

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 489**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2015 PCT/EP2015/066638**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2015 E 15741534 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3172317**

54 Título: **Proceso de purificación de poliovirus a partir de cultivos celulares**

30 Prioridad:

24.07.2014 EP 14178392
24.07.2014 EP 14178399

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2019

73 Titular/es:

JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

SEGERS, MARIKEN;
KUNGAH NFOR, BECKLEY;
ALAZI, FERAS NACHMI y
DE VOCHT, MARCEL LEO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 733 489 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

Proceso de purificación de poliovirus a partir de cultivos celulares

- 5 La invención se refiere al campo de la producción de virus. Más particularmente, se refiere a métodos mejorados para la purificación de partículas de poliovirus a partir de una suspensión celular.

Antecedentes de la invención

- 10 Los recientes desarrollos en el campo de la producción de vacunas han creado la necesidad de fabricar a gran escala. Se necesitan procesos robustos y de alto rendimiento para proporcionar al mundo la cantidad suficiente de vacunas (recombinantes) para combatir enfermedades infecciosas como la poliomielitis.

- 15 Los poliovirus son miembros del género Enterovirus de la familia Picornaviridae. Los poliovirus son pequeños virus no envueltos con cápsides que encierran un genoma de ARN de sentido positivo de una sola hebra. Hay tres tipos de poliovirus: tipos 1, 2 y 3. Las infecciones de individuos susceptibles a poliovirus pueden provocar una poliomielitis paralítica. La poliomielitis es altamente contagiosa. Con el tiempo, se han desarrollado dos vacunas contra la polio diferentes, la vacuna de poliovirus inactivado (IPV) de Salk y la vacuna de poliovirus oral atenuada viva (OPV) de Sabin. Ambas vacunas son seguras y efectivas. Cada una tiene sus ventajas y desventajas particulares, y ambas han desempeñado un papel importante en el control de la poliomielitis. Para una revisión sobre poliovirus y vacunas de la polio, véase, por ejemplo, Kew et al, 2005.

- 20 Los sistemas de cultivo y purificación para producir el material de poliovirus que se puede utilizar en las vacunas, en particular para IPV, contribuyen en gran medida a los costos relativamente altos.

- 25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de obtener sistemas eficientes de cultivo y purificación para producir poliovirus para su uso en vacunas, en particular, sigue existiendo una necesidad de procesos de purificación para poliovirus con altos rendimientos.

- 30 En un proceso típico de producción de poliovirus, las células se cultivan en un medio específico y el poliovirus se pone posteriormente en contacto con las células para permitir que el virus infecte dichas células y se propague. Después de la propagación del poliovirus en dichas células, el virus o sus componentes se recogen del cultivo celular.

- 35 Un proceso de fabricación preferido de IPV utilizado actualmente utiliza células VERO derivadas de monos dependientes de anclaje que se cultivan en microtransportadores y se cultivan en medios suplementados con suero.

- 40 El virus producido y liberado en el medio de cultivo celular puede separarse de la biomasa celular por métodos convencionales, tales como filtración en profundidad o centrifugación. En tal caso, la filtración o centrifugación es el paso de recolección. La recolección filtrada se ultrafiltra normalmente para concentrar la suspensión viral y, posteriormente, el poliovirus se puede purificar, por ejemplo, utilizando filtración en gel y/o cromatografía de intercambio iónico. Los métodos para recoger y purificar poliovirus o componentes virales, y la producción de vacunas de los mismos ya se llevan utilizando en la técnica durante décadas, y por lo tanto son bien conocidos y se han descrito ampliamente, por ejemplo, en Van Wezel et al, 1978; Montagnon et al., 1984; WO 2007/007344 y US 4.525.349, todas incorporadas aquí por referencia. La suspensión de virus concentrada resultante puede diluirse opcionalmente, y para preparar IPV, el poliovirus contenido se inactivará, para lo cual se pueden usar métodos convencionales.

- 50 Las productividades de los procesos de producción de poliovirus utilizados actualmente no son suficientes para mejorar los volúmenes de producción de IPV necesarios para erradicar la poliomielitis a escala mundial. Por lo tanto, hay una limitación en la capacidad de producción global. Además, los procesos de producción utilizados actualmente, debido a su baja productividad, tienen altos costos de operación unitarios debido a la gran huella de las instalaciones y, en consecuencia, un alto consumo de medio y de tampón, junto con una alta producción de desechos (bioactivos). Además de los costos asociados con el proceso de fabricación de la vacuna, también el control de lotes de productos y los costos de liberación se escalan con la productividad, es decir, los lotes de alta productividad reducen significativamente los costos por dosis de vacuna.

