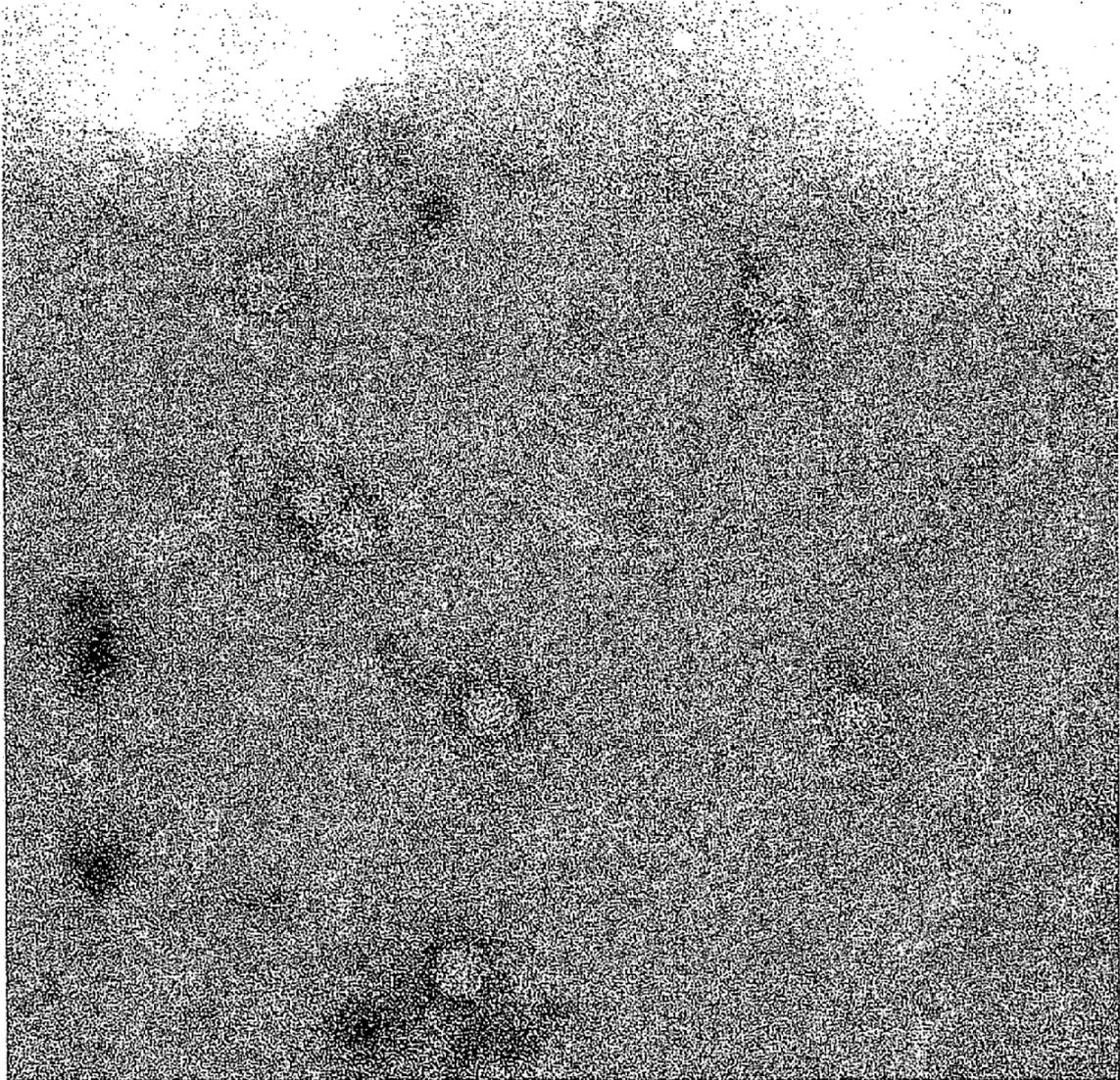


Figura 7

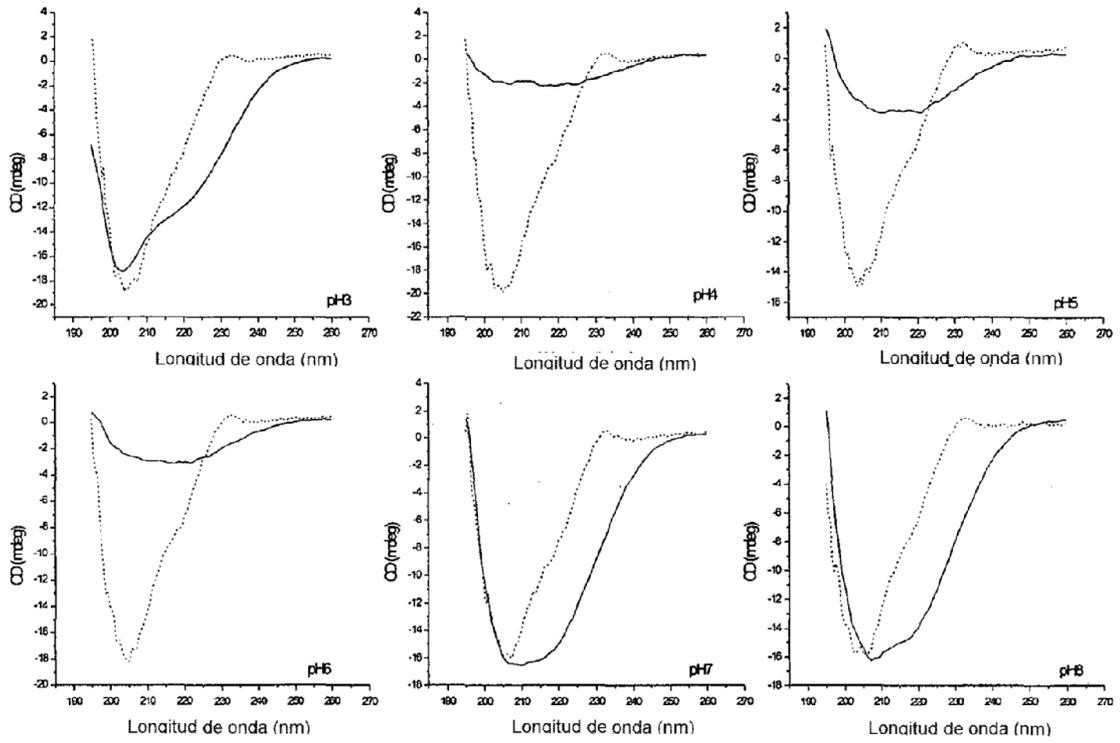


Figura 8

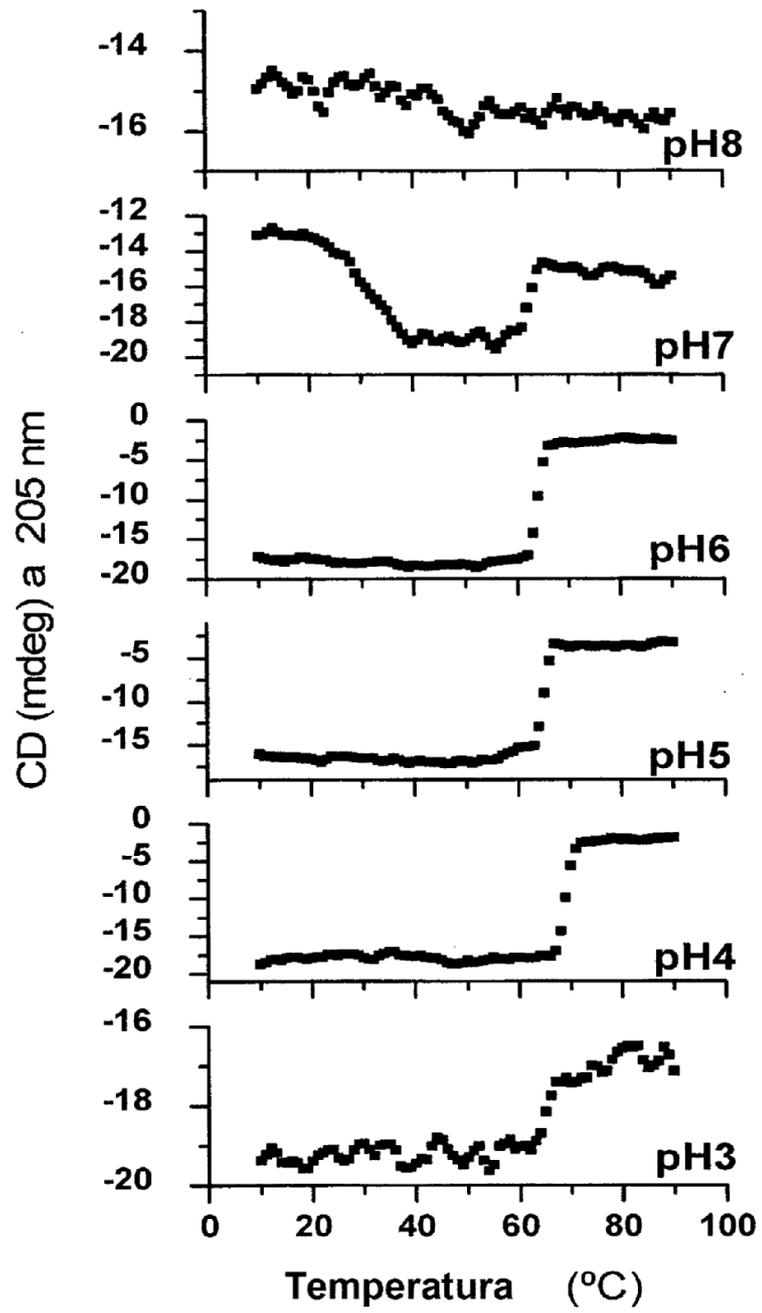


Figura 9

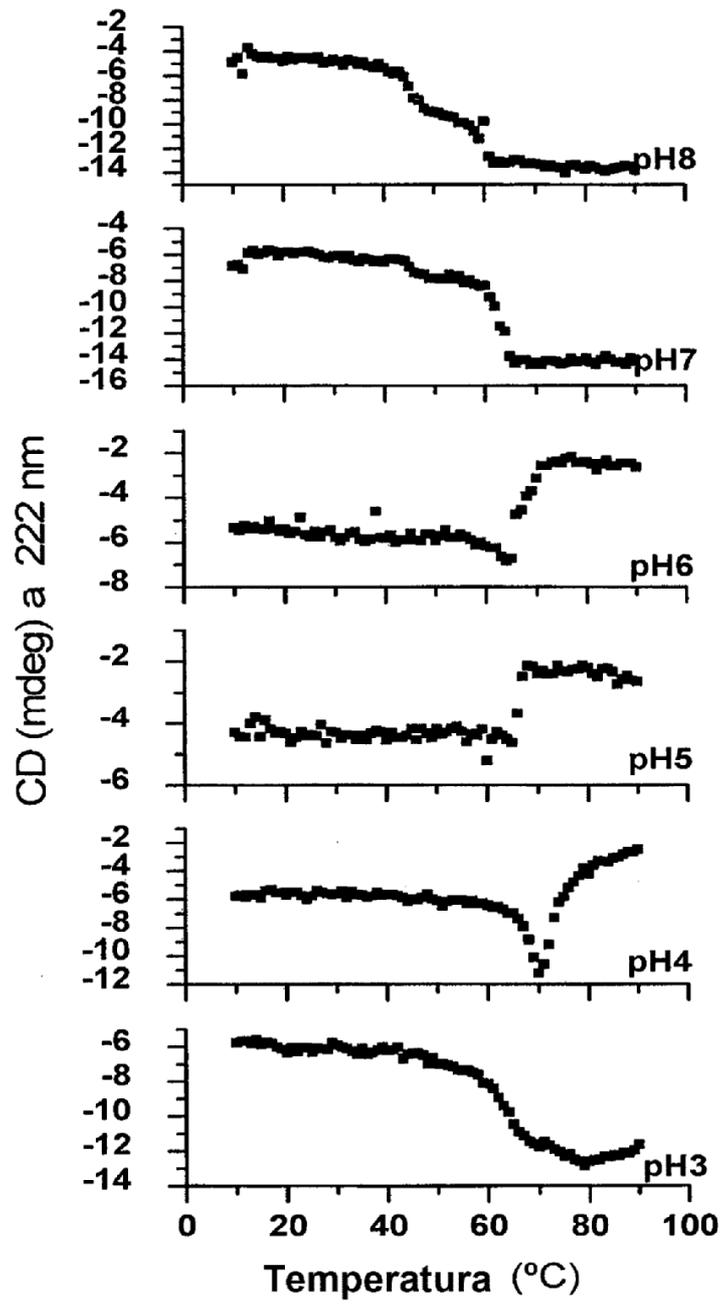


