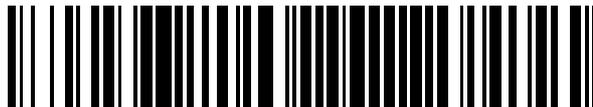


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 237**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2005 E 05799134 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 1814982**

54 Título: **Métodos mejorados de purificación viral**

30 Prioridad:

22.10.2004 US 621257 P

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

03.03.2016

73 Titular/es:

**ONCOLYTICS BIOTECH INC. (100.0%)
SUITE 210 1167 KENSINGTON CRESCENT N. W.
CALGARY, AB T2N 1X7, CA**

72 Inventor/es:

COFFEY, MATTHEW C.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 562 237 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

Métodos mejorados de purificación viral

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a un método de extracción de virus de un cultivo celular. En particular, el método es útil para la extracción de virus infecciosos en una forma que sea adecuada para administración clínica a mamíferos, incluyendo seres humanos.

Antecedentes

10 Debido a la vasta cantidad de enfermedades provocadas por virus, la virología es un campo que ha sido estudiado a profundidad. Siempre ha existido la demanda para producir virus en forma eficiente para aislar y purificar proteínas vírales, para generar vacunas o para proporcionar virus infecciosos para estudios de laboratorio. Recientemente, los nuevos desarrollos en terapia viral han necesitado adicionalmente de una producción eficiente de virus infecciosos.

15 La terapia de reovirus es un ejemplo de terapia vírica. El reovirus es un virus de ARN bicatenario capaz de unirse a una multitud de células. Sin embargo, la mayoría de las células no son susceptibles a una infección por reovirus, y la unión del reovirus a su receptor celular no produce replicación viral ni producción de partículas virales en estas células. Probablemente ésta sea la razón de por la que no se conoce que el reovirus esté asociado a ninguna enfermedad particular.

20 Las células transformadas con el oncogén ras se vuelven susceptibles a la infección por reovirus, mientras que sus contrapartes no transformadas no lo son (Strong y colaboradores, 1998). Por ejemplo, cuando células NIH 3T3 resistentes a reovirus se transforman con Ras o Sos activado, una proteína que activa a Ras, se potenció la infección por reovirus. De forma similar, fibroblastos de ratón que son resistentes a una infección por reovirus se hacen susceptibles después de transfección con el gen receptor del EGF o el oncogén v-erbB, que activan la ruta de ras (Strong y colaboradores, 1993; Strong y colaboradores, 1996). Por tanto, el reovirus puede infectar y replicarse selectivamente en células con una ruta de Ras activada.

25 El oncogén ras es el responsable de un gran porcentaje de tumores de mamífero. Se producen mutaciones activadoras del propio gen ras en aproximadamente 30% de todos los tumores humanos (Bos, 1989), principalmente en carcinomas pancreáticos (90%), colorrectales esporádicos (50%) y pulmonares (40%), así como en la leucemia mieloide (30%). La activación de factores secuencia arriba o secuencia abajo de ras en la ruta de ras también está asociada a los tumores. Por ejemplo, la sobreexpresión de HER2/Neu/ErbB2 o del receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGF) es común en cáncer de mama (25-30%), y la sobreexpresión del receptor del factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o del receptor de EGF predomina en gliomas y glioblastomas (40-50%). Se sabe que tanto el receptor de EGF como el receptor de PDGF activan a ras tras la unión a sus respectivo ligando, y v-erbB codifica un receptor constitutivamente activado que carece de dominio extracelular.

35 Ya que una gran cantidad de tumores humanos se explican por la alteración genética del protooncogén ras o una gran actividad de Ras, la terapia de reovirus es una terapia nueva y prometedora para tales condiciones (Coffey y colaboradores, 1998). La terapia de reovirus es muy selectiva para células tumorales asociadas a Ras y deja a las células normales sin infectar. Esta terapia tiene muchas aplicaciones y puede utilizarse tanto en animales humanos como no humanos.

40 Para producir reovirus adecuados para administración clínica, se necesitan métodos rápidos y eficientes para producir reovirus en células cultivadas. Además, el método tradicional para purificar virus a partir de células cultivadas es tedioso y prolongado, y hace que el coste de la producción de virus sea demasiado elevado. Por tanto, también se necesita un método mejorado para la purificación de virus.

Resumen de la invención

45 La presente invención se refiere a un método mejorado para extraer y purificar virus a partir de cultivos celulares que puede aplicarse tanto a la producción de virus a pequeña como a gran escala. El método implica una etapa de extracción sencilla en la que se añade directamente un detergente al cultivo celular. Después pueden retirarse los residuos celulares de la mezcla de extracción, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación. La suspensión de virus resultante puede concentrarse aún más y/o enriquecerse mediante métodos cromatográficos. El virus preparado de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para cualquier fin, incluyendo la purificación de proteínas virales, vacunación, infección de células huéspedes y administración clínica.

50 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona un método para producir virus a partir de un cultivo de células de acuerdo con la reivindicación 1.

- Puede utilizarse cualquier método para retirar los residuos celulares (es decir, para aclarar el lisado celular) en la etapa (c). El método es preferiblemente un método sencillo basado en las diferencias de tamaño o de densidad entre el virus y los otros constituyentes del lisado celular (por ejemplo, filtración o centrifugación). Más preferiblemente, se emplea la filtración, particularmente la filtración por etapas. Una filtración apropiada por etapas comprende un prefiltro que tiene un tamaño de poro mayor, seguido de al menos otro filtro con un tamaño de poro menor que el del prefiltro. En una realización preferida, los residuos celulares se retiran mediante una filtración por etapas, que comprende:
- (1) la filtración a través de un prefiltro que tiene un tamaño de poro de 5 μM u 8 μM , y
 - (2) la filtración después de la etapa (1) a través de un filtro combinado que tiene tamaños de poro de 3 μM y 0,8 μM .
- En otra realización preferida, la etapa (2) anterior comprende filtración después de la etapa (1) a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,8 μM .
- El lisado celular puede ser tratado opcionalmente con endonucleasa BENZONASA® u otra enzima para escisión del ADN para romper el ADN celular largo y viscoso. Después de retirar los residuos celulares mediante filtración, se puede concentrar opcionalmente el filtrado para reducir el volumen de la suspensión vírica. Puede emplearse cualquiera de los métodos adecuados para concentración viral, preferiblemente ultrafiltración o diafiltración, incluyendo filtración de flujo tangencial. Los ejemplos de métodos incluyen el sistema de placa y marco, y el sistema de fibras huecas. Más preferiblemente se usa el sistema de fibras huecas. Más preferiblemente, se utiliza el sistema de fibra hueca. En una realización preferida, la diafiltración con el sistema de fibras huecas comprende el uso de un cartucho de fibras huecas que tiene un corte de peso molecular de 300 kDa.
- El presente método puede aplicarse a la producción de cualquier virus sin envoltura, y preferiblemente un reovirus. El reovirus es preferiblemente un reovirus de mamífero, más preferiblemente un reovirus humano, aún más preferiblemente un reovirus de serotipo 3, y lo más preferiblemente un reovirus de la cepa Dearing. El reovirus puede ser un reovirus recombinante. El reovirus recombinante puede generarse mediante coinfección de células, tales como células de mamífero o células aviares, con diferentes subtipos de reovirus. Los reovirus recombinantes pueden ser de origen natural o no natural. El reovirus recombinante puede ser de dos o más cepas de reovirus, en particular de dos o más cepas de reovirus seleccionadas del grupo que consiste en la cepa Dearing, la cepa Abney, la cepa Jones y la cepa Lang. El reovirus recombinante también puede resultar de la redistribución de reovirus de diferentes serotipos, tal como los seleccionados del grupo que consiste en reovirus de serotipo 1, reovirus de serotipo 2 y reovirus de serotipo 3. El reovirus recombinante puede comprender variantes de secuencias codificadoras de proteínas de la envoltura de origen natural o secuencias mutadas codificadoras de proteínas de la envoltura.
- El cultivo celular utilizado en la presente invención puede comprender cualquier célula apropiada para la producción del virus deseado. Para los reovirus, las células son preferiblemente células 293 de riñón embrionario humano (HEK 293) o células derivadas de las mismas, en particular células HEK 293 que han sido adaptadas para crecer en cultivos en suspensión.
- El método puede comprender opcionalmente una etapa de cromatografía de intercambio iónico, en la que el virus se enriquece mediante el enlazamiento a una resina de intercambio iónico bajo condiciones de enlazamiento apropiadas. El virus luego se eluye del intercambiador iónico utilizando una disolución de elución adecuada. La elección del intercambiador iónico y de las condiciones de enlazamiento/elución variarán de acuerdo con el virus que se está purificando. Para los reovirus, un intercambiador aniónico y un pH de aproximadamente 7,0-9,0 es lo más eficaz. El pH es preferiblemente de aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 8,5, y más preferiblemente de aproximadamente 8,0. El intercambio iónico se realiza en un regulador de fosfato, tal como fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2. El regulador de enlazamiento/elución está preferiblemente libre de sales de magnesio.
- El virus también puede ser purificado mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía de exclusión por tamaño se lleva a cabo en un regulador de fosfato, tal como fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2. Además, la cromatografía de exclusión por tamaño puede llevarse a cabo en ausencia de sales de magnesio. En particular, se puede emplear una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión por tamaño. En una realización, se purifica el reovirus usando un intercambiador de aniones seguido por cromatografía de exclusión por tamaño.
- La presente invención permite una composición que comprende el virus purificado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos aquí. La composición es preferiblemente adecuada para administración clínica, particularmente administración clínica a seres humanos. Más preferiblemente, la composición comprende un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe aquí un método para producir reovirus infecciosos, que comprende:

- (a) proporcionar un cultivo de células HEK 293 que ha sido infectado por reovirus;
- (b) extraer el virus de las células mediante la adición de Triton® X-100 (octoxinol-9 a 10) al cultivo e incubar a aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 37°C;
- (c) tratar la mezcla de la etapa (b) con endonucleasa BENZONASE^{MR};
- 5 (d) retirar los residuos celulares mediante filtración;
- (e) concentrar el filtrado mediante ultrafiltración o diafiltración;
- (f) purificar el reovirus mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión por tamaño; y
- (g) recolectar el virus.
- 10 También se describen composiciones que comprenden el reovirus recogido de acuerdo con este método, particularmente composiciones que comprenden además un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de los dibujos, y de las reivindicaciones.
- 15 Descripción de los dibujos
- La Figura 1 muestra la separación del material del reovirus por ultrafiltración/diafiltración de material (UF/DF) a 150 cm/h. El material era regulador intercambiado en fosfato 50 mM pH 7,2, 5% de glicerol en una columna de flujo rápido HR5_200 Sefarosa 4. Se aplicaron 0,30 CV de la muestra. Se recogió el volumen vacío, eluyendo de 0,37 CV - 0,62 CV. Eje x en CV; eje y en unidades de miliabsorción a 280 nm.
- 20 La Figura 2 muestra la separación del material purificado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en un Ata Explorer 100 a 50 cm/h. Regulador A: acetato de sodio 50 mM pH 5,6, 5% de glicerol. Regulador B: A+ cloruro de sodio 1 M. Eje x en ml; eje y en unidades miliabsorción a 280 nm. La línea CM A280 indica el perfil de elución de una columna de 1 ml HiTrap CM Sefarosa, la línea A280 SP de una columna de 1 ml de Sefarosa HiTrap SP.
- 25 La Figura 3 muestra la separación del reovirus SEC previamente purificado en diferentes columnas de intercambio aniónico HiTrap. Velocidad de flujo: 50 cm/h. Regulador A: TrisCl 25 mM pH 7,2, 5% de glicerol. Regulador B: cloruro de sodio 1 M A+. Se corrió un gradiente de 10 CV para eluir el material. Eje x en ml; eje y en unidades de miliabsorción a 280 nm. Los perfiles de elución como se detectan a A280 nm fueron los siguientes: A280 DEAE = Flujo rápido de Sefarosa DEAE; A280 Q XL = Q Sefarosa XL, ANX Alta Sub = ANX alta sub; Q HP = Q Sefarosa HP.
- 30 La Figura 4 muestra la determinación de la capacidad de enlazamiento dinámica habiendo atravesado 5-10% en una columna HP HRS_100 Q Sefarosa a 50 cm/h. Se aplicaron más de 12 CV antes de observar el avance. Regulador A: fosfato de sodio 50 mM pH 7,2, 5% de glicerol. Regulador B: fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, 5% de glicerol, cloruro de sodio 2 M. LA Se utilizó un gradiente lineal de 10 CV para cloruro de sodio 1 M, seguido de una etapa de 5 CV para cloruro de sodio 2 M. Se determinaron las fracciones virales (actividad viral) mediante RT-PCR y transferencias tipo Western. Eje Y: A280 nm en mAU, eje x: volumen en ml.
- 35 La Figura 5 muestra el desarrollo de un protocolo por etapas para una fácil ampliación de la captura de reovirus en una columna HP Q Sefarosa. Purificación de 5 CV de reovirus por UF/DF ajustada a pH 7,2 con ácido clorhídrico diluido en una columna HP HRS_100 Q Sefarosa conectada a un Aekta Explorer 100. Regulador A: fosfato de sodio 50 mM pH 7,2, 5% de glicerol. Regulador B: fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, 5% de glicerol, cloruro de sodio 2 M. Gradiente por etapas: 12,0% de B durante 5 CV (lavado), 25% de B durante 5 CV (elución), 50% de B durante 5 CV (regeneración) y CIP para 2 CV (hidróxido de sodio 1 M, seguido por 5 CV del 100% de B). Eje Y: mAU, eje x: volumen en ml. Las fracciones que contienen virus se indican mediante reo +.
- 40 La Figura 6 muestra un escalamiento de 8 veces de la captura de reovirus en una columna HP Q Sefarosa. Purificación de 10 CV de reovirus por UF/DF ajustada a pH 7,2 con ácido clorhídrico diluido en una columna HP HR10_100 Q Sefarosa. Regulador A: fosfato de sodio 50 mM pH 7, 2,5% de glicerol. Regulador B: fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, 5% de glicerol, sodio cloruro 1 M. Gradiente por etapas: 12,0% de B durante 5 CV (lavado), 25% de B durante 5 CV (elución), 50% de B durante 5 CV (regeneración) y CIP para 2 CV (hidróxido de sodio 1 M, seguido por 5 CV de 100% de B). Eje Y: mAU, eje x: volumen en ml. El virus eluyó en las fracciones B3/2 en un volumen de ~ 5 ml.
- 45

La Figura 7 muestra un escalamiento de 8 veces de la segunda etapa de la purificación de la fracción del virus en una columna de 20 ml de flujo rápido HR10_200 Sefarosa 4. Se aplicaron 0,25 CV (fracciones B3/2 como se muestra en la Figura 6). Velocidad de flujo lineal: 150 cm/h. Regulador: PBS, 5% de glicerol.