- 55 Una forma de mejorar los rendimientos de la producción de poliovirus es mejorar el proceso de producción previo. Los procesos para la producción de poliovirus con altos rendimientos se han logrado al aumentar la densidad celular de los cultivos de producción (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/06823), que, sin embargo, pueden plantear problemas adicionales en el procesamiento posterior. No se han descrito desarrollos para mejorar los procesos de purificación de poliovirus hasta ahora para cultivos de densidad baja o alta.

- 60 Por lo tanto, existe la necesidad en la industria de mejorar los procesos posteriores para aumentar aún más los rendimientos de los procesos de purificación para el poliovirus.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a métodos mejorados para purificar partículas de poliovirus a partir de una recolección de células en bruto, y también es adecuada para cosechas con alta densidad celular. En ciertas realizaciones ejemplares, los métodos de la presente invención pueden tener, por ejemplo, una productividad global que oscila entre 15-25; 6-12 y 10-16 dosis de cultivo de virus de IPV/ml, después de la inactivación con formaldehído para poliovirus de tipo 1, 2 y 3, respectivamente. Este es un rendimiento volumétrico sustancialmente mayor que los métodos conocidos hasta ahora. De hecho, Kreeftenberg et al. (2006) estimaron que los rendimientos generales para los procesos de IPV convencionales basados en la plataforma de células VERO fueron de 0,64, 1,04 y 0,34 dosis/ml de cultivo de virus, en base a 40:8:32 de antígeno D unidades/dosis para el poliovirus de tipo 1-3 respectivamente, y suponiendo una recuperación global del antígeno D después de la inactivación del 40%. El notable aumento significativo en la productividad se traducirá en una reducción eminente de la huella de la instalación con la consiguiente reducción de los costos de fabricación, al tiempo que se proporciona la capacidad máxima necesaria para satisfacer la demanda mundial de dosis de IPV.

El procesamiento posterior de las suspensiones de alta densidad celular que utilizan procesos comúnmente conocidos requeriría de muchos pasos. Un primer paso de filtración consistiría en un curso de filtración para eliminar células enteras, seguido de una serie de filtros de membrana de tamaño más pequeño para eliminar los residuos celulares y el material precipitado. Posteriormente, después de un paso de concentración, se requieren dos o más pasos de cromatografía selectiva para obtener una suspensión de poliovirus suficientemente purificada de acuerdo con los requisitos reglamentarios (OMS/EP).

En este documento, hemos descubierto y revelado que, directamente después de propagar el poliovirus en un cultivo celular, la cosecha de cultivo celular cruda obtenida que contiene poliovirus podría tratarse con un detergente, preferiblemente seleccionado del grupo de detergente catiónico, detergente aniónico, detergente no iónico y detergente bipolar para mejorar la liberación de poliovirus en la suspensión de cosecha. Los rendimientos de purificación global así obtenidos no tuvieron precedentes. De hecho, en ciertas realizaciones, el proceso de la presente invención alcanzó rendimientos de 6-25 dosis de IPV/ml de suspensión celular, a diferencia de los rendimientos de las plataformas basadas en células Vero convencionales, de 0,3-1 dosis de IPV/ml de suspensión celular, obtenidos usando los procesos descritos hasta ahora.

La invención proporciona un método para purificar poliovirus a partir de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho método las etapas de: a) añadir un detergente a la cosecha de cultivo de células en bruto; y b) clarificar dicha cosecha de cultivo celular que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus.

La invención también proporciona un método para mejorar la liberación de poliovirus a partir de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho método las etapas de: a) añadir un detergente a la cosecha de cultivo celular en bruto; y b) clarificar dicha cosecha de cultivo celular que contiene poliovirus la para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus.

La etapa de clarificación da como resultado una cosecha clarificada, que comprende un contenido fuertemente reducido en el ADN de la célula huésped y los residuos celulares, en comparación con la cosecha de cultivo celular en bruto.