Figura 10

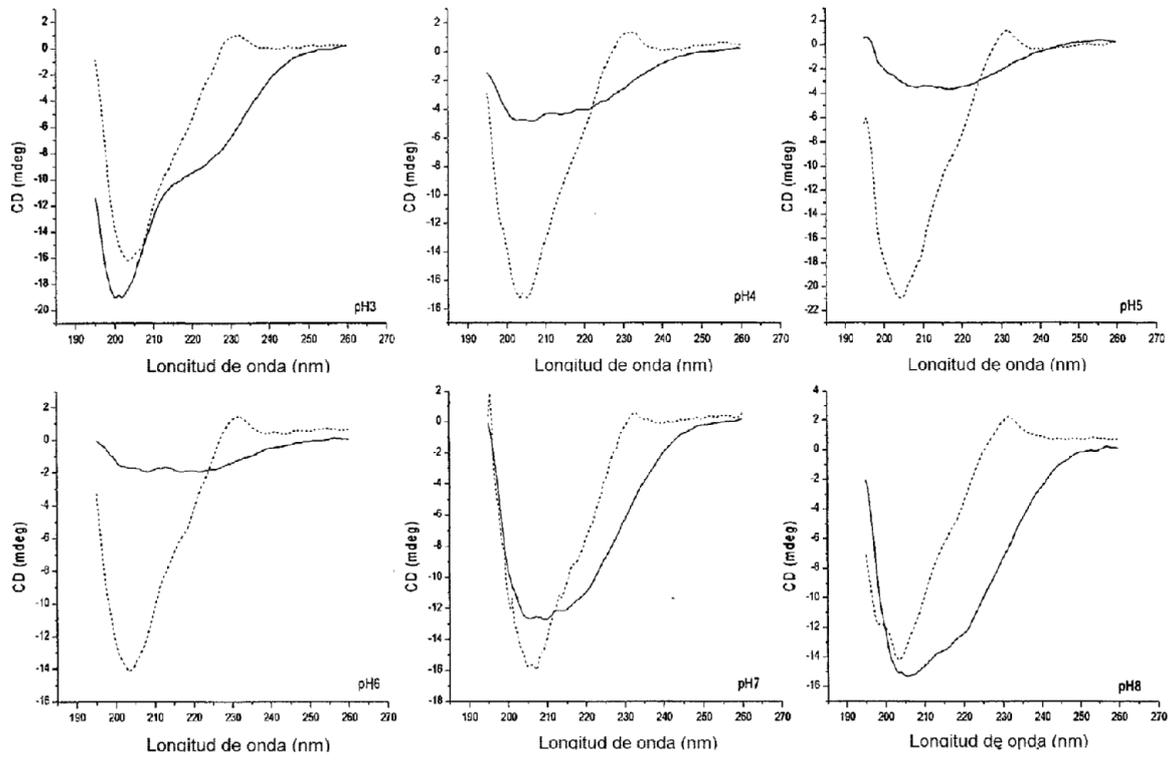


Figura 11

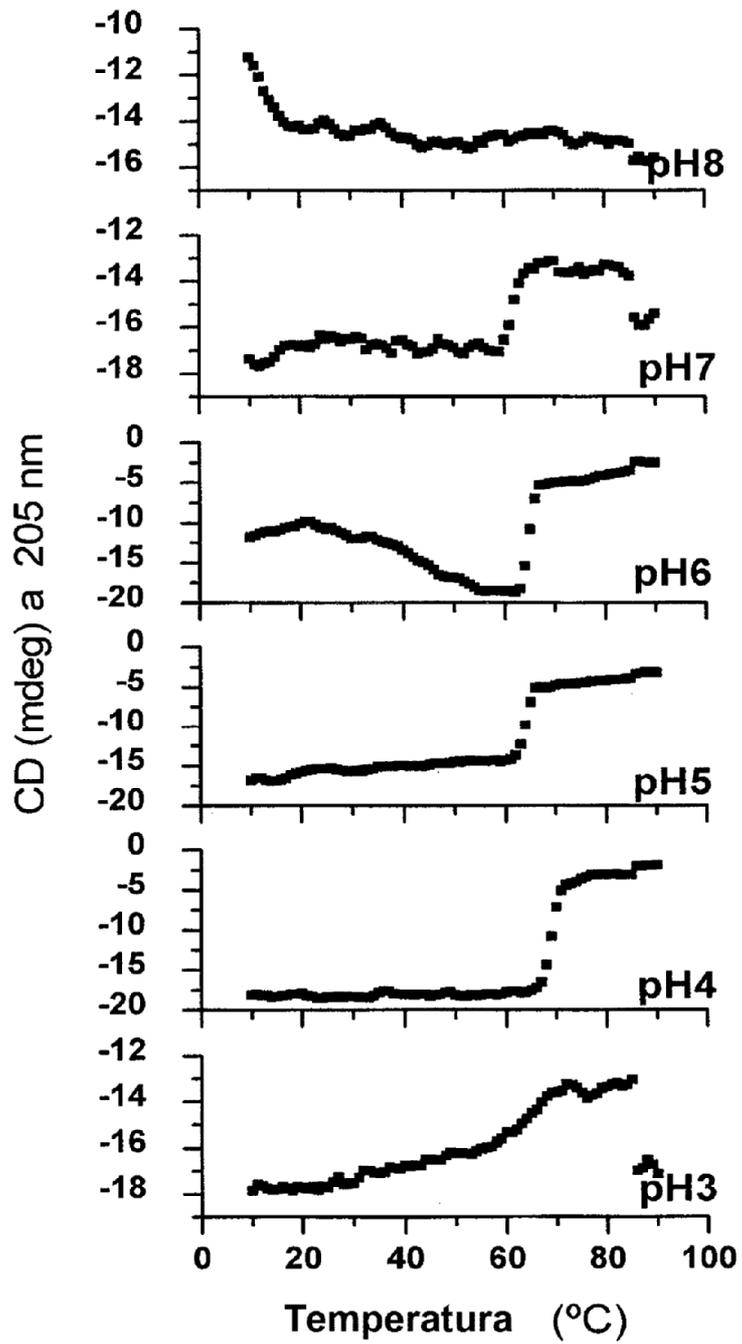


Figura 12

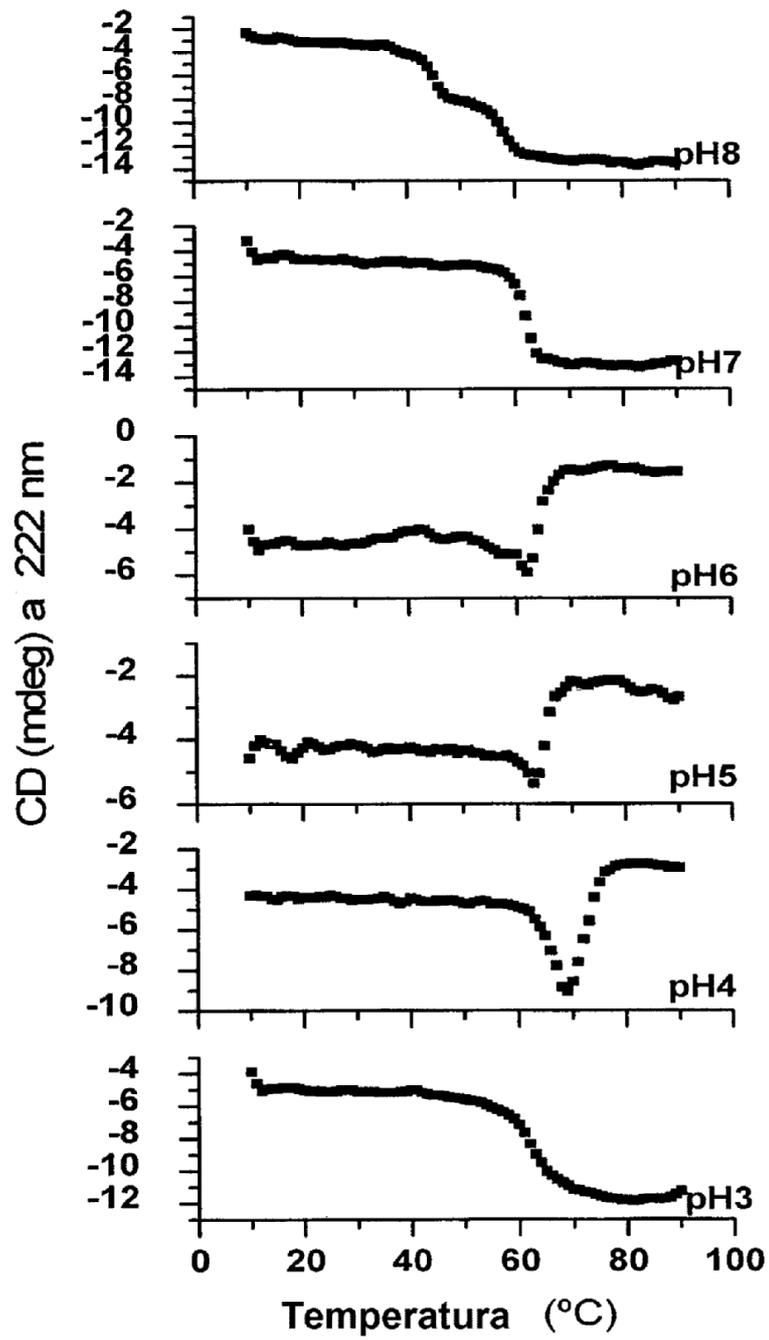


Figura 13