5 La Figura 8A muestra un gel de 4-12% de SDS PAGE teñido con plata de: carril 1: fracción del virus después de purificación en una columna HP Q Sefarosa, carril 2 estándar purificado de CsCl, carril 3: material final purificado SEC diluido 2 veces.

La Figura 8B muestra un gel teñido con Coomassie de 4-12% de SDS PAGE del procedimiento de purificación. Carril 1, material de partida, carril 2 material Q Sefarosa, carril 3 material de CsCl diluido 2 veces, carril 4 material de CsCl sin diluir, carril 5 material purificado de SEC.

10 La Figura 8C es una tabla de las recuperaciones de reovirus según lo determinado por TCID50.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un método mejorado de extracción y purificación de virus a partir de un cultivo celular que puede aplicarse a la producción de virus tanto a pequeña como a gran escala. El método implica una etapa de extracción simple en la que se añade directamente un detergente al cultivo celular. Después de eso, se pueden retirar los residuos celulares de la mezcla de extracción, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación. La suspensión de virus resultante puede concentrarse y/o enriquecerse aún más mediante métodos cromatográficos. El virus preparado de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para cualquier propósito, incluyendo la purificación de proteínas virales, vacunación, infección de células huésped y administración clínica.

20 Antes de describir con más detalle la invención, se definen los términos utilizados en esta solicitud de la siguiente forma, a menos que se indique lo contrario.

Definiciones

25 Tal como se utiliza en el presente documento, "células adherentes" se refieren a células que se adhieren a los recipientes de cultivo en un cultivo celular. Ejemplos de células adherentes incluyen células en monocapa, que son células que forman una única capa de células sobre la superficie de un recipiente de cultivo. "Células en suspensión" o "células suspendidas" se refiere a células que no se adhieren a recipientes de cultivo en un cultivo celular. Las células en suspensión se pueden cultivar en un "cultivo con agitación", que es un cultivo en el que el medio de cultivo se agita continuamente durante el proceso de cultivo.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, "temperatura ambiente" se refiere a una temperatura entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 30°C. Temperatura ambiente está preferiblemente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 30°C, más preferiblemente entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 25°C, y lo más preferiblemente aproximadamente 25°C.

35 Tal como se usa en el presente documento, un virus que está "asociado a una célula" se refiere a un virus que está unido o atrapado en parte de una célula en la que el virus ha sido producido. Por lo tanto, un virus está asociado a una célula antes de lisar la célula huésped. Cuando comienza la lisis celular, un virus puede ser todavía unido o atrapado en parte de la célula rota y permanece asociado a la célula. Sin embargo, cuando el virus se libera en el medio, ya no está asociado a la célula. Un "virus libre de células" es un virus que no está asociado a las células.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, un "cultivo celular" o "cultivo de células" significa una población de células cultivadas tal como se encuentran en sus condiciones de cultivo. En particular, un cultivo celular incluye las células y el medio de cultivo. Las células que han sido sedimentadas no se consideran un cultivo celular a menos que se coloquen en un medio de cultivo bajo nuevas condiciones de cultivo.

Tal como se usa en el presente documento, "lisis celular" se refiere a la ruptura de la membrana celular de una célula y la posterior liberación de todo o parte del contenido de la célula.

45 Tal como se usa en el presente documento, "administración clínica" de una sustancia se refiere a poner en contacto cualquier parte del cuerpo de un organismo vivo con la sustancia con el fin de mejorar o mantener las condiciones de salud del organismo.

50 Tal como se usa en el presente documento, "recolección" del virus se refiere al acto de separar el virus producido a partir de un cultivo de células que ha sido infectado previamente con el virus. El virus se recolecta típicamente mediante la separación de los residuos celulares del virus y la recolección de la parte que comprende el virus. Opcionalmente, se puede separar adicionalmente el virus de las sustancias solubles, por ejemplo, por centrifugación.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, "condiciones de cultivo" se refiere a las condiciones utilizadas en un cultivo celular, incluyendo, pero no limitado a la temperatura, el tipo de recipientes de cultivo, la humedad, la concentración de CO₂ o cualquier otro gas usado en los recipientes de cultivo, el tipo de medio de cultivo, la densidad inicial de las células cultivadas, y, si las células están infectadas con un virus, la multiplicidad inicial de la infección.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, "efecto citopático" es el daño a las células huésped infectadas. El efecto citopático se puede indicar por las células que adquieren una apariencia hinchada y granulada y grupos de células que se rompen. Las células que muestran un efecto citopático también pueden absorber el colorante de tinción en un recuento de células viables.
- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, un "detergente" es una sustancia que tiene una fracción hidrofílica y una fracción hidrófoba. El detergente es preferiblemente un compuesto químico sintético y más preferiblemente un compuesto químico sintético biodegradable. Un detergente útil en la presente invención mejora la ruptura de las membranas celulares para facilitar la liberación del contenido de las células rotas.
- Tal como se usa en el presente documento, una célula se "rompe" cuando se rompe la membrana celular y se libera al menos algo del contenido celular de la célula. Se puede romper una célula, por ejemplo, mediante tratamientos de congelación-descongelación, sonicación o con detergente.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, "extracción" de un virus se refiere al acto de la conversión de un virus asociado a una célula en un virus libre de células.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, "células HEK 293" se refiere a la línea celular de riñón embrionario humano designada 293 (número ATCC CRL-1573) o sus derivados. Por ejemplo, las células 293/SF (número ATCC CRL- 1573.1) son células HEK 293 que se han adaptado para crecer en medio libre de suero. También se contemplan en esta invención las células HEK 293 adaptadas para crecer en otras condiciones de cultivo, o cualquier tipo de células HEK 293 o derivados que se transforman con un ADN exógeno, siempre que esta transformación no perjudique la capacidad de las células para apoyar la producción eficiente de reovirus como se describe en esta invención.
- Tal como se usa en el presente documento, "incubación" después de la adición de un detergente a un cultivo celular se refiere al acto de permitir que el cultivo celular se mezcle con el detergente durante un período de tiempo.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, "multiplicidad de infección" o "MOI" se refieren a la relación entre el número de virus con respecto al número de células cuando se usa un virus para ponerse en contacto con las células.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, un "virus sin envoltura" es un virus que no tiene una envoltura. Por ejemplo, un virus sin envoltura puede ser cualquier virus que pertenezca a la familia Adenoviridae (por ejemplo, adenovirus), Picornaviridae (por ejemplo, el virus de la polio), Reoviridae (por ejemplo, reovirus), Papovaviridae (por ejemplo, el virus del papiloma), Parvoviridae (por ejemplo, el virus Kilham de la rata) o Iridoviridae (por ejemplo, virus iridiscente de la tígula).
- 40 Tal como se usa en el presente documento, un "reovirus" se refiere a cualquier virus clasificado en el género de los reovirus, ya sea natural, modificado o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma de ARN bicatenario segmentado. Los viriones tienen un diámetro de 60-80 nm y poseen dos cubiertas de cápside concéntricas, cada una de las cuales es icosaédrica. El genoma consiste en ARN bicatenario en 10-12 segmentos discretos con un tamaño total del genoma de 16-27 kpb. Los segmentos de ARN individuales varían en tamaño. Se han recuperado tres tipos de reovirus distintos pero relacionados procedentes de muchas especies. Los tres tipos comparten un antígeno común de fijación del complemento.
- 45 El reovirus humano consiste en tres serotipos: el tipo 1 (cepa Lang o T1L), el tipo 2 (cepa Jones, T2J) y el tipo tres (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres serotipos pueden identificarse con facilidad con base en ensayos de neutralización e inhibición de hemaglutinina (véase, por ejemplo, Fields, B.N. y colaboradores, 1996).
- El reovirus puede ser de origen natural o modificado. El reovirus es "de origen natural" cuando puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionadamente en el laboratorio por los seres humanos. Por ejemplo, el reovirus puede proceder de una "fuente de campo", es decir, de un ser humano que ha sido infectado con el reovirus.
- 50 El reovirus puede ser un reovirus recombinante que surge de la recombinación/reordenamiento de segmentos genómicos procedentes de dos o más reovirus genéticamente distintos. La recombinación/reordenamiento de segmentos genómicos de reovirus puede producirse en la naturaleza tras la infección de un organismo huésped con

al menos dos reovirus genéticamente distintos. También pueden generarse viriones recombinantes en un cultivo celular, por ejemplo, mediante coinfección de células huésped permisivas con reovirus genéticamente distintos (Nibert y colaboradores, 1995).

5 Por consiguiente, la invención contempla los reovirus recombinantes que surgen del reordenamiento de segmentos del genoma procedentes de dos o más reovirus genéticamente distintos, que incluyen, pero no se limitan a, reovirus humanos, tales como reovirus de mamífero no humano de tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang), tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones) y tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney), o reovirus aviar. La invención contempla también reovirus recombinantes que surgen del reordenamiento de segmentos del genoma procedentes de dos o más reovirus genéticamente distintos, en los que al menos un virus progenitor está modificado genéticamente, comprende uno o
10 más segmentos genómicos sintetizados químicamente, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos, o en sí mismo es el resultado de un evento de recombinación. La invención contempla también al reovirus recombinante que ha sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos, que incluyen, pero no se limitan a, sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos que incluyen, pero no se limitan a, luz ultravioleta y otras formas de radiación.

15 La invención contempla además reovirus recombinantes que comprenden supresiones o duplicaciones en uno o más segmentos del genoma, que comprenden información genética adicional como resultado de recombinación con el genoma de una célula huésped, o que comprenden genes sintéticos.

El reovirus puede ser modificado mediante la incorporación de proteínas de la envoltura mutadas tales como, por ejemplo $\sigma 1$, en la cápside externa del virión. Las proteínas pueden mutarse mediante reemplazo, inserción o
20 supresión. El reemplazo incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de residuos aminoácidos adicionales en la proteína en uno o más sitios. Las supresiones incluyen supresiones de uno o más residuos aminoácidos en la proteína. Estas mutaciones pueden generarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio del oligonucleótido del gen que codifica para una de las proteínas de la envoltura puede producir la generación de la proteína mutante deseada de la envoltura. La expresión de la proteína mutada en células de mamífero infectadas con el reovirus *in vitro*, tales como células COS1, dará como resultado la incorporación de la proteína mutada en la partícula del virión del reovirus (Turner y Duncan, 1992; Duncan y colaboradores, 1991; Mah y colaboradores, 1990).

Como se usa en el presente documento, "viabilidad de las células" o "porcentaje de células viables restantes" es el porcentaje de las células que no muestran un efecto citopático en una población.

30 Como se usa en el presente documento, "infección viral" se refiere a la entrada de un virus en una célula y la posterior replicación del virus en la célula.

Métodos

Hemos desarrollado previamente un método para cultivar reovirus en células HEK 293 (publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20020037576). El reovirus se replica en células HEK 293 para producir un título
35 más alto de virus en las células poco tiempo después de la infección viral, proporcionando así un método sencillo y eficaz para producir reovirus. Además, se han adaptado las células HEK 293 para que crezcan en suspensión, que pueden ser cultivadas en grandes cantidades, y hemos desarrollado un método de producción a gran escala. Para aislar el reovirus del cultivo en suspensión, se siguieron inicialmente métodos tradicionales para extraer y purificar partículas virales. En resumen, se rompieron las células mediante congelación-descongelación y se extrajeron con FREON® (1,1,2-tricloro-1,1,2-trifluoro-etano) tres veces. Se purificaron luego las partículas virales con un gradiente de CsCl y ultracentrifugación. Sin embargo, este protocolo resultaba demasiado tedioso y largo para la producción del virus a gran escala.

40 Por tanto, desarrollamos un método simplificado para extraer el reovirus. Se descubrió que incubando el cultivo de células HEK 293 con un detergente durante un corto periodo de tiempo, se liberaban altos niveles de reovirus infeccioso hacia el extracto. Los virus pueden separarse luego de los residuos celulares con un sencillo método de separación basado en las diferencias de tamaño o de densidad, tal como filtración, diafiltración o exclusión por tamaño, y puede utilizarse el virus resultante para la terapia con reovirus. El reovirus producido de acuerdo con la presente invención es adecuado para su administración en humanos, y este protocolo es consistente con la recomendación de la FDA para romper células en presencia de un detergente.