Sorprendentemente, después de la clarificación, una etapa de captura de intercambio catiónico altamente selectiva seguida de una etapa de pulido basada en separación por tamaño, es decir, la cromatografía de exclusión por tamaño o la etapa del proceso de diafiltración fue capaz de adaptarse a la eliminación de altos niveles de impurezas de la proteína de la célula huésped (HCP) de cosechas clarificadas.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho método las etapas de: a) agregar un detergente a la cosecha de cultivo celular en bruto b) clarificar dicho cultivo de células que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus; y c) someter la cosecha clarificada obtenida en el paso b) a un paso de captura para obtener una suspensión que contiene poliovirus. Preferiblemente, dicha etapa de captura es una etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

En una realización preferida, el poliovirus obtenido en la etapa c) de los métodos anteriores se separa adicionalmente de la suspensión que contiene poliovirus por exclusión de tamaño. Preferiblemente, dicha exclusión de tamaño se realiza mediante cromatografía de exclusión de tamaño.

En una realización preferida, la invención también proporciona un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: a) agregar un detergente a la cosecha de cultivo de células en bruto b) clarificar dicho cultivo de células que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus; c) someter la cosecha clarificada obtenida en la etapa b) a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico para obtener una suspensión que contiene poliovirus; y d) purificar

adicionalmente el poliovirus de la suspensión que contiene poliovirus mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

5 El detergente usado en la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo de detergentes catiónicos, detergentes aniónicos, detergentes no iónicos y detergentes zwitteriónicos. En una realización aún más preferida, dicho detergente es un detergente catiónico, preferiblemente dicho detergente catiónico se selecciona del grupo de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), cloruro de hexadecilpiridinio (CPC), cloruro de bencetonio (BTC) y bromuro de domifeno (DB). En una realización más preferida, dicho detergente es bromuro de domifeno (DB).

10 En otra realización más, dicho detergente preferido es un detergente aniónico. Preferiblemente, dicho detergente aniónico se selecciona del grupo de hidrato de taurodeoxicolato de sodio (STH) y dodecilsulfato de sodio (SDS).

15 En otra realización más, dicho detergente preferido es un detergente no iónico. Preferiblemente, dicho detergente no iónico se selecciona del grupo de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton® X-100) y decil-β-D-1-tiomaltopiranosido (DTP) .

20 En otra realización, dicho detergente preferido es un detergente zwitteriónico. Preferiblemente, dicho detergente zwitteriónico se selecciona del grupo de 3-(N,N-dimetilmistristilamonio)propanosulfonato (SB3-14), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS).

La presente invención también proporciona el uso de un detergente para mejorar la liberación de poliovirus a partir de una cosecha de cultivo celular en bruto.

Breve descripción de las figuras.

25 Fig. 1 (A, B y C). Liberación de antígeno D de las cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con un detergente (bromuro de domifeno). Varias cosechas con distintas densidades celulares y cada una con una cepa de polio diferente (Mahoney, MEF-1 o Saukett) se trataron con un detergente y luego se centrifugaron. La concentración de antígeno D en el sobrenadante se describe como una función de la concentración de detergente.

30 Fig. 2 (A, B y C). Precipitación del ADN de la célula huésped en cultivos de células celulares crudas que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con un detergente (bromuro de domifeno). Varias cosechas con distintas densidades celulares y cada una con una cepa de polio diferente (Mahoney, MEF-1 o Saukett) se trataron con un detergente y luego se centrifugaron. La concentración de ADN de la célula huésped en el sobrenadante se describe como una función de la concentración de detergente.

35 Fig. 3. Relación de la concentración de antígeno D en sobrenadante/concentración de antígeno D en crudo, antes y después del tratamiento con un detergente. Las proporciones se midieron para varias cosechas con distintas densidades celulares y que contenían diferentes cepas de polio (Mahoney, MEF-1 o Saukett).

Fig. 4. Diagrama de flujo de purificación de poliovirus.

40 Fig. 5. Caracterización del producto por SDS-PAGE de cepas de poliovirus (A) Mahoney, (B) MEF-1, (C) Saukett. 1 = Marcador, 2 = Control de idoneidad del sistema, 3 = Eluido CEX, 4 = Eluido SEC.

Fig. 6 (A) Liberación de antígeno D de cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con diferentes detergentes catiónicos; CTAB, CPC y BTC, respectivamente.