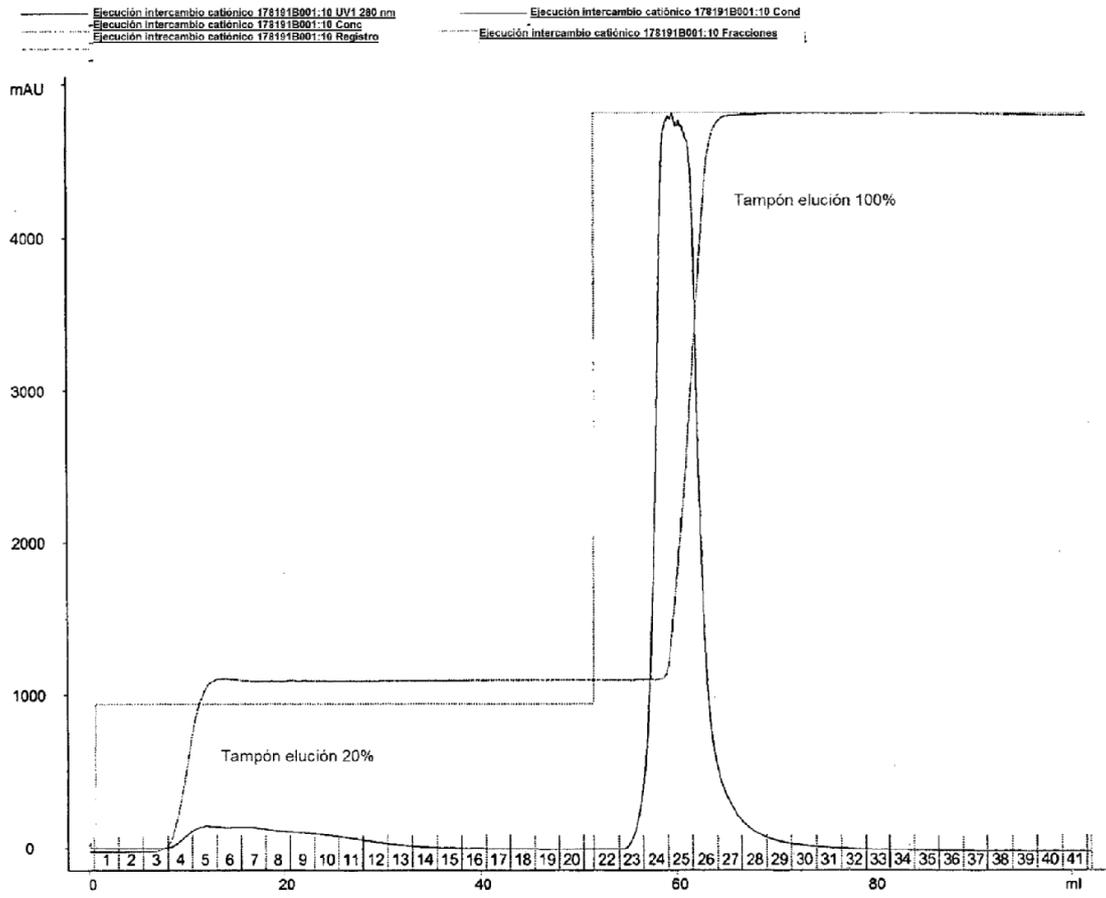


Figura 14

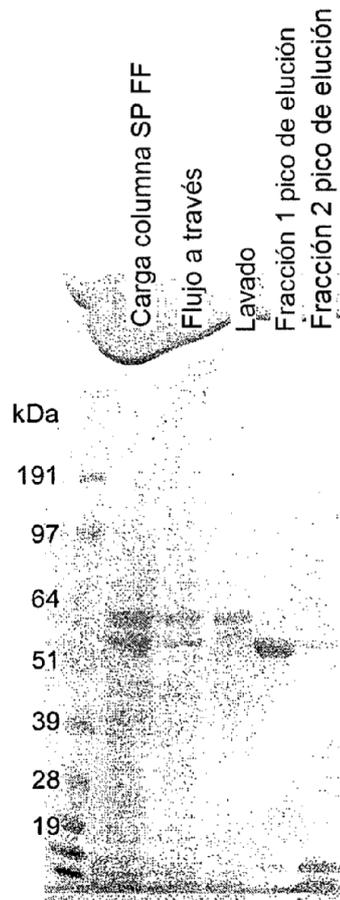


Figura 15

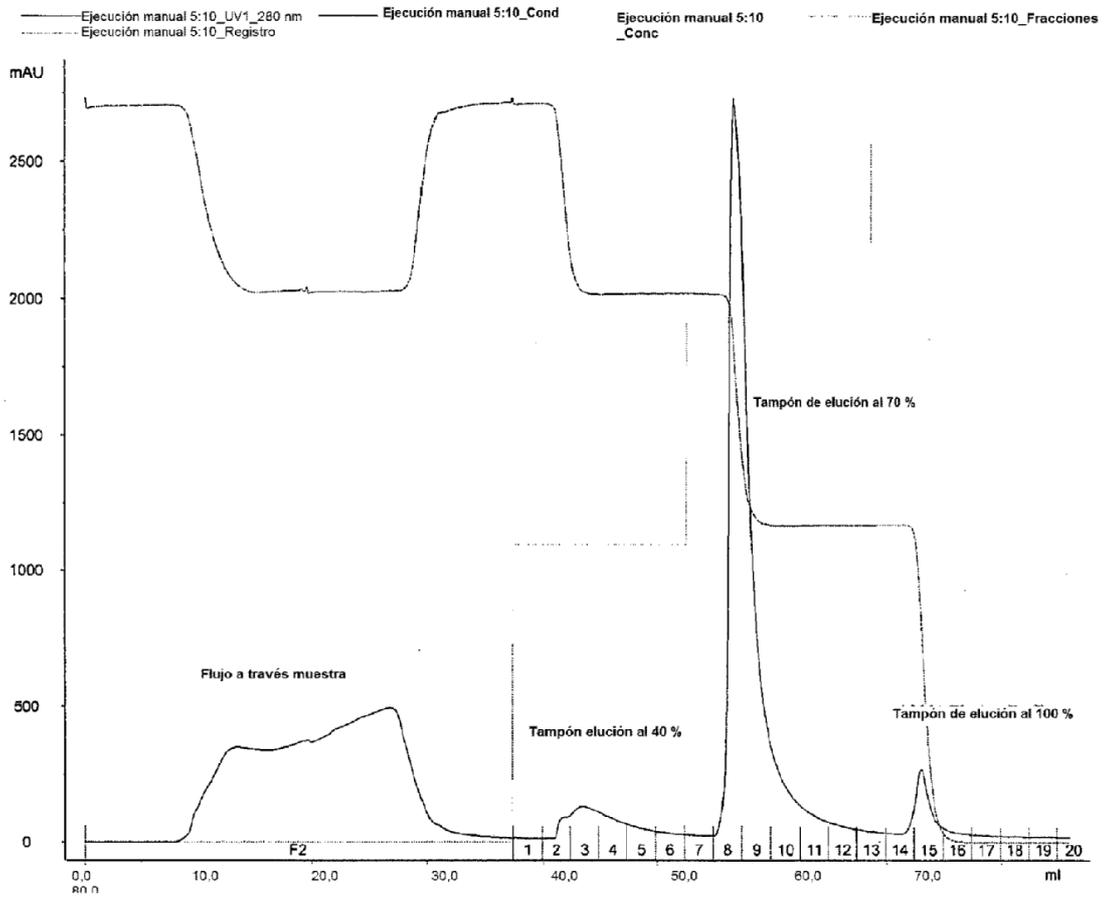


Figura 16

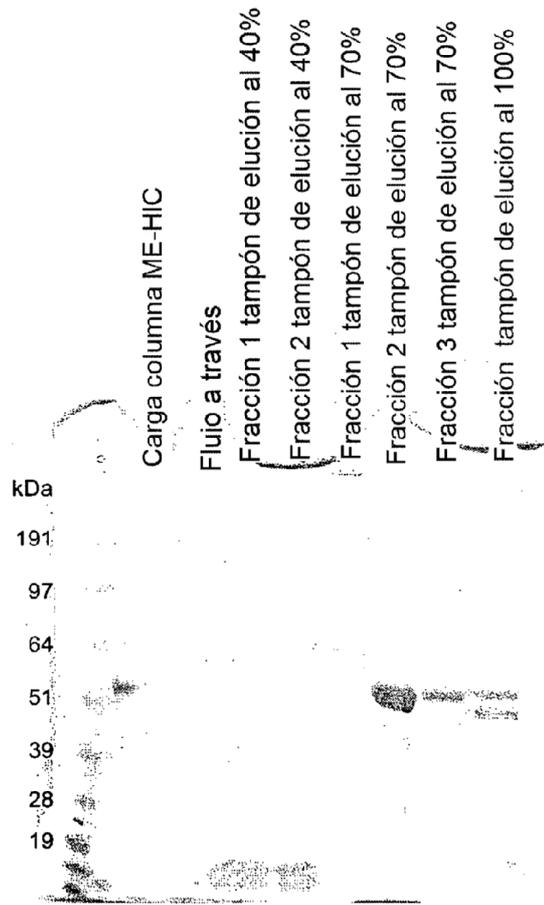


Figura 17