50 Ensayamos cuatro detergentes en un experimento preliminar, los detergentes no iónicos octoxinol-9 o 10 (Triton® X-100), octilfenoxi polietoxi etanol (NONIDET^{MR} P-40 o NP-40), y monolaurato de polietilén glicol sorbitán (TWEEN® 20), así como el detergente iónico desoxicolato de sodio. Los cuatro detergentes fueron capaces de lisar las células y de liberar las partículas virales infecciosas por encima del nivel de fondo, y el Triton® X-100 fue el más eficaz. Se contempla que otros detergentes, en particular aquellos comúnmente utilizados para romper células, puedan ser
55 utilizados también en la presente invención. Los ejemplos de estos otros detergentes incluye los otros detergentes

Triton®, los otros detergentes Tween® (por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán Tween® 80), dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de litio, y cloruro de dodecil trimetilamonio.

5 Los resultados también indican que la extracción con detergentes puede ser más eficaz que la congelación-descongelación, el procedimiento estándar para la extracción de virus. Además, se ha reportado que para extraer reovirus aviares de células Vero, en las que el reovirus está fuertemente asociado a las células, el agua desionizada destilada resulta ser más eficaz que la congelación-descongelación, la extracción con FREON® (1,1,2-tricloro-1,1,2-trifluoro-etano) o el tratamiento con tripsina (Drastini y colaboradores, 1992). La presente invención proporciona un enfoque más rápido y conveniente aún eficaz, ya que no es necesario sedimentar y después resuspender las células como se requiere por el método del agua destilada.

10 Se contempla que pueden utilizarse altas concentraciones de sal, tal como cloruro de guanidina, en la presente invención para sustituir a los detergentes. Sin embargo, es preferible utilizar detergentes en lugar de altas concentraciones de sal.

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método rápido y sencillo para extraer virus de un cultivo celular. El detergente puede añadirse directamente a un cultivo en suspensión o al medio de las células adherentes. En cualquier caso, no es necesario remover primero el medio. Además, no son necesarios otros medios para romper las células o para extraer los virus, tales como congelación-descongelación o sonicación.

20 Una característica importante de la presente invención es que el procedimiento de extracción puede realizarse a temperatura ambiente o por encima de ésta. De modo tradicional, la extracción y purificación de virus se realiza a baja temperatura, típicamente a 0-4°C, para preservar las estructuras y las funciones de las proteínas. Por la misma razón, también se incluyen habitualmente inhibidores de proteasa en las soluciones de extracción. Por tanto, resulta sorprendente que el presente protocolo pueda realizarse a una temperatura mayor sin ningún inhibidor de proteasa. De hecho, una temperatura tan elevada como 37°C produjo aproximadamente la misma cantidad de virus infecciosos que temperaturas de 25°C. Por consiguiente, la extracción de virus puede realizarse añadiendo un detergente directamente al cultivo celular y continuando la agitación del cultivo con el fin de liberar los virus, sin tener que cambiar la temperatura. Alternativamente, puesto que no es necesario mantener una temperatura constante para la extracción de virus de acuerdo con la presente invención, el procedimiento puede realizarse a temperatura ambiente incluso aunque la temperatura ambiente pueda variar de un lugar a otro o pueda variar con el tiempo en el mismo lugar.

30 Después de la extracción, se puede purificar el virus con base, por ejemplo, en las diferencias de tamaño o de densidad entre los virus y los otros constituyentes en el extracto. En particular, se puede emplear filtración o centrifugación para eliminar los residuos celulares del virus. Para optimizar las condiciones de filtración, se analizó el efecto de diversos filtros en presencia de varios detergentes de extracción diferentes (Ejemplo 1). Un protocolo de filtración por etapas demostró ser el más efectivo. Por tanto, se utiliza primero un prefiltro que tiene un tamaño de poro relativamente grande (por ejemplo, 5 µm u 8 µm) para retirar las piezas grandes de la mezcla de extracción, seguido por filtros con tamaños de poro menores, tal como una combinación de unidades de filtros que contienen un filtro de 3 µm y un filtro de 0,8 µm. En ausencia de prefiltros, la mezcla de extracción obstruiría el filtro rápidamente gastando, con ello, material y tiempo. En otra realización, después de la etapa de prefiltración de 5 µm y 8 µm, se puede utilizar un filtro que tiene un solo tamaño de poro de 8 µm.

40 Con base en el volumen recogido después de la filtración, como se muestra en el Ejemplo 1, es preferible utilizar Triton® X-100 al 1% para la extracción del virus. Además, los filtros de membrana de acetato de celulosa son mejores que los filtros de membrana de fibra de vidrio, porque el filtro de membrana de acetato de celulosa permite filtrar un volumen mayor de mezcla de extracción, haciendo que sea más adecuado para una producción a gran escala.

45 Dependiendo del propósito de la producción de virus, puede resultar deseable concentrar el filtrado que contiene el virus. En el ejemplo 2 se muestra una etapa de concentración que utiliza ultrafiltración/diafiltración. En el Ejemplo 2, se ensayaron dos sistemas de ultrafiltración/diafiltración, el casete de placa y marco de Pall Filtron, y el cartucho de fibras huecas de A/G Technology. Los resultados demuestran que los dos sistemas son comparables en su velocidad de operación o en su grado de pérdida de volumen, pero el cartucho de fibras huecas es más fácil de manipular. En el Ejemplo 4, los resultados muestran que un cartucho de fibras huecas que tiene un corte molecular de 300 KDa proporciona buen material para purificación posterior.

50 El virus se puede purificar adicionalmente con base en su carga superficial. Puesto que diferentes virus tienen diferentes proteínas en la superficie, que determinan su carga superficial a cualquier pH dado, las condiciones apropiadas para la purificación deben decidirse para cada virus. El Ejemplo 3 ilustra una determinación de las condiciones óptimas de intercambio iónico para el reovirus. Por lo tanto, se utilizaron columnas de intercambio iónico que contenían diferentes resinas a diferente pH para purificar una preparación de reovirus que había sido extraída, filtrada y concentrada como se describió anteriormente. Los resultados indican que una columna aniónica débil que contenía Sefarosa^{MR} ANX a pH 7,0-8,5 era la más eficaz. El pH es más preferiblemente de aproximadamente 7,5 u

8,0, y es lo más preferiblemente de aproximadamente 8,0.

5 El virus puede ser también purificado con base en las diferencias de tamaño, por ejemplo, con cromatografía de exclusión por tamaño. Para los reovirus, una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión por tamaño es particularmente eficaz. Preferiblemente, se usa una columna de intercambio aniónico antes e la cromatografía de exclusión por tamaño. También es necesario evitar las sales de magnesio en los reguladores de enlazamiento/elución. El uso de reguladores de fosfato en vez de reguladores con base en Tris mejoró el enlazamiento y la selectividad. También pueden utilizarse otros métodos cromatográficos, tales como aquellos basados en afinidad o interacción hidrófoba, cuando resulte apropiado. Por tanto, puede adoptarse una cromatografía en columna como alternativa eficaz a una ultracentrifugación en gradiente de densidad de CsCl para lograr un buen rendimiento, pureza y capacidad de escalamiento.

10 El presente método puede aplicarse a la producción de reovirus utilizando células distintas de las células HEK 293, incluyendo, pero sin limitarse a células L929 de ratón, células Vero y células de ovario de hámster chino. Se contempla que el presente método pueda aplicarse también a otros virus, en particular otros virus sin envoltura. Las condiciones apropiadas para la purificación de otros virus pueden ser determinadas por una persona ordinariamente capacitada en la materia con base en la presente divulgación. Los virus que pueden prepararse usando el presente método incluyen, pero no se limitan a, los virus de las familias Myoviridae, Siphoviridae, Podpviridae, Tecoviridae, Corticoviridae, Plasmaviridae, Lipothrixviridae, Fuselloviridae, Poxviridae, Iridoviridae, Phycodnaviridae, Baculoviridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Polydnviridae, Inoviridae, Microviridae, Geminiviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Hepadnaviridae, Retroviridae, Cictoviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Leviviridae, Picornaviridae, Sequiviridae, Comoviridae, Potyviridae, Caliciviridae, Astroviridae, Nodaviridae, Tetraviridae, Tombusviridae, Coronaviridae, Glaviviridae, Togaviridae y Barnaviridae.

Composiciones

25 También se describen composiciones que comprenden el virus preparado de acuerdo con los métodos de la presente invención. Estas composiciones pueden utilizarse para el aislamiento y la caracterización de proteínas virales, la producción de vacunas o, cuando la composición contiene virus infecciosos, tales como reservorios de virus, o en administración clínica.

30 Para el propósito de administración clínica, la composición se mezcla usualmente con un excipiente, se diluye con un excipiente, o se coloca en un vehículo que puede estar en forma de una cápsula, un sobrecito, un papel u otro recipiente (documento WO99/08692A1) como una composición farmacéutica. Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable actúa como diluyente puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobrecitos, tabletas, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles.

40 Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, solución salina estéril, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes, tales como metilhidroxibenzoatos y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes saborizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de su administración a un paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

45 La ruta mediante la cual se administra el reovirus, así como la formulación, el portador o el vehículo, dependerán del emplazamiento así como del tipo de células objetivo. Pueden emplearse una amplia variedad de rutas de administración. Por ejemplo, para un neoplasma sólido que sea accesible, el reovirus puede administrarse mediante inyección directamente al neoplasma. Para un neoplasma hematopoyético, por ejemplo, el reovirus puede administrarse por vía intravenosa o intravascular. Para los neoplasmas que no sean fácilmente accesibles dentro del cuerpo, tal como metástasis, el reovirus se administra de tal manera que pueda transportarse sistémicamente a través del cuerpo del mamífero y, de ese modo, alcanzar el neoplasma (por ejemplo, por vía intravenosa o intramuscular). Alternativamente, el reovirus puede administrarse directamente a un solo neoplasma sólido, desde donde se transporta sistémicamente a través del cuerpo hasta la metástasis. El reovirus también puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal (por ejemplo, para un tumor cerebral), en forma tópica (por ejemplo, para un melanoma), en forma oral (por ejemplo, para un neoplasma oral o esofágico), en forma rectal (por ejemplo, para un neoplasma colorrectal), en forma vaginal (por ejemplo, para un neoplasma cervical o vaginal), en forma nasal o mediante un atomizador para inhalación (por ejemplo, para un neoplasma pulmonar). Preferiblemente, el reovirus se administra mediante inyección.

5 Las formas líquidas en que las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención pueden incorporarse para administración oral o mediante inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes saborizados de forma adecuada, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones saborizadas con aceites comestibles, tal como aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

10 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, se mezcla el ingrediente activo principal /reovirus con un excipiente farmacéutico para formar una composición de una formulación previa sólida que contenga una mezcla homogénea de un compuesto producido por la presente invención. Cuando se dice que estas composiciones de formulación previa son homogéneas, significa que el ingrediente activo está disperso de manera uniforme a través de la composición, de manera que la composición puede subdividirse con facilidad en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

15 Los comprimidos o las píldoras pueden estar recubiertos o pueden estar compuestos de otra forma para proporcionar una forma de dosificación que presente la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender un componente de dosificación interna y un componente de dosificación externa, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir a la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto hacia el duodeno o pueda liberarse en forma retardada. Pueden utilizarse una variedad de materiales para estas capas entéricas o recubrimientos, incluyendo estos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

20

25 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe en la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía respiratoria nasal u oral para un efecto local o sistémico. Las composiciones preferiblemente en disolventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse para uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede unirse a una mascarilla o a una máquina respiradora de presión positiva intermitente. Las composiciones en disolución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que administren la formulación de una manera apropiada.

30 Otra formulación preferida emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Estos parches transdérmicos pueden utilizarse para proporcionar una infusión continua o discontinua del reovirus producido por la presente invención en cantidades controladas. La construcción y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.032.525. Estos parches pueden construirse para la administración continua, pulsátil o para suministro por demanda de agentes farmacéuticos.

35

Otras formulaciones adecuadas para uso en la presente invención pueden encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar esta invención y no deben considerarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

40 Ejemplos

En los ejemplos a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen el significado aceptado en forma general.

CIP	= limpieza en el lugar
CV	= volumen de columna
45 CI	= intervalo de confianza
°C	= grados Celsius
DF	= diafiltración
DTT	= ditiotreitól

	FBS	= suero bovino fetal
	g/L	= gramos por litro
	h	= hora
	β-ME	= β-mercaptoetanol
5	μg	= microgramo
	μl	= microlitro
	μM	= micromolar
	mAU	= unidades de miliabsorbancia
	mg	= miligramo
10	ml	= mililitro
	mM	= milimolar
	M	= molar
	MOI o m.o.i.	= multiplicidad de infección
	NP-40	= NONIDET ^{MR} P-40 (Octilfenoxi Polietoxi Etanol)
15	PBS	= disolución salina tamponada con fosfato
	PFU	= unidades formadoras de placa
	rpm	= revoluciones por minuto
	SEC	= cromatografía de exclusión por tamaño
	SDS	= dodecilsulfato de sodio
20	TCID ₅₀	= dosis infecciosa para el 50% del cultivo de tejido
	UF	= ultrafiltración

Materiales y métodos generales (a menos que se especifique otra cosa)

Células y virus

25 Las células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) y las células L-929 de fibroblastos de ratón fueron suministradas por el fabricante BioReliance Corporation (Rockville, Md.). Las células HEK 293 se cultivaron en un medio de cultivo que contenía 10% de suero de caballo inactivado por calor y 90% de la siguiente mezcla: medio esencial mínimo de Eagle con L-glutamina 2 mM y solución salina equilibrada de Earle ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y piruvato de sodio 1,0 mM. Las células de ratón L-929 se propagaron en un medio de cultivo que contenía 10% de FBS y 90% de la siguiente mezcla: medio esencial mínimo de Eagle con L-glutamina 2 mM y solución salina equilibrada de Earle ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y piruvato de sodio 1,0 mM.