45 Fig. 6 (B) Precipitación del ADN de la célula huésped en cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con diferentes detergentes catiónicos; CTAB, CPC y BTC, respectivamente.

Fig. 7 (A, B y C). Liberación de antígeno D de las cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con diferentes tipos de detergentes (detergentes aniónicos, zwitteriónicos y no iónicos).

50 Fig. 8 (A, B y C). Precipitación del ADN de la célula huésped en cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con diferentes tipos de detergentes (detergentes aniónicos, zwitteriónicos y no iónicos).

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se refiere a métodos mejorados para purificar partículas de poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto que contiene poliovirus. Una cosecha de cultivo celular en bruto como se define en la presente invención, se obtiene inmediatamente después del cultivo celular. Se define en bruto porque no se ha tratado y no se ha clarificado en ninguna forma antes de tratarlo con un detergente. A diferencia del sobrenadante de una cosecha de cultivo celular, la cosecha de cultivo celular en bruto contiene células y residuos de células junto con partículas de poliovirus.

60 En los procesos descritos previamente para la purificación de poliovirus, por ejemplo, en Henderson et al., una cosecha clarificada se trata en lugar de una cosecha de cultivo celular en bruto como se describe en la presente solicitud. La diferencia es que la cosecha en Henderson et al. ya se realizó una etapa de clarificación en la que la cosecha se centrifugó para eliminar los residuos celulares. En Henderson, no se agrega un detergente catiónico a

una cosecha de cultivo celular en bruto, sino que se agrega a una cosecha clarificada, de la cual se eliminaron los residuos celulares previamente.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las partículas de poliovirus se purifican a partir de cosechas de células en bruto de alta densidad celular, dando lugar a altos rendimientos de poliovirus purificado. Estas cosechas de cultivos celulares en bruto de alta densidad celular se obtienen cultivando células a densidades celulares altas. Dicho cultivo puede, por ejemplo, realizarse en modo de lote, alimentado por lote o de perfusión. Los métodos para cultivar células hasta densidades celulares altas son conocidos por los expertos en la materia. Los métodos específicos para obtener cultivos de alta densidad celular se describen en, p. ej., WO2004/099396, WO2005/095578, WO2008/006494.

De acuerdo con la presente invención, una cosecha de cultivo celular crudo de alta densidad celular contiene entre aproximadamente 5×10^6 y 150×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 8×10^6 y 120×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 12×10^6 y 100×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 20×10^6 y 80×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 10×10^6 y 60×10^6 células/ml.

En una realización preferida de la presente invención, la densidad celular en dicha cosecha de cultivo celular en bruto varía entre aproximadamente 10×10^6 y 50×10^6 células/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 15×10^6 células/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 20×10^6 células/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 25×10^6 , por ejemplo, hasta aproximadamente 30×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 35×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 40×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 45×10^6 células/ml.

Sin embargo, los métodos de acuerdo con la presente invención también funcionan para cosechas de cultivos celulares con densidades celulares más bajas, por ejemplo, entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ y 10×10^6 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 1×10^6 y 5×10^6 células/ml.

Normalmente, los cultivos celulares se infectan con partículas de poliovirus para permitir que dicho poliovirus se propague en las células. A continuación, se obtienen cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen altas concentraciones de poliovirus, en un solo bioreactor. Los métodos para infectar cultivos celulares son conocidos por los expertos en la materia. Los métodos específicos para obtener cultivos de alta densidad celular con alta concentración de virus se describen en, por ejemplo, WO2011/006823. Esta referencia describe los procesos para la producción de grandes cantidades de poliovirus recombinante. Estos procesos se basan en la capacidad de infectar cultivos con alta densidad celular y la preservación de una alta productividad de poliovirus por célula. A continuación, ofrece un método para obtener una cosecha de cultivo celular crudo de alta densidad celular con altas concentraciones de poliovirus, en un solo bioreactor. Los rendimientos típicos de los procesos actuales para poliovirus de tipo salvaje recombinante, infectados a una densidad celular de, por ejemplo, 12,5 millones/ml y cosechadas 22-24 h después de la infección están en el rango de $5,0 \times 10^9$ a $3,2 \times 10^{10}$ DICT50/ml.