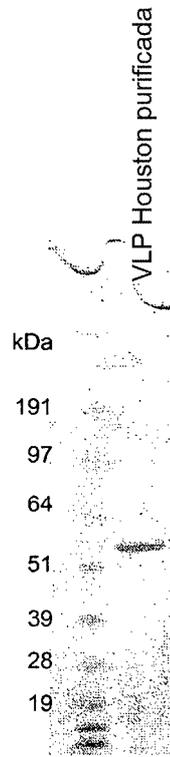


Figura 18

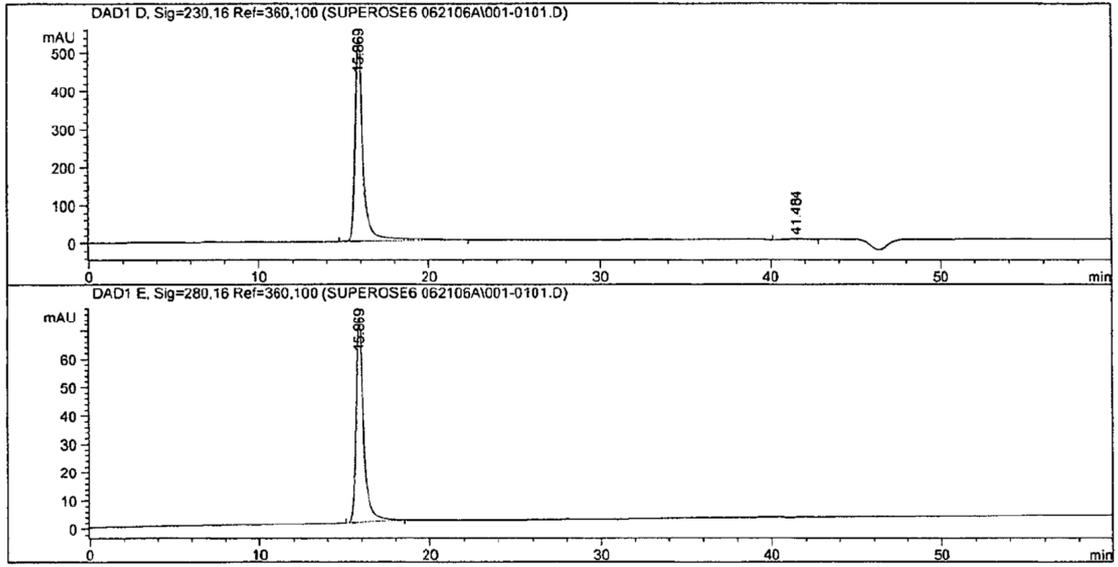


Figura 19

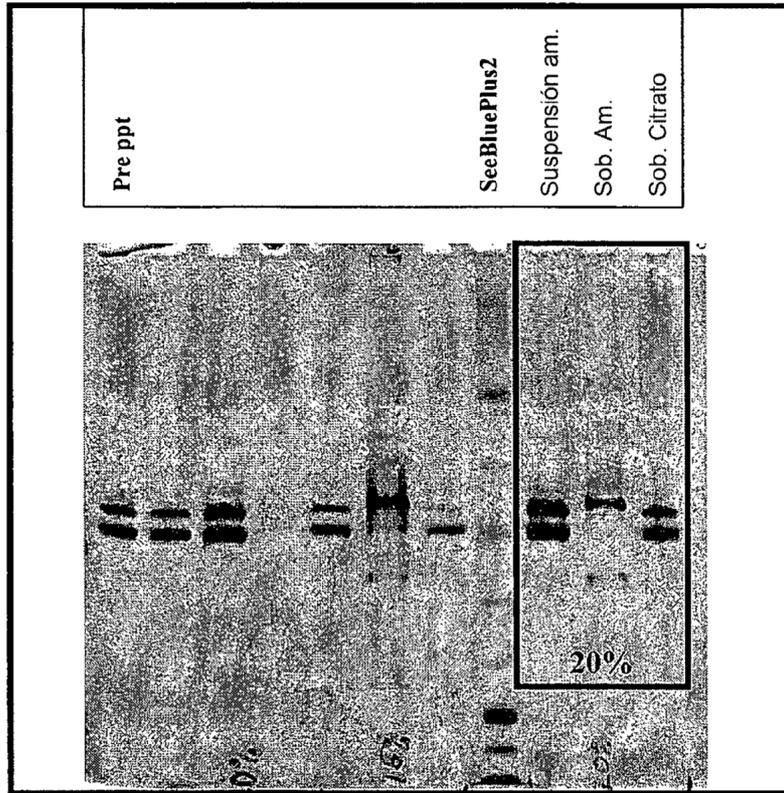


Figura 20

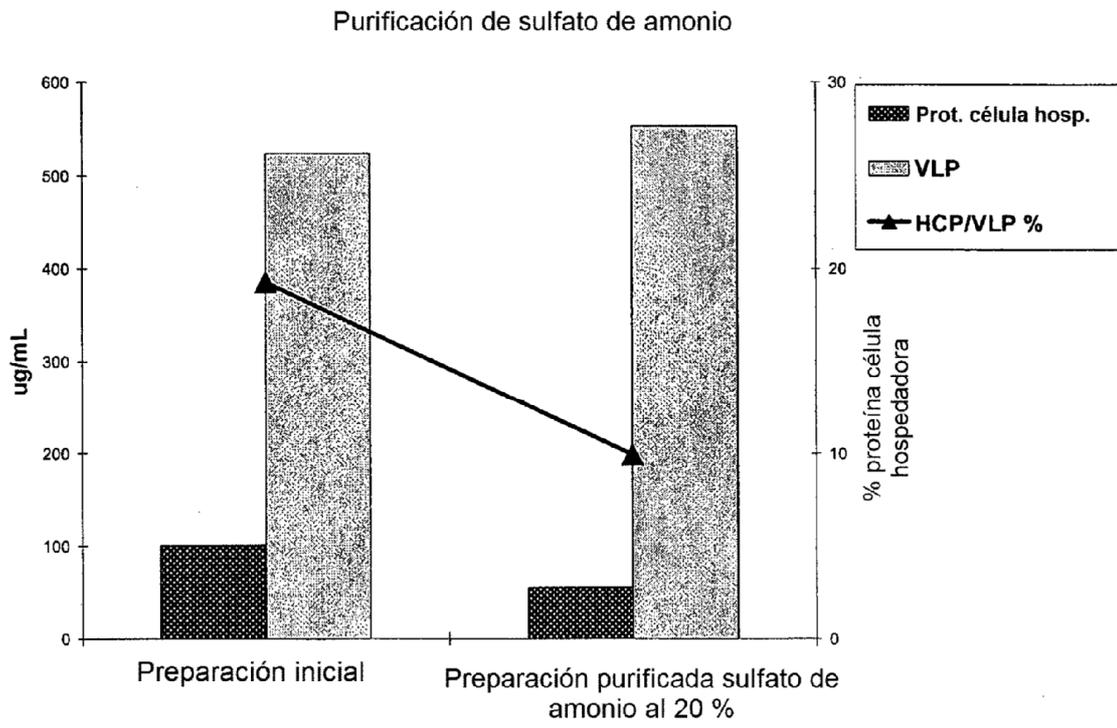