30 Las células 293/SF se cultivaron en medio libre de suero 293 (Life Technologies, Rockville, Md.) complementado con L-glutamina 4 mM a 36°C ± 2°C, 6% ± 2% de CO₂, y 80% ± 5% de humedad relativa en matraces de agitación a una velocidad del impulsor de 35-40 rpm.

35 La cepa Dearing del serotipo 3 del reovirus utilizada en estos estudios se propagó primero en cultivos en suspensión de células L-292 purificadas de acuerdo con Smith (Smith y colaboradores, 1969) con la excepción de que se omitió el β-mercaptoetanol (β-ME) del regulador de extracción. La proporción de partículas/PFU para el reovirus purificado

era típicamente de 100/1. Se determinaron los títulos virales mediante valoración en placas de células L-929 y se expresaron como \log_{10} TICD₅₀/ml. Se produjo luego el virus a gran escala en células 293/SF.

Infección de células en suspensión

- 5 Las células 293/SF se cultivaron hasta 10^6 /ml y se infectaron con el reovirus. Se dejó que el cultivo creciera hasta que el color del medio cambió de rojo a naranja, o hasta que la viabilidad de las células cayó hasta el nivel deseado, como se evidencia por un recuento de células viables. Los recuentos de células viables pueden realizarse bajo el microscopio para las células que no muestran un efecto citopático, que se indica porque las células se hinchan y toman un aspecto granulado y las agrupaciones celulares se rompen. Los recuentos de células viables también pueden realizarse mediante una tinción viable tal como se utiliza habitualmente en la técnica.
- 10 Cuando se alcanzó el nivel deseado de viabilidad celular, se sedimentaron las células en una centrífuga y se resuspendieron en Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM y 0,1% de Triton® X-100. Luego se lisaron las células mediante congelación-descongelación y se mantuvieron en hielo durante 20-40 minutos con agitación periódica tipo vórtice para mezclar y lisar las células. Se extrajo la suspensión con un volumen igual de FREON® previamente enfriado (1,1,2-tricloro-1,1,2-trifluoro-etano) mediante agitación tipo vórtice durante 10 minutos, seguido por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C para separar las diferentes fases. Se retiró la fase acuosa (superior) y se extrajo nuevamente dos veces como se describió anteriormente, y se sedimentó el virus por ultracentrifugación a 25.000 rpm durante una hora a 4°C.
- 15

Método tradicional de extracción y purificación de virus

- 20 Se resuspendió el sedimento en PBS y se purificó el virus mediante un gradiente por etapas de cloruro de cesio. El gradiente contenía dos capas de soluciones de CsCl (1:20 g/ml y 1,4 g/ml, respectivamente) preparado en Tris 10 mM (pH 7,4). Se cargó la suspensión del virus en la parte superior del gradiente y se centrifugó en un rotor SW 28.1 a 26.000 rpm durante 2 horas a 4°C. Se recolectó la banda viral (la inferior de las dos bandas porque la banda superior contiene cápsidas vacías) y se dializó frente a PBS estéril.

Tratamiento con la endonucleasa BENZONASA®

- 25 Después de lisar las células con un detergente, se añadió una solución de MgCl₂ 50 mM al lisado crudo hasta una concentración final de MgCl₂ 1 mM. Luego se añadió BENZONASA® (250.000 unidades/ml, EM Industries, catálogo No. 1016979M) hasta aproximadamente 10 unidades/ml. Se agitó el lisado en una incubadora a 36°C durante una hora.

Ejemplo 1

- 30 Clarificación: eliminación de los residuos celulares

El propósito de este ejemplo era desarrollar un procedimiento de clarificación adecuado que sea tanto compatible con el protocolo que utiliza detergentes para lisar células como susceptible al escalado futuro y a la fabricación. En este ejemplo, se filtró el lisado ya sea a través de un filtro de cápsula de 3 μ m/0,8 μ m, o se lo hizo pasar a través de una combinación de un prefiltro (5 μ m u 8 μ m) y después a través de un filtro de cápsula de 3 μ m/0,8 μ m. Todos los filtros utilizados en este estudio tenían un área superficial de 0,015 pies². Con base en el volumen filtrado a través de la membrana de 0,015 pies², se determinó la capacidad de las membranas para una filtración a gran escala. También se comparó la eficacia de la filtración para dos materiales de membrana diferentes, membrana de acetato de celulosa y membrana de fibra de vidrio, para el filtro de cápsula de 3 μ m/0,8 μ m.

35

40 Se ensayaron tres detergentes. Se dividieron las células que portaban el reovirus en partes iguales en tres botellas estériles de 1 L rotuladas con los tres diferentes agentes de lisis que se van a ensayar: Triton® X-100 al 1%, Triton® X-100 al 0,3%, y Na-DOC al 0,1%. Se añadió un volumen de 92 mL y 82 mL de Triton® X-100 al 10% a las botellas 1 y 2, de forma que las concentraciones de trabajo en estas botellas fueron de Triton® X-100 al 1% y al 0,3%, respectivamente. Se añadió un volumen de 9,2 ml de Na-DOC al 10% a la tercera botella hasta una concentración de trabajo de 0,1%. Las tres botellas se colocaron en una placa de agitación y se agitaron a 160 ± 20 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomó una muestra posterior a la lisis para cada condición de lisis para el análisis del título.

45

Se añadieron aproximadamente 20 mL de MgCl₂ 50 mM al lisado crudo en cada una de las botellas hasta una concentración de trabajo de aproximadamente MgCl₂ 1 mM. Esto fue seguido por la adición de 40 μ l de endonucleasa BENZONASA® (250.000 unidades/mL) hasta una concentración de trabajo de aproximadamente 10 unidades/mL. Se agitó el lisado crudo en la posición 5 en una incubadora a 36°C durante una hora. Se incluyeron estas etapas para eliminar el ADN de la célula huésped y para reducir la viscosidad del lisado para facilitar así el procesamiento posterior.

50

Se calibró una bomba Watson-Marlow (505U) para relacionar el caudal con la velocidad de la bomba. Según las sugerencias del vendedor, se empleó una velocidad de bomba de 5 rpm (caudal de 40 mL/min) a través del estudio de clarificación.

Se pasó el lisado procedente de cada condición de tratamiento a través de uno de los siguientes filtros:

- 5 1) un filtro de cápsula de 3 $\mu\text{m}/0,8 \mu\text{m}$;
- 2) un prefiltro con un tamaño de 5 μm \rightarrow un filtro de cápsula de 3 $\mu\text{m}/0,8 \mu\text{m}$ conectados en serie; y
- 3) un prefiltro con un tamaño de poro de la membrana de 8 μm \rightarrow un filtro de cápsula de 3 $\mu\text{m}/0,8 \mu\text{m}$ conectados en serie.

10 Los filtros de cápsula de 3 $\mu\text{m}/0,8 \mu\text{m}$ tienen una construcción de membrana heterogénea de doble capa que permite una alta capacidad de carga de suciedad y un mayor rendimiento. El primer filtro tiene un tamaño de poro mayor (3 μm) que el segundo filtro (0,8 μm). Los prefiltros combinan múltiples capas de material filtrante profundo de polipropileno no tejido trenzado progresivamente en forma más fina. Todos los filtros utilizados en este estudio tenían un área superficial de 0,01 pies². Se ensayaron dos materiales de membrana, a saber, de acetato de celulosa y de fibra de vidrio, para los filtros de cápsula de 3 $\mu\text{m}/0,8 \mu\text{m}$.

15 Se determinó la mejor combinación de agente de lisis y de condiciones del filtro con base en los valores del título y en los volúmenes que pasan a través del filtro. Se controló la caída de presión a través de las membranas para determinar cuándo ocurría la obstrucción de las membranas. La indicación de la obstrucción de las membranas era una caída de presión de 25 psi, por encima de la cual se puede romper el filtro. Cuando se utilizó solamente un filtro de cápsula de 3 $\mu\text{m}/0,8 \mu\text{m}$, no pasaron más de 35 mL a través de estos filtros de cápsula antes de que se obstruyera la membrana. Los tamaños de membrana de 3/0,8 μm se obstruyeron en 5 minutos, lo cual sugiere que el uso de un prefiltro fue necesario para eliminar la obstrucción de las membranas por los residuos celulares. El uso de un prefiltro de 5 μm antes del filtro de cápsula de 3/0,8 μm aumentó significativamente la cantidad del filtrado obtenido, mientras que la filtración a través de un prefiltro de 8 μm , seguido por la filtración a través de la cápsula de 3 $\mu\text{m}/0,8 \mu\text{m}$, produjo la mayor capacidad de membrana en términos del volumen que pasa a través de los filtros (se recolectó un promedio de 200 mL por 0,015 pies² del área superficial del filtro). El Triton® X-100 al 1% produjo los mejores resultados comparado con las otras dos condiciones de lisis.

20 Los resultados también demuestran que el material de membrana de acetato de celulosa trabaja mejor que la membrana de fibra de vidrio, con base en el volumen filtrado a través de estas membranas. No se observó una pérdida significativa de infectividad en ninguna etapa de la filtración cuando se compara con la infectividad de la masa del cultivo (el cultivo celular antes de la lisis y la filtración). Con base en los resultados de este estudio, una masa de cultivo de 20 L requeriría de 1,5 pies² de área superficial de la membrana para la filtración.

Ejemplo 2

Concentración

35 Para seleccionar un sistema adecuado para concentrar y diafiltrar el lisado aclarado, se comparó el casete de placa y marco de Pall Filtron (www.pall.com) y el cartucho de fibras huecas de A/G Technology (www.agtech.com). Se empleó el mismo material de membrana de polietersulfona en ambos sistemas. El criterio para la selección fue la facilidad de uso, el grado de concentración logrado y el título de virus del producto.

40 El casete de placa y marco utilizado en este estudio fue el sistema MINIM de Pall, que es una unidad de mesa de laboratorio, y el LV Centramate, que contiene dos membranas de ultrafiltración de 300 kD de canal de criba suspendido (0,2 pies² cada una). Antes de concentrar el lisado aclarado, se enjuagó el aparato con 2 L de agua de ósmosis inversa (RO) (grado USP) para eliminar el gel de almacenamiento. Los casetes se desinfectaron con 2 L de NaOH 0,1 N calentado. Se drenó luego el sistema, se enjuagó con 2 L de agua RO y se acondicionó con el medio de cultivo para el virus. Se drenó el sistema completo y se determinó que el volumen retenido del sistema y de los tubos era de 6 mL.

45 El cartucho de fibras huecas ensayado en este estudio fue un sistema de mesa QUIXSTAND^{MR} de A/G Technology, con un cartucho de ultrafiltración de columna de tamaño 4 M (área superficial de 650 cm²). Al igual que con el casete de placa y marco, primero se lavó el aparato con 2 L de agua de ósmosis inversa (RO) (grado USP) para enjuagar el gel de almacenamiento. Los casetes se desinfectaron con 2 L de NaOH 0,1 N calentado. Se drenó luego el sistema, se enjuagó con 2 L de agua RO y se acondicionó mediante enjuague con el medio de cultivo para el virus. Se utilizó un caudal de alimentación constante de 600 mL/min a lo largo de todo el experimento.

50

5 Para ambos sistemas, se recirculó el lisado aclarado hasta que se concentró el material hasta aproximadamente 250 mL (concentración 10 veces), y se tomó una muestra para el análisis del título (concentración post-l). Se diafiltró el concentrado (retenido) contra 1 L (5 volúmenes de diafiltración) de regulador de diafiltración (Tris 20 mM + NaCl 0,2 M + MgCl₂ 1 mM, pH 8,0 ± 0,1) y se tomó otra muestra para el análisis del título (posterior a la diafiltración). Se concentró el retenido aún más hasta aproximadamente 120 mL. Después de la concentración final, se drenó el producto del sistema y se recogió en un único recipiente estéril (concentración posterior al final). Se enjuagó luego el sistema con 40 mL de regulador de diafiltración para asegurar la máxima recuperación del producto.

Los parámetros del proceso controlados durante el proceso de concentración tanto con el sistema de fibras huecas como con el sistema de placa y marco se muestran en la Tabla 1.

10 Tabla 1

<i>Comparación de los parámetros del proceso para el sistema de fibras huecas y para el sistema de placa y marco</i>									
Sistema	Tiempo de proceso (h)	Área superficial (cm ²)	Factor de concentración	Tasa promedio de flujo de alimentación (mL/min)		Tasa de flujo de filtración ml/min		TMP (psi)	
				inicial	final	inicial	final	inicial	final
				Fibra hueca	3	650	14X	600	600
Placa y marco	4	372	20X	260	450	54	12	9,2	30

TMP = [(Presión Alimentada + Presión Retenida) / 2 - Presión Permeada]

La presión transmembrana (TMP) se mantuvo por debajo de 8 psi a todo lo largo del proceso de fibras huecas, mientras que la TMP aumentó hasta 30 psi con el proceso de placa y marco. El uso de una mayor área superficial de membrana para el sistema de fibras huecas probablemente resultó en una menor obstrucción del cartucho.

15 Se logró una concentración de aproximadamente 20 veces con el casete de placa y marco en 4 horas, mientras que se obtuvo una concentración de 14 veces utilizando el cartucho de fibras huecas en 3 horas, y se podría haber obtenido una concentración de 20 veces en otros 30 minutos. Se produjo una pérdida de producto del 45-50% cuando se comparó con los valores de posteriores a la lisis en los dos sistemas. El montaje del cartucho de fibras huecas fue más sencillo que el del casete de placa y marco. Por lo tanto, el cartucho de fibras huecas es un sistema más adecuado para las etapas de ultrafiltración y de diafiltración con base en la facilidad de manipulación.