Una vez que los poliovirus se han propagado en el cultivo celular, matando a la mayoría de las células (lisis), las partículas de poliovirus se purifican, de acuerdo con la presente invención, de la cosecha de cultivo celular en bruto.

Los procesos descritos actualmente para la producción de poliovirus dependen completamente de la liberación autóloga de poliovirus de las células al medio de cultivo, que es un proceso muy eficiente para los poliovirus. Sorprendentemente, los inventores actuales encontraron que se podría obtener un aumento significativo del rendimiento cuando el cultivo celular (que ya contenía poliovirus liberado, residuos celulares, ADN de la célula huésped y proteínas de la célula huésped) se trató con un detergente, preferiblemente seleccionado del grupo de detergentes catiónicos, detergentes aniónicos, detergentes no iónicos y detergentes zwitteriónicos. Además, este paso dio como resultado una cosecha mucho más limpia y clarificada con ADN y proteínas de la célula huésped muy reducidos.

Ensayos utilizados para cuantificar el ADN de la célula huésped, las proteínas de la célula huésped y las partículas de poliovirus durante el proceso.

El ADN de la célula huésped residual se puede determinar mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando PCR cuantitativa en tiempo real con la sonda Taqman. Los cebadores y la sonda están diseñados para ADN ribosomal 18S. Las cantidades de ADN de muestra se determinan por comparación con una curva estándar de ADN de cantidad conocida que se prepara a partir del ADN de la célula productora. La muestra de ADN de curva estándar se digiere con la enzima de restricción Apa I para imitar al ADN cortado y parcialmente degradado.

El ADN de las muestras se aísla mediante tratamiento con ácido desoxicólico y Proteinasa K. Las reacciones de PCR en tiempo real se llevan a cabo utilizando un sistema de PCR en tiempo real rápido (ABI Prism 7500). Las cantidades de ADN se derivan de mediciones duplicadas de muestras.

La concentración de proteínas de la célula huésped residual (HCP) se determinó en un kit de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) disponible en el mercado (Cygnum Technologies, F530), específico para las

HCP. Las concentraciones se determinaron en referencia a las muestras de curva estándar incluidas en el kit. El rango del ensayo es de 25-200 ng/ml.

Las vacunas contra la poliomielitis se basan en virus vivos o virus inactivados. Contienen el antígeno D del poliovirus, que es el antígeno protector importante. Los rendimientos de virus se pueden medir mediante técnicas estándar de titulación de virus, mientras que la determinación de la concentración de antígeno D para las cepas de poliovirus Mahoney, MEF-1 y Saukett como una medida de la potencia se puede realizar mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado al antígeno D (ELISA). El ensayo se basa en la unión del antígeno D a los anticuerpos específicos de serotipo a los que se agrega el reactivo de peroxidasa de la mezcla. La actividad de la peroxidasa se cuantifica entonces por densidad óptica. Las concentraciones de antígeno D se determinan en referencia al estándar internacional de IPV de la Dirección Europea para la Calidad de los Medicamentos y la Atención Médica (EDQM), ver Fuchs et al. El rango de ensayo es 40-160 UD/ml para Mahoney, 8-32 UD/ml para MEF-1 y 32-128 UD/ml para Saukett.

La inmunogenicidad se puede determinar, por ejemplo, mediante pruebas in vivo en animales. La potencia se puede determinar utilizando el ELISA de antígeno D y mediante un ensayo de cultivo celular neutralizante de poliovirus en sueros de ratas previamente inmunizadas.

Aumento de la liberación de antígeno D y precipitación selectiva del ADN de la célula huésped.

Se encontró que la adición de un detergente a un cultivo celular crudo que contenía poliovirus resultó en un aumento sustancial de la concentración de antígeno D en la fase líquida de la cosecha. Al mismo tiempo hace que el ADN de la célula huésped se precipite. Como se ejemplifica en el presente documento, esta etapa de precipitación dio como resultado un aumento de aproximadamente el 100% en la liberación de antígeno D de la recolección de células en bruto en la fase líquida y dio como resultado una reducción en el ADN de la célula huésped de aproximadamente al menos 5 log 10 después de la clarificación.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método adecuado para purificar partículas de poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto y también es adecuado para una cosecha de un cultivo con una alta densidad celular. Los detergentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen, entre otros, detergentes catiónicos, detergentes aniónicos, detergentes no iónicos y detergentes zwitteriónicos.