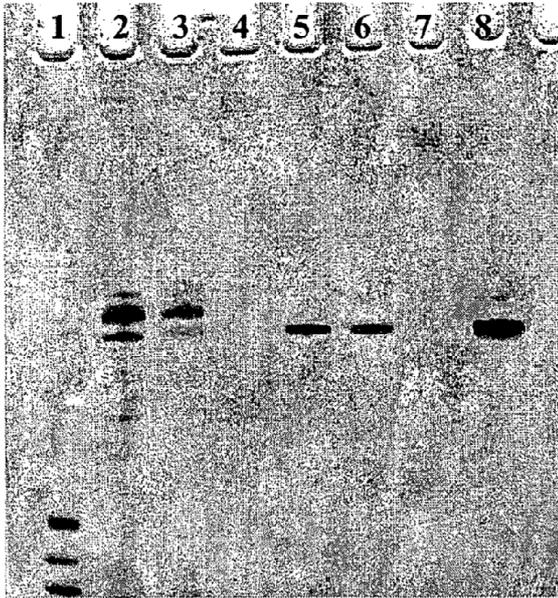
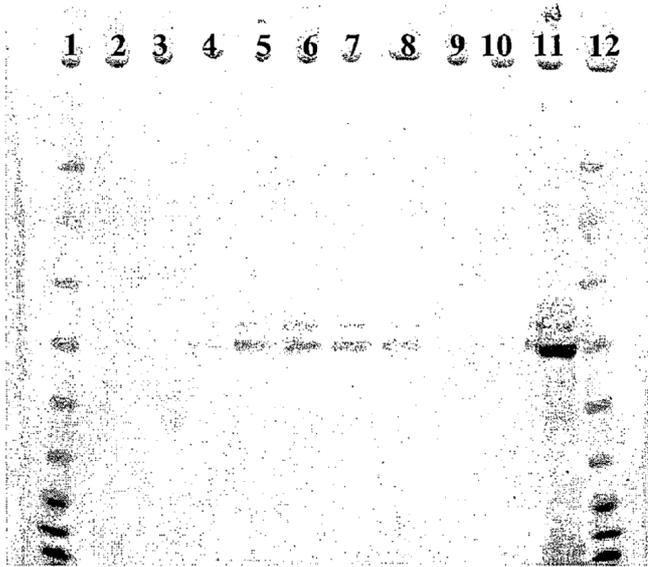


Figura 21



Carri	ID Muestra
1	Pat. PM
2	Cultivo infectado
3	Cultivo infectado a pH 5,5
4	Sobrenadante de cultivo a pH 5,5
5	Sedimento resuspendido
6	Extracto VLP
7	Q100 20% Elución
8	Q100 50% Elución

Figura 22



Carri	ID Muestra
1	Pat. PM
2	Flujo a través Q100
3	Fracción lavado Q100 20%
4	Fracción lavado Q100 20%
5	Fracción elución Q100 40%
6	Fracción elución Q100 40%
7	Fracción elución Q100 40 %
8	Fracción elución Q100 40 %
9	Fracción lavado Q100 100 %
10	Fracción lavado Q100 100 %
11	Extracto VLP