20

Ejemplo 3

Intercambio iónico

25 Los virus tienen diferentes cargas en su superficie debido a las diferentes moléculas presentes en su superficie. Por tanto, es posible purificar virus utilizando cromatografía de intercambio iónico, y las condiciones variarán dependiendo de la naturaleza del virus. Por lo tanto, se analizaron las condiciones de cromatografía de intercambio iónico a diversos pH para purificación del reovirus. Se produjo, extrajo y filtró el reovirus como se describió anteriormente y se lo sometió a cromatografía de intercambio iónico a diferentes pH. Se determinó el título después de cada etapa y se expone a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

<i>Efectos de la cromatografía de intercambio iónico a diversos pH</i>			
Muestra	Título \pm 95% de CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ / mL)	Corrección de volumen ²	Título corregido \pm 95% de CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ / mL)
Adición conocida de virus de control, 10/30/01	8,05 \pm 0,47	-	-
Título certificado de RE3013101P	8,35 \pm 0,27	-	-
Control negativo	No se detectó virus	-	-
ONC 101, recolección a granel	**	-	-
ONC 102, después de la filtración	9,18 \pm 0,36	-	9,18 \pm 0,36
ONC 103, después de pasar por columna, catión fuerte pH 4,0	5,93 \pm 0,24	1,02	5,94 \pm 0,24
ONC 104, después de pasar por columna, catión fuerte pH 5,0	8,93 \pm 0,42	1,01	8,93 \pm 0,42
ONC 105, después de pasar por columna, catión fuerte pH 6,0	9,18 \pm 0,40	-	9,18 \pm 0,40
ONC 106, después de pasar por columna, catión fuerte pH 7,0	9,30 \pm 0,37	-	9,30 \pm 0,37
ONC 107, después de pasar por columna, catión fuerte pH 8,0	9,55 \pm 0,32	-	9,55 \pm 0,32
ONC 108, después de pasar por columna, catión débil pH 4,0	8,93 \pm 0,40	1,01	8,93 \pm 0,40
ONC 109, después de pasar por columna, catión débil pH 5,0	9,18 \pm 0,36	1,01	9,18 \pm 0,36
ONC 110, después de pasar por columna, catión débil pH 6,0	8,68 \pm 0,40	-	8,68 \pm 0,40
ONC 111, después de pasar por columna, catión débil pH 7,0	9,30 \pm 0,37	-	9,30 \pm 0,37
ONC 112, después de pasar por columna, catión débil pH 8,0	8,18 \pm 0,36	1,02	8,19 \pm 0,36
ONC 113, después de pasar por columna, anión fuerte pH 5,0	5,30 \pm 0,37	1,01	5,30 \pm 0,37
ONC 114, después de pasar por columna, anión fuerte pH 6,0	4,80 \pm 0,00	-	4,80 \pm 0,00
ONC 115, después de pasar por columna, anión fuerte pH 7,0	7,80 \pm 0,35	-	7,80 \pm 0,35
ONC 116, después de pasar por columna, anión fuerte pH 8,0	10,18 \pm 0,36	1,01	10,18 \pm 0,36

<i>Efectos de la cromatografía de intercambio iónico a diversos pH</i>			
Muestra	Título \pm 95% de CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ / mL)	Corrección de volumen ²	Título corregido \pm 95% de CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ / mL)
ONC 117, después de pasar por columna, anión fuerte pH 9,0	8,55 \pm 0,32	-	8,55 \pm 0,32
ONC 118, después de pasar por columna, anión débil pH 5,0	7,93 \pm 0,40	-	7,93 \pm 0,40
ONC 119, después de pasar por columna, anión débil pH 6,0	6,68 \pm 0,40	-	6,68 \pm 0,40
ONC 120, después de pasar por columna, anión débil pH 7,0	8,30 \pm 0,37	1,02	8,31 \pm 0,37
ONC 121, después de pasar por columna, anión débil pH 8,0	10,53 \pm 0,36	1,03	10,54 \pm 0,36
ONC 122, después de pasar por columna, anión débil pH 9,0	8,93 \pm 0,24	1,03	8,94 \pm 0,24

Por consiguiente, un pH de 7,0-9,0 produjo un mayor rendimiento de reovirus que otros pH. El pH utilizado en esta etapa es preferiblemente de 7,5-8,5, en particular pH 8,0. Aunque tanto los intercambiadores catiónicos como aniónicos funcionaron, los intercambiadores aniónicos fueron en general más eficaces.

5 Ejemplo 4

Protocolo de purificación escalable

El reovirus es un enterovirus que infecta específicamente células con una ruta de ras activada. Como la activación de la ruta de ras es un denominador común en una amplia variedad de tipos de cáncer, se ha demostrado que el serotipo 3 de reovirus causa regresión en una variedad de tumores en una línea celular, modelos animales, así como en la clínica. Para satisfacer las demandas de la producción de virus infeccioso a gran escala para los ensayos en fase clínica II/III, se desarrolló un enfoque basado en filtración y cromatografía. Aquí se reporta el desarrollo de un proceso completamente escalable para la purificación de virus activo a partir de un cultivo celular. El proceso en tres etapas consiste en una etapa de ultrafiltración, una purificación por intercambio aniónico y una separación por grupos en el regulador de la formulación. El proceso fue escalado hasta una escala de un biorreactor de 20 litros y transferido para producción en una instalación de BPM. La recuperación total del proceso es > 50% y la pureza final iguala al material producido por dos etapas secuenciales de centrifugación con cloruro de cesio.

Materiales y métodos

Cromatografía: Todos los experimentos de purificación se llevaron a cabo en un sistema Äkta Explorer 100 y las fracciones se recolectaron a través de un colector de fracciones Frac 950. Se controlaron rutinariamente UV a 280, 260 y 215 nm, así como la conductividad y el pH. Todos los medios de cromatografía e instrumentación se obtuvieron a través de GE Healthcare, Biosciences.

SDS PAGE: Todos los materiales de SDS PAGE se obtuvieron a través de Invitrogen. Se utilizaron geles de SDS PAGE al 4-12% y se corrieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65°C antes de la electroforesis.

Se utilizó un marcador del espectro completo como estándar de dimensionamiento (GE Healthcare, Biosciences).

Coloración de SDS PAGE: Se obtuvieron los reactivos de coloración con plata de GE Healthcare Biosciences. La coloración de Coomassie se obtuvo a través de Invitrogen. Las instrucciones del fabricante fueron seguidas para cada uno de los reactivos de coloración. La etapa de desarrollo de color plata se llevó a cabo durante 8 minutos para colorear en exceso el gel para asegurar que los contaminantes restantes pudieran ser observados con claridad.

5
10
Transferencia tipo Western: se corrieron geles de SDS PAGE por duplicado de modo que uno de los geles pudiera ser transferido a Nitrocelulosa ECL. Con la excepción del regulador de transferencia (Invitrogen) se obtuvieron todos los aparatos y reactivos de transferencia a través de GE Healthcare Biosciences. Se transfirieron los geles durante 40 minutos a 45 V en metanol al 20%. Se comprobó la integridad de la transferencia mediante la transferencia del marcador coloreado. Las membranas fueron bloqueadas en leche desgrasada (tienda de comestibles local) durante la noche y se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra diluido 1:20.000 en leche desgrasada Tween al 0,2%. Se enjuagaron las transferencias 3 veces durante 5 minutos con un exceso de PBS-Tween al 0,2% y después se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-cabra-HRP (Sigma) en proporción 1:100.000. Se enjuagaron las transferencias como se describió anteriormente y luego se desarrolló con el reactivo de detección ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se expusieron luego las transferencias a una película Kodak BioMax Light durante 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos, etc. y se desarrolló la película manualmente con el desarrollador GBX y se fijó (Kodak) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15
Aislamiento de ARN: Se prepararon las muestras para RT-PCR mediante extracción del ARN a partir de una muestra de 0,5 ml de cada fracción con RNAWizard (Ambion). Se siguió el protocolo del fabricante y se resuspendieron los sedimentos de ARN en agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 0,1 ml. Se utilizaron 1 ml de cada muestra, así como una dilución 1:10 para la amplificación por RT-PCR.

20
Electroforesis en gel de agarosa de muestras de PCR: Las reacciones de PCR se analizaron en un gel de EZ al 4% (Invitrogen) mediante la adición de 20 ml de un colorante de carga 6x que contiene VistaGreen (GE Healthcare, Biosciences) a una dilución 1:10.000 y glicerol al 50%. Se aplicaron 20 ml se aplicaron por pozo y se usó una escala de 50 pb (GE Healthcare, Biosciences) como estándar de dimensionamiento.

Detección de bandas de PCR: Se escanearon todos los geles en un escáner Typhoon 9600 fijando el bromuro de etidio en 650, fijando PMT y fijando la sensibilidad normal a una resolución de 50 micras.

Sefarosa, ÄKTAexplorer, Unicorn, HR, ImageQuant, Vista Green y Typhoon son marcas comerciales de GE Healthcare. GE Healthcare es una marca comercial de General Electric.

25
E-gel y geles Novex son marcas registradas de Invitrogen Corp. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está protegida por patentes propiedad de Roche Molecular Systems y F. Hoffman-La Roche Ltd.

Desarrollo de procesos: Descripción del material de partida

30
35
El reovirus es un virus de ARN bicatenario sin envoltura con una simetría icosaédrica y una composición conocida de proteína. Tiene un diámetro de ~85 nm y un peso molecular de ~126 millones de Dalton. La cápside externa que determinará el comportamiento de unión del virus a matrices de cromatografía consta de 600 copias de la proteína de la cápside externa principal $\lambda 1$ con un peso molecular de 76,3 kDa, 600 copias de la proteína de la cápside externa principal $\sigma 3$ donde los bloques de construcción de la cápside externa están en realidad compuestos por heterohexámeros de $\mu\sigma 3$. Además se encuentran también 36 copias de la proteína de la cápside externa menor $\sigma 1$ en la superficie del virus como homotrímeros. $\sigma 1$ media la unión viral a la superficie celular. Las tres proteínas de la cápside externa $\sigma 3$, $\sigma 1$ y μ tienen puntos isoeléctricos de 5,2, 5,2 y 6,6 respectivamente. La cápside interior consta de 120 copias de $\lambda 1$ (dímeros), 60 copias de $\lambda 2$ (como pentámeros) y 24 copias de μ . El núcleo se compone de 12 copias de $\lambda 3$, la ARN polimerasa y 120 copias de $\sigma 2$, la principal proteína del núcleo. Todas las proteínas λ tienen pesos moleculares de aproximadamente 120 kDa, μ de aproximadamente 80 kDa y σ de aproximadamente 47-48 kDa.

40
45
50
Todo el material utilizado para el desarrollo del proceso se generó como sigue. Se inoculó un biorreactor de 20 litros con una línea celular derivada de HEK 293 en medio libre de suero que contiene glutamina 4 mM y rojo fenol. Las células se desarrollaron durante 2-3 días y se infectaron hasta un recuento celular de 1×10^6 células/ml con una MOI de 0,5. Se dejó proceder la producción del virus durante otros 2-3 días. Se lisaron las células mediante la adición de 10% de Triton X-100 hasta una concentración final de 1% a 37°C durante 30 minutos a 120 rpm. La concentración de la muestra del lisado crudo se ajustó con cloruro de magnesio 1 mM y se digirió con benzonasa a razón de 10 U/ml durante 1 hora a 37°C y 120 rpm. A continuación, se filtró el material a través de un filtro de 8 micras seguido por un filtro de 0,8 micras. Se concentró adicionalmente el material y se intercambió el regulador en un cartucho de fibra hueca GE Healthcare con un corte de peso molecular de 300 kDa y un área total de 4.800 cm². Se intercambió el material contra 5 volúmenes de regulador Tris 20 mM pH 7,8, cloruro de sodio 25 mM. Después de la diafiltración, se añadió glicerol hasta una concentración final del 10%.

Parámetros para determinar un rango de trabajo aceptable para la purificación de reovirus

Una ventana de estabilidad para la purificación de reovirus tipo 3 Dearing se indica mediante las siguientes referencias (Floyd y colaboradores, 1977; Floyd y colaboradores, 1978, p. 1079-1083 y 1084-1094; Floyd y colaboradores, 1979; Drayna y colaboradores, 1982). Con base en el literatura se asumieron las condiciones de

5 cromatografía sobre un rango de pH de 5,0-8,0 y concentraciones de sal cloruro de sodio 0-2 M serían un buen intervalo de partida. La agregación y las condiciones que podrían inducir potencialmente la agregación también fueron factores que se debieron considerar. Con base en los datos de la literatura (*id.*), se asumió que una ventana de pH de pH 5,0-8,0 y concentraciones de sal cloruro de sodio 0,025-2 M serían aceptables. También se añadió glicerol a todos los reguladores para evitar la agregación. No se analizó si la omisión de glicerol tendría un efecto perjudicial sobre la estabilidad viral y la infectividad debido a la pérdida de virus por agregación.

10 El punto isoeléctrico (pI) del virión ha sido descrito en la literatura (Floyd y colaboradores, 1978 p. 1084-1079, Taylor y colaboradores, 1981). Una pI aparente de 3,8-3,9 ha sido indicada mediante cromatoenfoco y microelectroforesis de la partícula completa. Las dos proteínas principales de la cubierta más abundantes del reovirus tipo 3 Dearing, sigma 3 y mu 1 tienen un pI mucho menos ácido (véase más arriba). Esto también está más acorde con el comportamiento de adsorción del virus a diferentes intercambiadores iónicos (Zerda y colaboradores, 1981). La discrepancia se explica más probablemente por el hecho de que el cromatoenfoco es en muchos sentidos una técnica bidimensional que mide los dominios cargados en lugar de la carga total en solución, mientras que la microelectroforesis puede producir cierta desviación por la modulación de condiciones del regulador, que también puede afectar el resultado experimental. Se evitó el uso de sales de magnesio en las formulaciones del regulador ya que se había reportado una disminución de la infectividad del virus después de la congelación en presencia de magnesio (Estes y colaboradores, 1979).