En una realización preferida, los detergentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención son detergentes catiónicos que incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de amina, compuestos de amonio cuaternario tales como, por ejemplo, bromuro de domifeno (DB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), cloruro de hexadecilpiridinio (CPC) y cloruro de bencetonio (BTC), y cualquier mezcla correspondiente de los mismos. Más específicamente, las muchas formas de polietilenimina (PEI) han demostrado ser muy efectivas en la neutralización del exceso de carga aniónica (impurezas de ADN). Los detergentes catiónicos apropiados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a las siguientes clases y ejemplos de productos disponibles comercialmente: sales de monoalquiltrimetilamonio (ejemplos de productos disponibles comercialmente incluyen cloruro o bromuro de cetiltrimetilamonio como CTAB, bromuro o cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTA), cloruro de alquiltrimetilamonio, cloruro de alquilariltrimetilamonio, bromuro o cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodecildimetil-2-fenoxietilamonio; hexadecilamina: sal de cloruro o bromuro, dodecilamina o sal de cloruro y bromuro o cloruro de cetildimetilamonio), sales de monoalquildimetilbencil amonio (los ejemplos incluyen cloruros de alquildimetilbencilamonio y cloruro de bencetonio como BTC), sales de dialquildimetil amonio (los productos comerciales incluyen bromuro de domifeno (DB), haluros de didecildimetil amonio y cloruro o bromuro de octildodecildimetil amonio), sales de amonio heteroaromático (los productos comerciales incluyen haluros de cetilpiridinio (CPC) o sal de bromuro y bromuro o cloruro de hexadecilpiridinio), isómero cis 1-[3-cloroalil]-3,5,7-triazol-1-azoniaadamantano, bromuro de alquil-isoquinolinio y cloruro de alquildimetilnaftil-metil-amonio (BTC 1110), sales de amonio cuaternario polisustituidas, (los productos disponibles comercialmente incluyen, pero no están limitados a sacarinato de alquildimetilbencil amonio y ciclohexilsulfamato de alquildimetil etilbencil amonio), sales de bis-amonio cuaternario (los ejemplos de productos incluyen 1,10-bis(cloruro de 2-metil-4-aminoquinolinio)-decano, 1,6-bis{1-metil-3-(cloruro de 2,2,6-trimetil-ciclohexil)-propildimetil-amonio}hexano o cloruro de triclobisonio, y el bis-cuat denominado CDQ por Buckman Brochures), y sales de amonio cuaternario poliméricas (incluye polionenos tales como poli[dicloruro de oxietil(en)dimetiliminio]etilen(dimetiliminio)etilen], dicloruro de poli[N-3-dimetilamonio]propil]N-[3-etilenoetilendimetilamonio]propil]urea, y alfa-4-[cloruro de 1-tris (2-hidroxi)etil]amonio).

El experto en la materia entenderá que estos son ejemplos de detergentes catiónicos y, basándose en la descripción de la presente invención, está claro que estos también serán adecuados en la presente invención.

En una realización aún más preferida, en la presente invención se usan sales de dialquildimetilamonio tales como bromuro de domifeno (DB). Aunque se puede usar un gran número de detergentes catiónicos potenciales para practicar la presente invención, el bromuro de domifeno es de particular interés debido principalmente a su disponibilidad como materia prima de calidad GMP y su uso actual en otros productos destinados al uso humano. Más específicamente, dado que el bromuro de domifeno se usa ampliamente como ingrediente activo en productos de higiene oral, así como en cremas antibióticas tópicas, esta molécula se produce en grandes cantidades y se

libera en condiciones de cGMP.

En otra realización preferida, los detergentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención son detergentes aniónicos que incluyen, pero no se limitan a, sulfonatos de alquilo tales como hidrato de taurodeoxicolato de sodio (STH), sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, 1-decanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio y hexanosulfonato de sodio; y alquilsulfatos tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), dodecil sulfato de litio y octil sulfato de sodio; y cualquier mezcla correspondiente de los mismos.