Figura 23

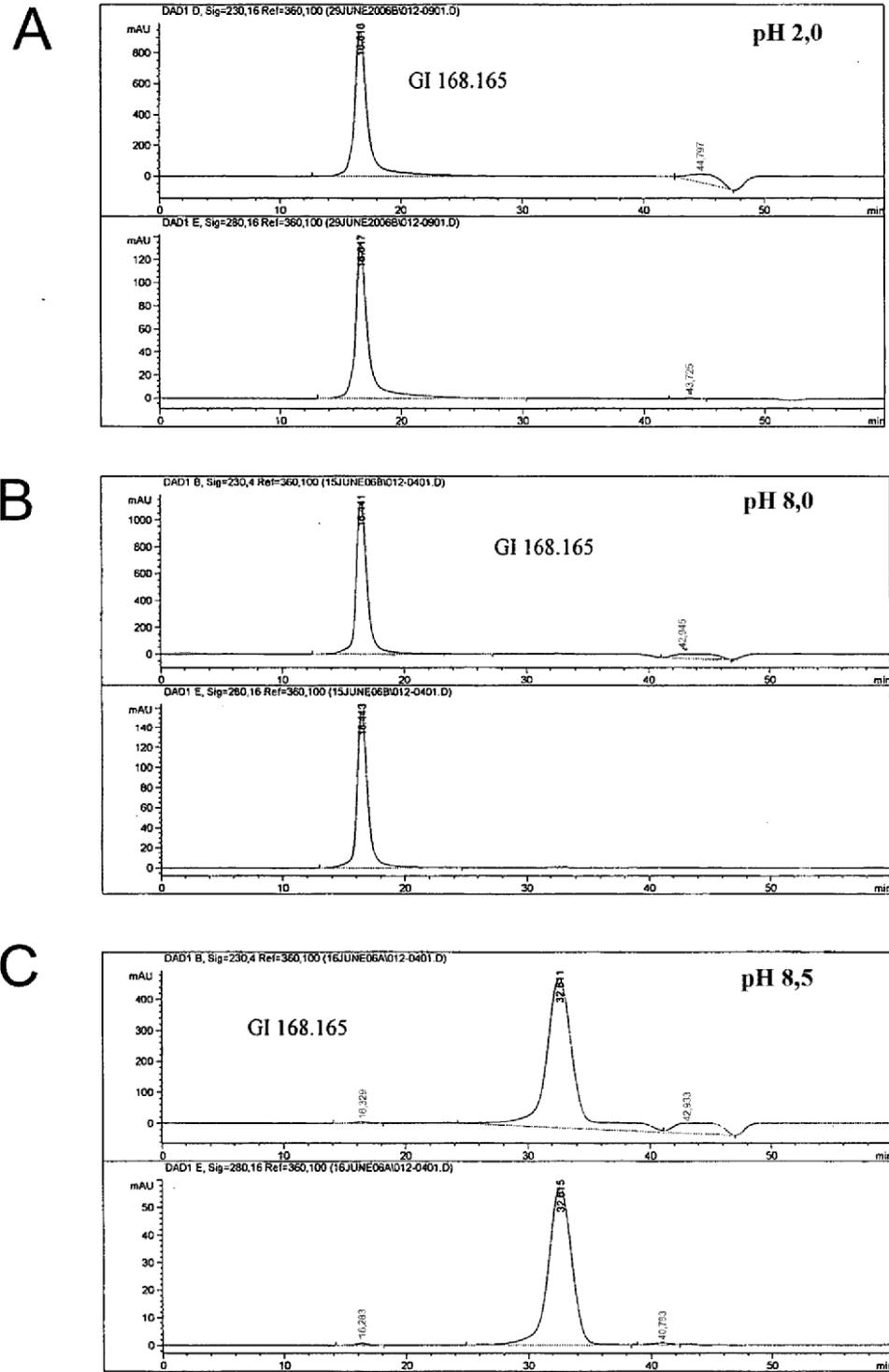


Figura 24

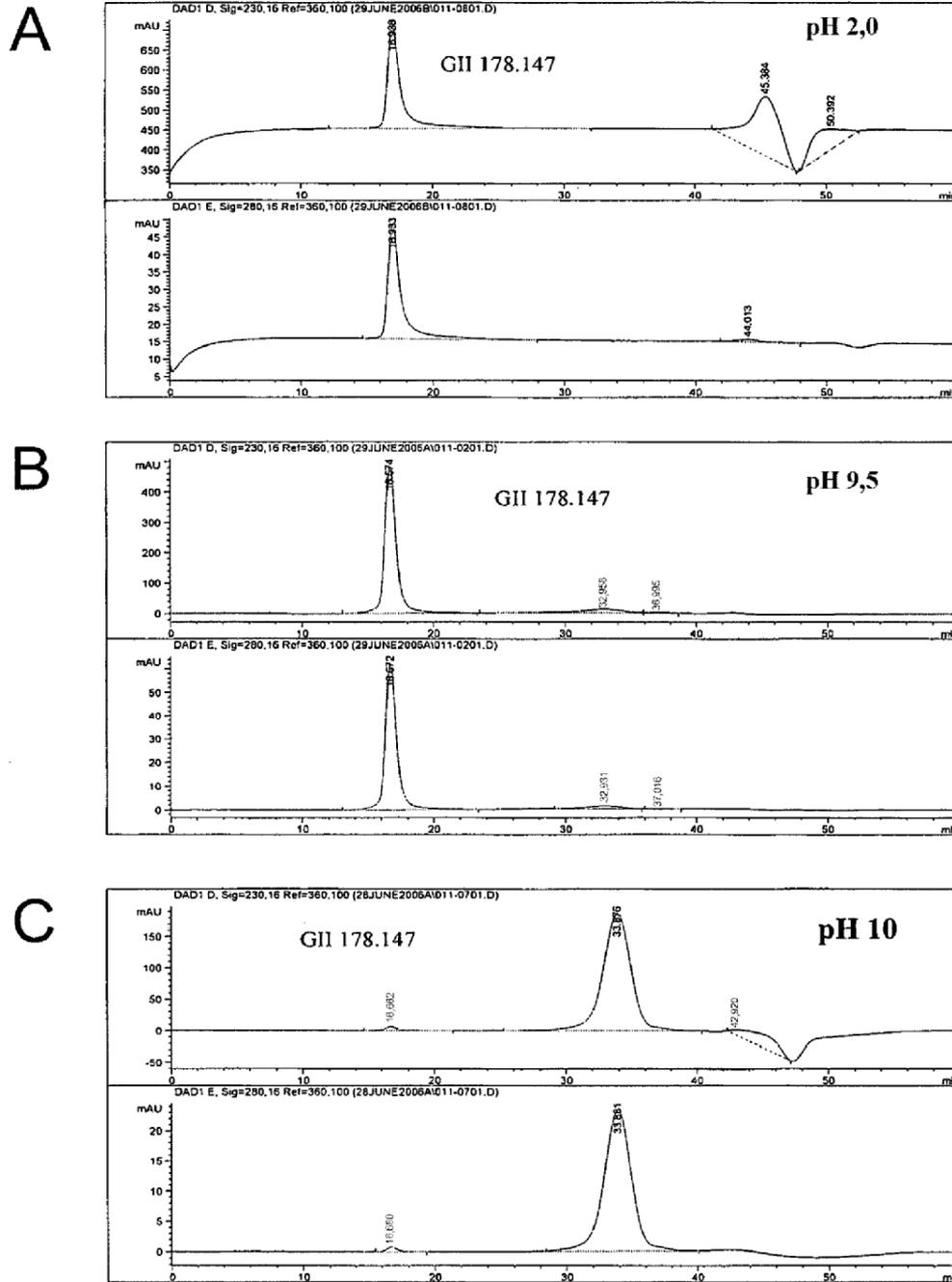


Figura 25