Evaluación del medio inicial

20 El intercambio iónico (IEX), la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de afinidad por heparina y la cromatografía de quelación de metales inmovilizados (IMAC) fueron todos evaluados inicialmente. σ_3 , una de las dos principales proteínas de la cápside externa contiene un motivo de dedo de zinc y se consideró por lo tanto IMAC como una técnica de captura potencial para este virus.

25 Para determinar si los viriones se unen completamente al tipo diferente de medio cromatográfico, se separó también el grupo del virus por flujo rápido en Sefarosa 4 para eliminar algunos de los principales contaminantes y para intercambiar el virus por las condiciones más adecuadas del regulador para el enlazamiento. Se evaluaron inicialmente tanto el flujo rápido en Sefarosa 6 como 4 con alturas de lecho de 20 cm y velocidades de flujo lineal de 150 cm/h. Se aplicaron volúmenes de muestra de 5-30% del volumen de columna. Como el límite de exclusión por tamaño de flujo rápido en Sefarosa 6 está en el rango de 2-5 millones de Daltons para las moléculas esféricas y flujo rápido en Sefarosa 4 tiene un límite de exclusión de aproximadamente 20 millones de Daltons, esta última ofrece una mejor resolución y por lo tanto, permitió una aplicación de hasta el 25% del volumen de columna. Por encima de este valor, los picos ya no podían ser resueltos. Esto no podría ser suprimido mediante la adición de sal y/o etilenglicol. Un cromatograma típico de una separación por tamaño del material de partida en una columna de flujo rápido HR5_20 Sefarosa 4 se muestra en la Figura 1.

35 Los medios de intercambio catiónico se probaron en un intervalo de pH de 5,0-6,0. Se usaron grupos de intercambio catiónico tanto débiles (carboximetilo) como fuertes (sulfopropilo) (Figura 2).

Para el virus purificado por exclusión por tamaño, se observó el buen enlazamiento del virus tanto sobre columnas de flujo rápido SP como CM Sefarosa a pH 5,6. Sin embargo, el material de UF/DF no se enlazó en absoluto, incluso a un pH de 5,0. La adición de 2,5% de etilén glicol ayudó a romper los agregados que se habían formado y permitió el enlazamiento del virus, pero disminuyó la infectividad viral.

40 También se analizó Sefarosa con metal de quelación calcio, zinc y magnesio cargado para la unión del virus con material previamente purificado con SEC. Sin embargo, tanto con una aplicación de muestra de 25 como de 50 cm/h, ningún virus se retuvo en la columna. Se evaluó también una columna de flujo rápido de heparina Sefarosa 6 a diferentes concentraciones de sal con el virus purificado previamente, pero nuevamente, no se observó enlazamiento. Se analizaron las fracciones por RT PCR como se describe (Spinner y colaboradores, 2001) y mediante transferencia tipo Western y SDS PAGE.

Aunque todas las columnas de HIC parecían retener el virus en cierta medida, la selectividad era pobre y las pérdidas debidas a precipitación, incluso cuando se utilizó cloruro de sodio como la sal liotrópica, eran altas.

50 Se seleccionaron también diferentes intercambiadores aniónicos por la selectividad y el enlazamiento. DEAE, ANX high sub, Q Sefarosa Fast Flow, XL y de alto rendimiento (HP) fueron evaluados también por el enlazamiento del virus. La selectividad parecía diferir cuando se analizó el material previamente purificado SEC (Figura 3).

El intercambio de aniones parecía ser la elección escalable más robusta para una primera etapa de purificación. Por lo tanto, se evaluaron diferentes intercambiadores de aniones para la purificación de reolisina.

Optimización de la etapa de captura de intercambio aniónico

- 5 Los diferentes intercambiadores aniónicos claramente ofrecen diferente selectividad. Q Sefarosa XL era el más notablemente diferente, generando un pico viral dividido. Ya que el virus no es estable por encima de un pH de 8,0, y el microambiente de intercambiadores aniónicos durante el enlazamiento tal vez hasta una unidad superior a pH 1, se aplicó la muestra a un pH de 7,2 y se mantuvieron todas las etapas posteriores a un pH de 7,0. La muestra se ajustó a un pH de 7,2 con ácido clorhídrico diluido.
- 10 Ya que la selectividad en regulador Tris-Cl parecía pobre, también se evaluó el regulador de fosfato. Se mejoraron tanto el enlazamiento como la selectividad mediante el uso de regulador de fosfato (datos no mostrados). Se compararon también los cinco intercambiadores aniónicos diferentes por la capacidad de enlazamiento. Se observó una ruptura temprana para todas las perlas de 90 micras (ANX high sub, DEAE, Q Fast Flow, y XL) donde el material se rompió después de 1-2 volúmenes de columna. La Q Sefarosa de alto rendimiento permitió la aplicación de más de 12 CV de virus antes de observar la ruptura a una altura del lecho de 5 cm y 50 cm/h de tasa de flujo lineal para un tiempo de residencia 6 minutos (Figura 4).
- 15 Q Sefarosa de alto rendimiento fue elegida por lo tanto, para el desarrollo de un proceso adicional de la primera etapa. La elución del virus de la columna HP de Q Sefarosa con un gradiente lineal de cloruro de sodio 1 M indicó que el virus eluyó a 0,5 M con algunos contaminantes residuales que eluyeron antes en el gradiente y algunos contaminantes adicionales que eluyen tarde en el gradiente.
- 20 Se evaluaron diferentes concentraciones por etapas para el lavado, elución y regeneración. Se encontró que las condiciones óptimas cuando se lavó la columna con cloruro de sodio 0,24 M (el virus no eluyó hasta aproximadamente 0,26-0,27 M de cloruro de sodio), elución con cloruro de sodio 0,5 M y regeneración con cloruro de sodio 2 M (Figura 5).
- 25 El protocolo por etapas permitió la concentración del virus por un factor de 8-10 veces, y tanto el título como la transferencia tipo Western y RT-PCR indicaron recuperaciones de 60-70%. Se desarrolló también un régimen de limpieza y una combinación de regeneración con cloruro de sodio 2 M para 2 CV a 50 cm/h seguido por hidróxido de sodio 1 M para 2 CV a 25 cm/h en dirección de flujo ascendente, seguido por 2 CV adicionales de cloruro de sodio 2 M a 50 cm/h en flujo ascendente permitió la recuperación total de la capacidad de la columna y el perfil de elución (datos no mostrados). Ya que los títulos virales alcanzados fueron lo suficientemente altos para la formulación final, se escogió la separación de grupos en una columna de flujo rápido en Sefarosa 4 a 150 cm/h, y altura de lecho de 20 cm para una segunda purificación y una etapa de intercambio. Hasta 35% del volumen total de la columna se podría aplicar bajo estas condiciones y se intercambió el virus en regulador de formulación final.
- 30 Escalamiento
- Escalamiento ocho veces de la purificación por intercambio aniónico
- 35 Para demostrar la capacidad de escalamiento, se escaló el proceso 8 veces con una columna de alto rendimiento HR10_100 Q Sefarosa. Todos los parámetros tales como el tiempo de permanencia, los volúmenes aplicados, las concentraciones por etapas y los mg de muestra aplicados / ml de resina se mantuvieron constantes para el escalamiento. El perfil de elución de contaminantes, así como el pico viral fueron casi idénticos durante este escalamiento 10 veces (Figura 6).
- Se escaló el proceso adicionalmente para una planta piloto y se ejecuta la subsiguiente GMP por un factor de 50 veces. Se purificaron cinco litros de un virus purificado 4 veces por UF/DF con el proceso desarrollado con recuperaciones y pureza comparables.
- 40 Para alcanzar el mismo nivel de pureza final que para el material purificado en gradiente de cloruro de cesio, también se escaló la separación del grupo diez veces. El perfil de elución del escalamiento diez veces de la segunda etapa se muestra en la Figura 7.
- 45 La pureza del producto final fue comparable al material purificado por gradiente como se muestra por SDS PAGE teñido con plata (Figura 8A). El procedimiento de dos etapas también generó material a una concentración mayor que el material purificado por gradiente como se muestra por SDS PAGE teñido con Coomassie (Figura 8B). El análisis de transferencias tipo Western confirmó la identidad de bandas virales y permitió la cuantificación de la recuperación del virus para el proceso total. La recuperación total fue > 50%. Esto también fue confirmado por el ensayo del título (Figura 8C).
- Resumen del ejemplo 4
- 50 Se desarrolló un proceso de purificación para la purificación de un virus sin envoltura y se escaló más de 50 veces. La selección de diferentes principios de separación cromatográficos indicó que el intercambio aniónico y de exclusión por tamaño son la mejor opción para la purificación de un virión biológicamente totalmente activo

(infeccioso) en el caso de reovirus. Las condiciones para cromatografía de intercambio aniónico y de exclusión por tamaño como una primera y segunda etapas, respectivamente, fueron seleccionadas cuidadosamente y optimizadas para permitir un protocolo escalable, robusto. Se prestó especial atención a las tasas de flujo de las etapas de adsorción y desorción para la primera etapa, así como para la inyección de la muestra y la elución isocrática de la segunda etapa. Se evaluó la capacidad de enlazamiento para los diferentes intercambiadores aniónicos, y ya que únicamente ocurre enlazamiento en la superficie para partículas > 2 MDa sobre medio de agarosa al 6%, y > 20 MDa en medio de agarosa al 4%, el uso de perlas más pequeñas aumenta la capacidad de enlazamiento proporcionalmente a la reducción en el diámetro de la perla (por un factor de 3 y 9, respectivamente). El uso de regulador de fosfato en lugar de regulador con base en Tris produjo una mejor selectividad cuando se eluye el virus y también parecía superior en términos de recuperación de la actividad biológica.

Además, se evitó el uso de sales de magnesio en los reguladores de diafiltración y elución.

Un escalamiento de 8 veces mostró que los perfiles de elución fueron reproducibles después del escalamiento y que el protocolo por etapas permitió la recuperación del virus infeccioso con un rendimiento de aproximadamente 60 a 70%. La segunda etapa era necesaria para alcanzar la pureza final del virus purificado mediante dos etapas consecutivas de centrifugación en gradiente de densidad y permitió el intercambio de regulador del virus con el regulador de formulación final al mismo tiempo. Los títulos finales fueron lo suficientemente altos para omitir una etapa de adicional de ultrafiltración debido al aumento de la capacidad de los medios de alto rendimiento de Q Sefarosa. No se observó un impacto negativo debido a problemas potenciales de contrapresión al utilizar perlas de 34 micras después del escalamiento con una columna BPG100. La caída de presión sobre el lecho se mantuvo por debajo de 1,5 bar durante la aplicación de toda la muestra y el protocolo.

Sin embargo, se observaron inconsistencias en la capacidad después del escalamiento debido a cantidades variables de rojo fenol en diferentes lotes de materiales de partida y cuando se utilizó material de partida con bajo título viral. Bajo estas condiciones, se perdió algo del material viral en la etapa de lavado, y las pérdidas podrían ser tan altas como del 50%. Sin embargo, un mejor control de la calidad del material de partida, permitió recuperar el rendimiento del proceso de purificación para valores comparables con el proceso inicial a pequeña escala.

En resumen, esta invención proporciona un proceso de purificación para la producción de reovirus a gran escala de una calidad comparable a aquella de los procesos tradicionales a pequeña escala.

Referencias

- Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20020037576, publicada el 28 de marzo, 2002.
- WO99/08692A1 publicada el 25 de febrero, 1999.
- Patente japonesa No. 63044532A, publicada el 25 de febrero, 1988.
- Berry y colaboradores, *Biotechnology and Bioengineering*, "Production of Reovirus Type-1 and Type-3 from Vero Cells Grown on Solid and Macroporous Microcarriers", *Biotechnology and Bioengineering* 62: 12-19 (1999).
- Bos, J. L., "Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review", *Canc. Res.* 49(17): 4682-4689 (1989).
- Chandron y Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", *J. of Virology* 72(1): 467-75 (1998).
- Coffey, M. C., y colaboradores, "Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway", *Science* 282: 1332-1334 (1998).
- Davis, y colaboradores, *Microbiology*, Lippincott, Philadelphia (1990).
- Drastini, Y. y colaboradores, "Comparison of eight different procedures for harvesting avian reoviruses grown in Vero cells", *J. Virological Methods* 39: 269-278 (1992).
- Drayna D. y Fields B.N., "Biochemical studies on the mechanism of chemical and physical inactivation of reovirus", *Journal of Genetic Virology* 63(Pt 1): 161-170 (1982).
- Duncan y colaboradores, "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein", *Virology* 182(2): 810-9 (1991).
- Estes M.K. et al, "Rotavirus stability and inactivation", *J. of Genetic Virology* 43(2): 403-409 (1979).