En otra realización preferida, los detergentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención son detergentes zwitteriónicos que incluyen, pero no se limitan a, 3-(N, N-dimetilmistilamonio)propanosulfonato (SB3-14), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propansulfonato (CHAPSO), 3-(N,N-dimetiloctilamonio)propanosulfonato sal interior (SB3-8), 3-[N,N-dimetil (3-palmitoilaminopropil)amonio]propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato (SB3-18), amidosulfobetaina-14; 3-[N,N-dimetil(3-miristoilaminopropil)amonio]propanosulfonato (ASB-14) y N,N-dimetildodecilamina N-óxido (DDAO); y cualesquier mezcla correspondiente de los mismos. En otra realización preferida, los detergentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención son detergentes no iónicos que incluyen, sin limitación, éteres de poli(oxietileno) tales como 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton® X-100), polietilenglicol hexadeciléter (Brij® 58), monooleato de polietilenglicol sorbitán (Tween®80), (1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol (Triton® X-114), monolaurato de polioxietilensorbitan (Tween®20), dodecil éter de polietilenglicol (Thesit®); detergentes glucosídicos como decil-β-D-1-tiomaltopiranosido (DTP), 6-ciclohexilhexil β-D-maltósido (Cymal-6), decil-β-D-1-tioglucopiranosido, n-dodecil β-D-maltósido (DDM), octil β-D-glucopiranosido (OGP), octil β-D-1-tioglucopiranosido; ácidos biliares tales como N,N-Bis[3-(D-gluconamido)propil] desoxicolamida (desoxi-BigCHAP); y cualquier mezcla correspondiente de los mismos.

La concentración apropiada de detergente para tratar un poliovirus que contiene una suspensión de alta densidad celular que comprende una densidad celular que oscila entre 10×10^6 y 150×10^6 células/ml varía entre aproximadamente 1 mM y 12 mM. La concentración adecuada de DB para tratar una suspensión de alta densidad celular que contiene poliovirus que comprende una densidad celular que varía entre 10×10^6 y 50×10^6 células/ml varía entre aproximadamente 1 mM y 4 mM. La concentración adecuada de DB para tratar una cosecha de suspensión de alta densidad celular que contiene poliovirus que comprende una densidad celular que oscila entre 10×10^6 y 30×10^6 células/ml varía entre aproximadamente 1 y 3 mM.

El experto en la técnica tendrá la posibilidad de probar los sustitutos potenciales de los detergentes descritos en este documento para identificar un compuesto que aumente efectivamente la liberación de poliovirus de las células, mientras que puede precipitar aún más las moléculas de ácido nucleico y otros restos celulares de las partículas de poliovirus como se ejemplifica en este documento para bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), cloruro de hexadecilpiridinio (CPC), cloruro de bencetonio (BTC) y bromuro de domifeno (DB) y al mismo tiempo precipita eficazmente las moléculas de ácido nucleico y otros residuos celulares de las partículas de poliovirus.

Por lo tanto, esta presente invención se refiere en parte a métodos para purificar partículas de poliovirus de una suspensión de alta densidad celular al tiempo que mejora simultáneamente la recuperación del virus. Dichos métodos mejoran la liberación de partículas de poliovirus y al mismo tiempo resultan en la precipitación selectiva de las moléculas de ácido nucleico de la célula huésped de las partículas de poliovirus agregando un detergente a la cosecha de cultivo de células en bruto.

Métodos de clarificación

La cosecha de cultivo celular en bruto tratada con un detergente se clarifica posteriormente para eliminar células enteras, ADN de células huésped precipitadas, residuos celulares y otras impurezas. Dicha clarificación se puede realizar por filtración profunda. También es factible la centrifugación con o sin filtración de profundidad de pulido. Por lo tanto, la clarificación de la cosecha tratada con detergente se puede realizar utilizando la centrifugación sola o la centrifugación en tándem con una etapa de clarificación de pulido, como la filtración profunda.