- Floyd R. y Sharp D.G., "Aggregation of poliovirus and reovirus by dilution in water", *Applied and Environmental Microbiology* 33(1): 159-167 (1977).
- Floyd R. y Sharp D.G., "Viral aggregation: quantitation and kinetics of the aggregation of poliovirus and reovirus", *Applied and Environmental Microbiology* 35(6): 1079-1083 (1978).
- 5 Floyd R. y Sharp D.G., "Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH", *Applied and Environmental Microbiology* 35(6): 1084-1094 (1978).
- Floyd R. y Sharp D.G., "Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of poliovirus and reovirus at low and high pH", *Applied and Environmental Microbiology* 38(3): 395-401 (1979).
- Fields, B. N. y colaboradores, *Fundamental Virology*, 3ra Edición, Lippincott-Raven (1996).
- 10 Mah y colaboradores, "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virionanchoring function", *Virology* 179(1): 95-103 (1990).
- McRae, M. A. y Joklik, W. K., "The nature of the polypeptide encoded by each of the 10 double-stranded RNA segments of reovirus type 3", *Virology*, 89: 578-593 (1979).
- 15 Nibert y colaboradores, "Reovirus and their replication", en Fields y colaboradores, *Fundamental Virology*, 3ra Edición, Lippincott-Raven (1996).
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia Pa. 19. Ed de complemento (1995).
- Smith, R. E., y colaboradores, "Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3", *Virology*, 39: 791-800 (1969).
- 20 Spinner M.L. y DiGiovanni G.D., "Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR", *Applied and Environmental Microbiology* 67(7): 3016-3020 (2001).
- Strong, J. E. y P. W. Lee, "The v-erbV oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection", *J. Virol.* 70: 612-616 (1996).
- Strong, J. E., y colaboradores, "Evidence that the Epidermal Growth Factor Receptor on Host Cells Confers Reovirus Infection Efficiency", *Virology* 197(1): 405-411 (1993).
- 25 Strong, J. E., y colaboradores, "The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus", *EMBO J.* 17: 3351-3362 (1998).
- Taber y colaboradores, "The selection of virus-resistant Chinese hamster ovary cells", *Cell* 8: 529-533 (1976).
- Taylor D.H. y Bosmann H.B., "Measurement of the electrokinetic properties of vaccinia and reovirus by laser-illuminated whole-particle microelectrophoresis", *J. of Virology Methods* 2(5): 251-260 (1981).
- 30 Turner y Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain", *Virology* 186(1): 219-27 (1992).
- Zerda K.S. et al, "Adsorption of viruses to charge-modified silica", *Applied and Environmental Microbiology* 49(1): 91-95 (1985).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir virus a partir de un cultivo de células, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un cultivo de células que ha sido infectado por el virus;
- 5 (b) extraer el virus de las células mediante la adición de un detergente al cultivo de células e incubar durante un período de tiempo para dar lugar a un lisado celular;
- (c) retirar los residuos celulares;
- (d) recolectar el virus; y
- 10 (e) en ausencia de magnesio, purificar el virus mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, o una combinación de los mismos, en donde se usa un regulador de fosfato en la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño;
- en donde un cultivo de células significa una población de células cultivadas como se encuentra en sus condiciones de cultivo; y
- en donde el virus es un virus sin envoltura.
2. El método de la reivindicación 1, en donde los restos celulares se separaron por filtración.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los residuos celulares se eliminan mediante filtración por etapas que comprende:
- (1) la filtración a través de un prefiltro que tiene un tamaño de poro de 5 μm o 8 μm , y
- (2) la filtración después de la etapa (1) a través de un filtro de combinación que tiene tamaños de poro de 3 μm y 0,8 μm .
- 20 4. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los residuos celulares se eliminan mediante una filtración por etapas que comprende:
- (1) la filtración a través de un prefiltro que tiene un tamaño de poro de 5 μm o 8 μm , y
- (2) la filtración después de la etapa (1) a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,8 μm .
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además el tratamiento del lisado celular con una enzima para escisión del ADN.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende además la concentración del filtrado.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el filtrado se concentra por diafiltración.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la diafiltración se realiza con un cartucho de fibra hueca que tiene un corte de peso molecular de 300 kDa.
- 30 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el virus es un reovirus.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el reovirus es un reovirus de mamífero.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el reovirus de mamífero es un reovirus humano.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el reovirus humano es un reovirus serotipo 3.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el reovirus serotipo 3 es la cepa Dearing.
- 35 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde el reovirus es un reovirus recombinante.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde las células son células 293 de riñón (HEK 293) de embrión humano.
16. El método de la reivindicación 15, en donde las células HEK 293 se cultivan en suspensión.
- 5 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el virus se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico y de exclusión por tamaño.
19. El método de la reivindicación 18, en donde el intercambio iónico se lleva a cabo usando un intercambiador aniónico.
- 10 20. El método de la reivindicación 18 o 19, en donde el intercambio iónico se lleva a cabo antes de la cromatografía de exclusión por tamaño.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde el regulador de fosfato comprende fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2.
22. Un método para producir reovirus infecciosos, que comprende:
- 15 (a) proporcionar un cultivo de células HEK 293 que ha sido infectado por reovirus;
- (b) extraer el virus de las células mediante la adición de octoxinol-9 a 10 al cultivo e incubación aproximadamente a 25°C hasta aproximadamente 37°C;
- (c) tratar la mezcla de la etapa (b) con una enzima para escisión del ADN;
- (d) retirar los residuos celulares mediante filtración;
- 20 (e) concentrar el filtrado mediante ultrafiltración o diafiltración;
- (f) en ausencia de magnesio, purificar el reovirus mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño, en donde se usa un regulador de fosfato en la cromatografía de intercambio iónico y en la cromatografía de exclusión por tamaño; y
- (g) recoger el reovirus;
- 25 en donde el cultivo de células HEK 293 significa una población de células HEK 293 cultivadas como se encuentra en sus condiciones de cultivo.
23. El método de la reivindicación 22, en donde la etapa (f) comprende cromatografía de intercambio aniónico seguida por cromatografía de exclusión por tamaño.

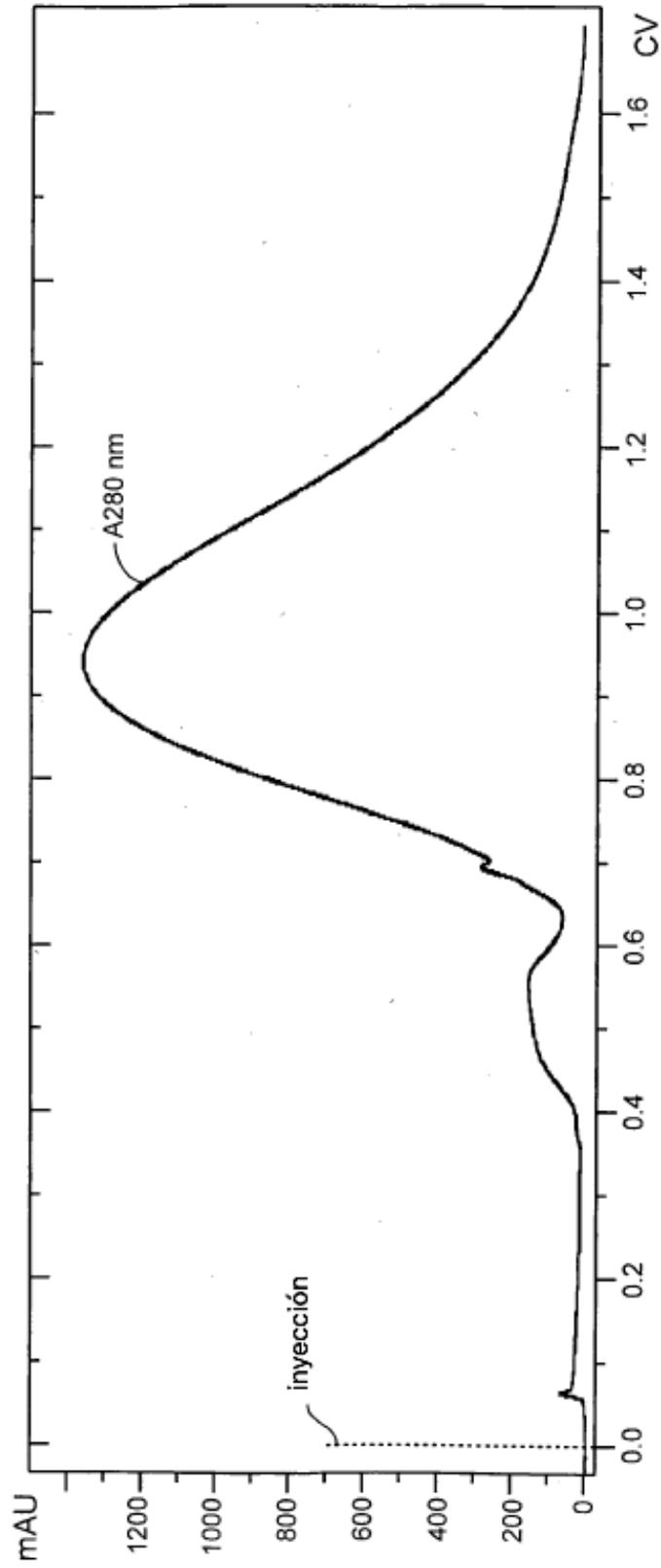


FIG. 1

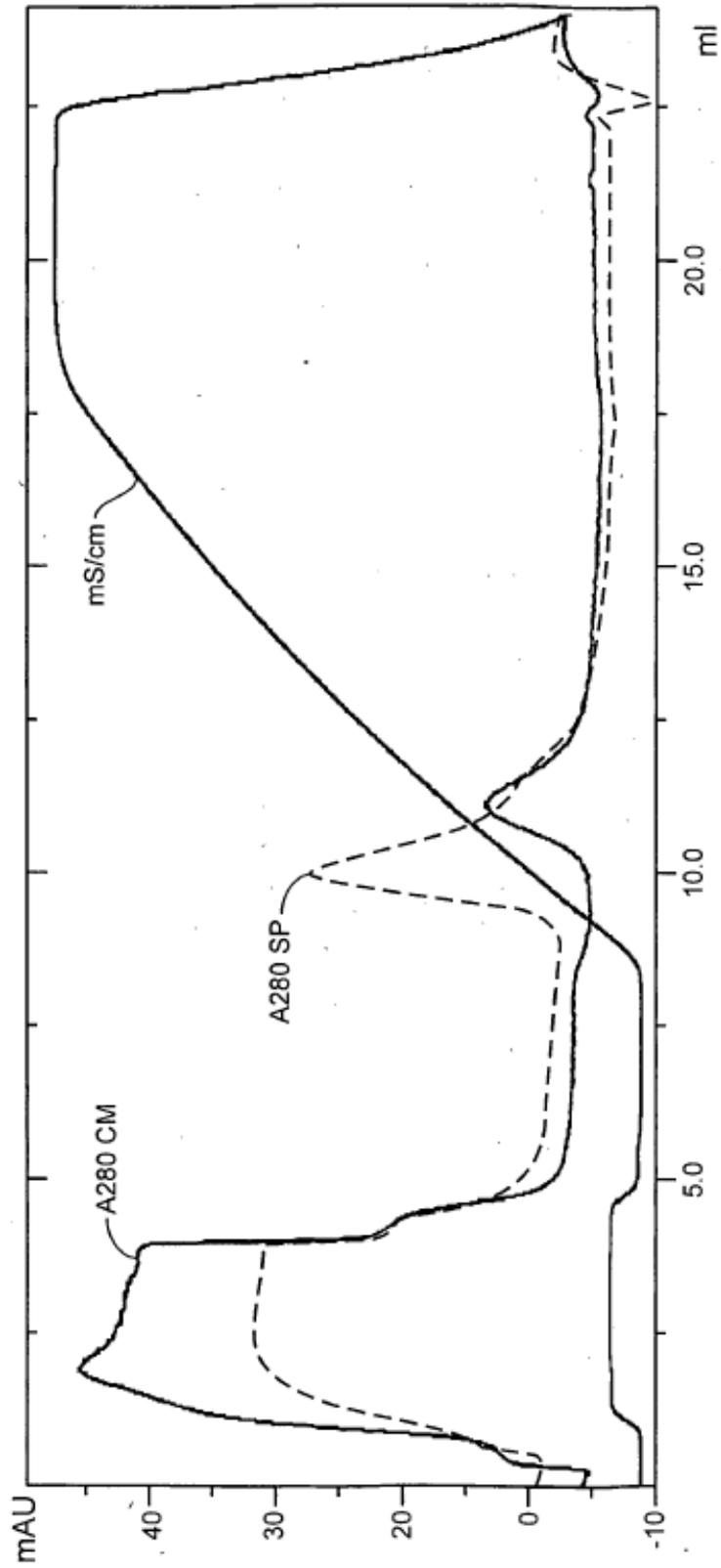


FIG. 2

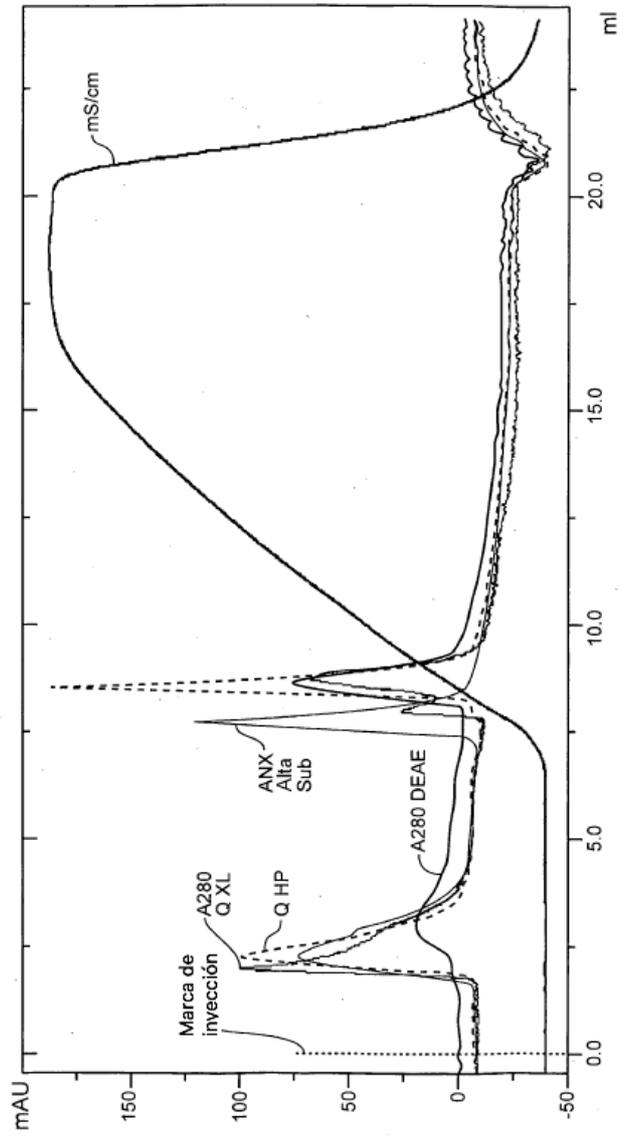


FIG. 3

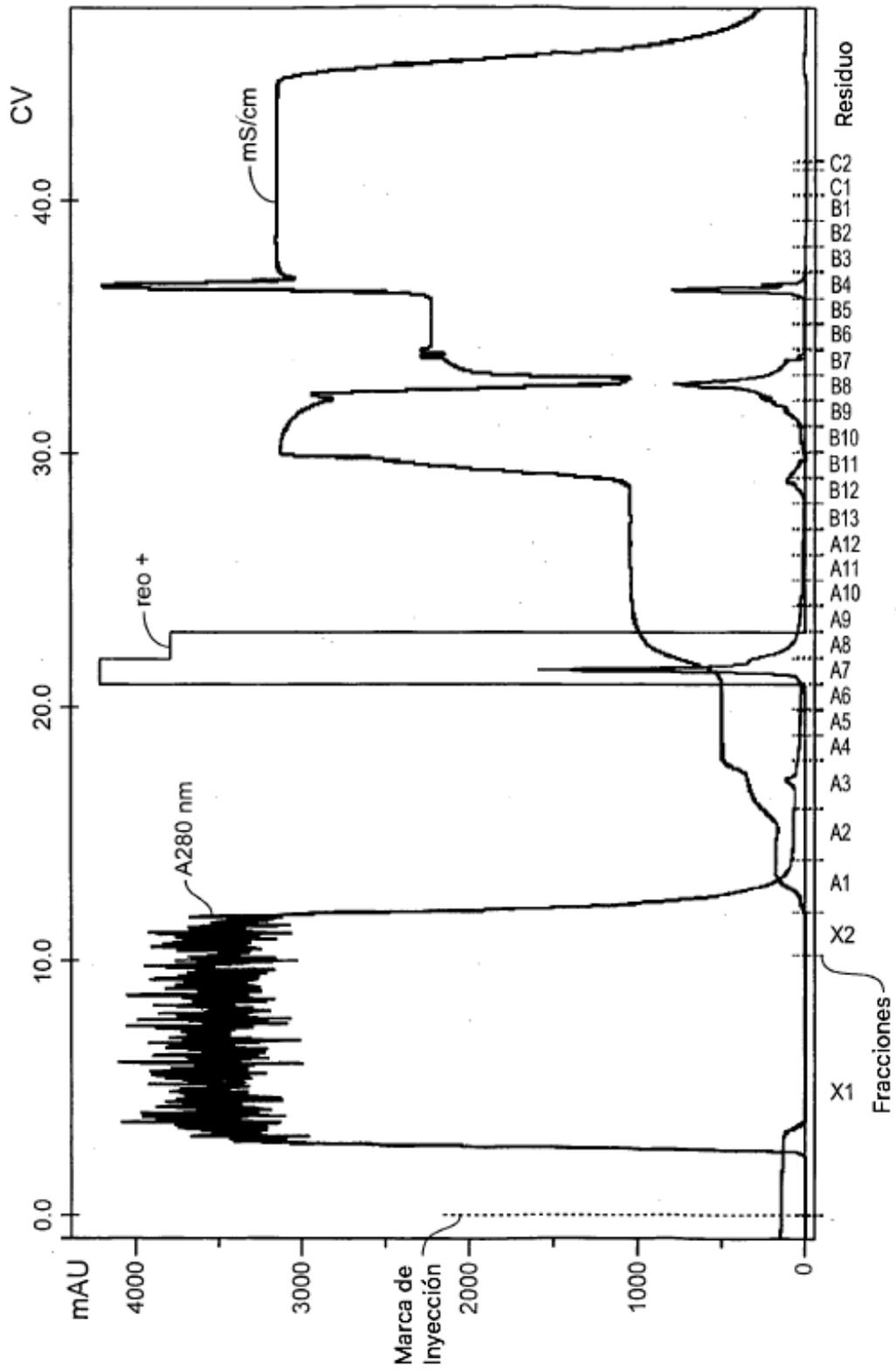


FIG. 5

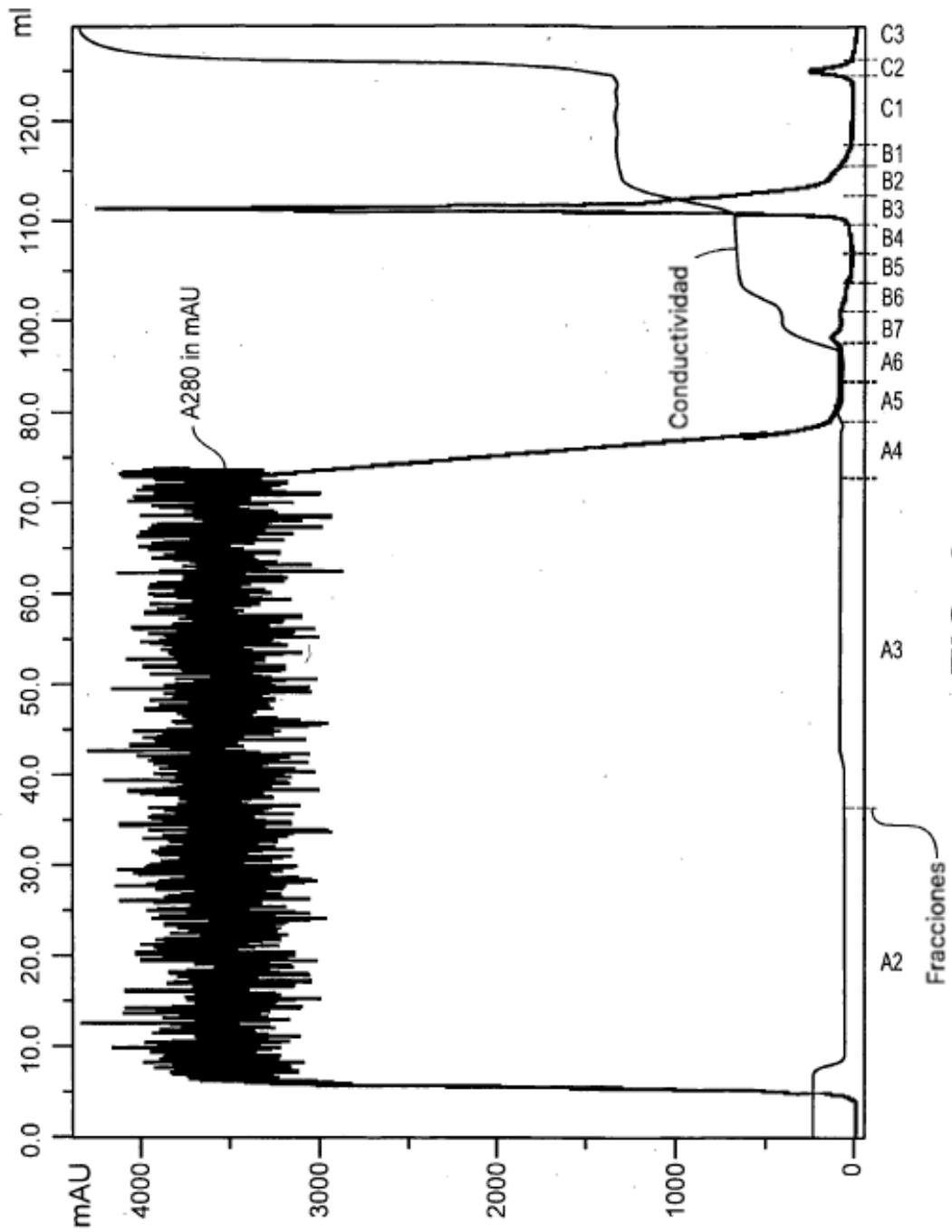


FIG. 6

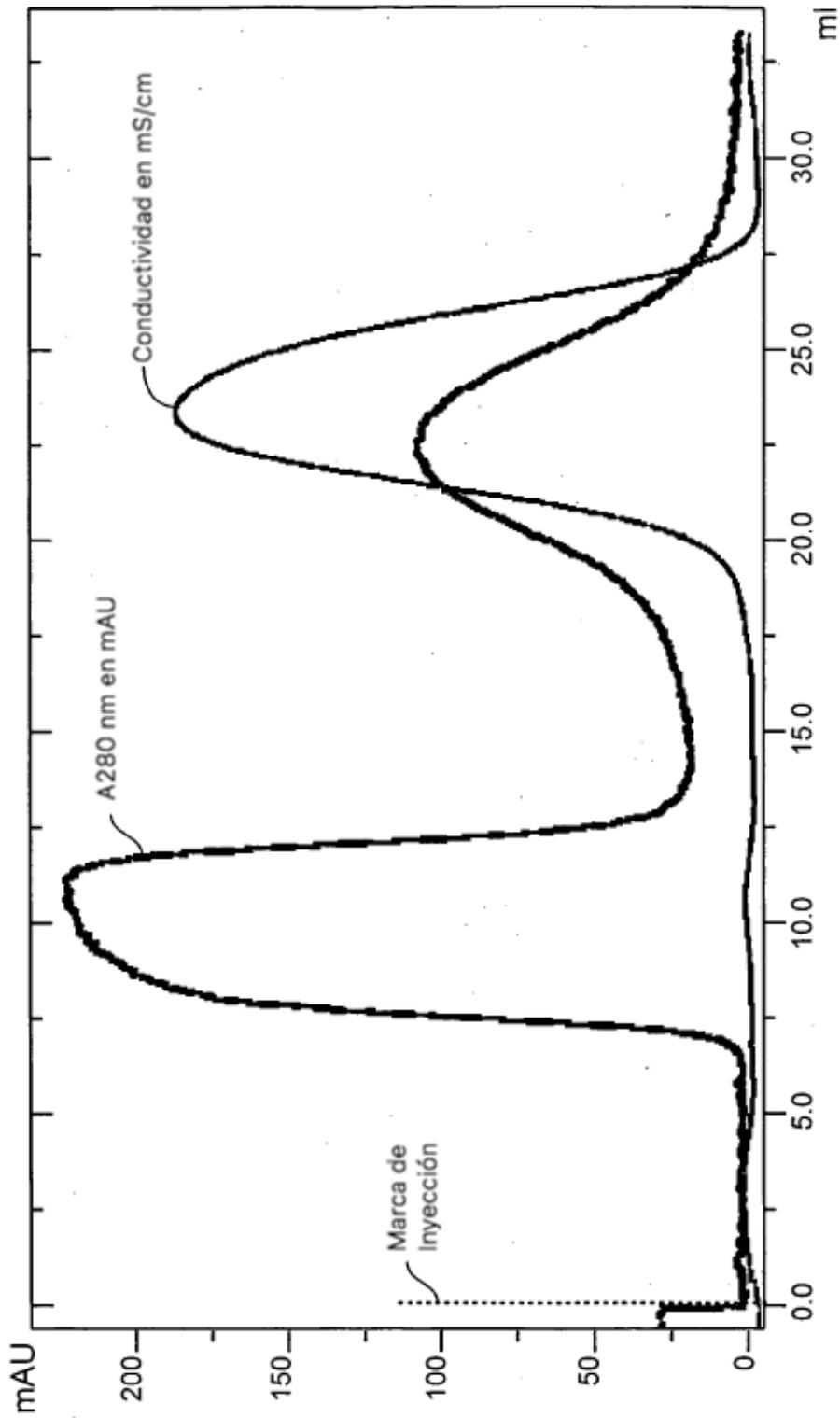


FIG. 7

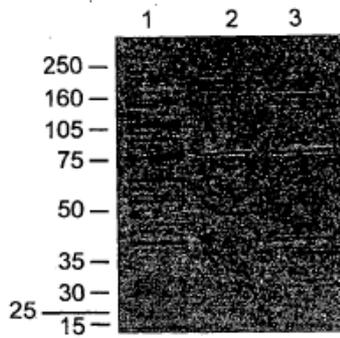


FIG. 8A

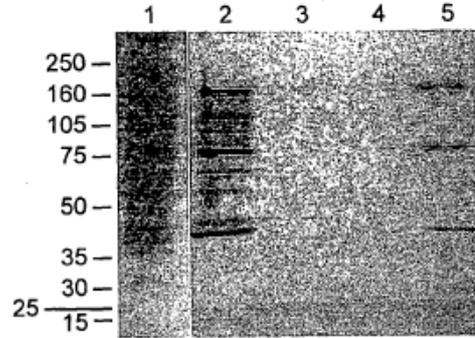


FIG. 8B

Muestra	Título corregido ± 95% PFU/ml CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ ml)	Corregido por ml Aplicados/Recolectados	Rendimiento
Material UF/DF	9.91 ± 0.21	1.225 x 10 ¹⁰	n.a.
Q Sefarosa HP Estudio de capacidad	10.57 ± 0.21	3.72 x 10 ¹⁰	10 CV Aplicado, Recolectado en 2,5 CV
Q Sefarosa HP	10.98 ± 0.21	9.55 x 10 ¹⁰	10 CV Aplicado (78,5 ml) 6 ml Recolectados (5.73 x 10 ¹¹)
Escalamiento de SEC	10.80 ± 0.31	6.31 x 10 ¹⁰	5.1 ml Aplicados 5.823 ml Recolectados

FIG. 8C