En la elección de un filtro o esquema de filtro, se prefiere garantizar un rendimiento robusto en el caso de que se produzcan cambios o variaciones posteriormente. El mantenimiento del equilibrio entre el buen rendimiento de clarificación y los rendimientos por pasos se puede investigar probando una variedad de tipos de filtros con diferentes medios internos. Los filtros adecuados pueden utilizar filtros de celulosa, fibras de celulosa regenerada, fibras de celulosa combinadas con ayudas de filtración inorgánicas (por ejemplo, tierra de diatomeas, perlita, sílice pirógena), fibras de celulosa combinadas con ayudas inorgánicas y resinas orgánicas, o cualquier combinación de las mismas, y filtros de polímeros (los ejemplos incluyen pero no se limitan a nailon, polipropileno, polietersulfona) para lograr una eliminación efectiva y una recuperación de virus aceptable. En general, un proceso de múltiples etapas es preferible pero no requerido. Un ejemplo de proceso de dos o tres etapas consistiría en uno o más filtros gruesos para eliminar el precipitado grande y los residuos celulares, seguido del pulido de los filtros de la segunda etapa con tamaños de poros nominales superiores a $0,2 \mu\text{m}$ pero menores que $1 \mu\text{m}$. La combinación óptima será una función de la distribución del tamaño del precipitado, así como otras variables. Además, las operaciones de una sola etapa que emplean un filtro o centrifugación relativamente estrechos también pueden producir un producto de

buena calidad. Más generalmente, cualquier enfoque de clarificación que incluya filtración de punto muerto, microfiltración, centrifugación o alimentación corporal de ayudas de filtración (por ejemplo, tierra de diatomeas) en combinación con la filtración de punto muerto o de profundidad, que proporciona un filtrado de claridad adecuada para no ensuciar la membrana y/o la resina en la siguiente etapa, será aceptable para la práctica dentro de la presente invención. La filtración en profundidad muestra un método robusto de clarificación primaria para la presente invención.

En otra realización preferida de acuerdo con la presente invención, se puede integrar una membrana de intercambio aniónico en línea con el tren de filtro de clarificación para eliminar aún más el nivel residual de ADN o impurezas cargadas negativamente, como las proteínas de la célula huésped sin pérdida de poliovirus bajo condiciones fisiológicas. Se sabe que estas membranas de alta capacidad con poros grandes ($> 3 \mu\text{m}$) eliminan de manera efectiva los contaminantes con carga negativa como el ADN residual, las proteínas de la célula huésped y/o los virus adventicios en, por ejemplo, el campo de producción de anticuerpos monoclonales. Las membranas adecuadas son, entre otras, membranas de intercambio aniónico fuertes con ligando cargado positivamente, típicamente amonio cuaternario unido a, por ejemplo, una matriz de celulosa reticulada. Sorprendentemente, se encontró que aunque típicamente los virus se unen a estas membranas en condiciones fisiológicas (pH 7-8, conductividad 15-18 mS/cm), el poliovirus con un punto isoeléctrico neto más alto fluye a través de estas membranas, lo que lo convierte en una opción adecuada para la eliminación de impurezas con carga negativa. En ciertas realizaciones, se pueden usar resinas basadas en perlas cromatográficas, pero debido a la ventaja de los altos flujos convectivos, las membranas son la opción preferida.

La combinación del tratamiento con detergente y las etapas de clarificación dan como resultado una reducción en el ADN de la célula huésped de al menos $4 \log_{10}$, preferiblemente de al menos $5 \log_{10}$, o incluso más preferiblemente de al menos $5,5 \log_{10}$. La acumulación de presión general en toda la configuración del filtro se mantuvo por debajo de 0,8 bar, lo que es indicativo para los expertos en la técnica de que los tipos de filtros se han seleccionado y dimensionado adecuadamente.

En una realización preferida, una membrana de intercambio aniónico puede integrarse en el tren de filtro de clarificación, eliminando la necesidad de un paso de intercambio aniónico dedicado que está presente en todos los procesos de fabricación de virus de polio actualmente conocidos.

En realizaciones preferidas de la invención, las partículas de virus recogidas se tratan mediante el flujo del proceso de clarificación de múltiples etapas que incluye (en el siguiente orden); filtración profunda a través de una unidad de filtro cargada (p. ej., un filtro Millipore Millistak DOHC), filtro de membrana doble de $0,8 \mu\text{m}/0,45 \mu\text{m}$ (por ejemplo, Sartopore 2), una membrana de adsorción de intercambio aniónico fuerte (p. ej., Sartorius Single Sep Q) y una filtración de membrana estéril con tamaño de poro relativamente pequeño (por ejemplo, unidades de filtro de $0,22 \mu\text{m}$).

Pasos para una purificación posterior.

Después de la clarificación, la concentración de la suspensión de partículas de virus clarificada se puede considerar como un paso adicional en el método de acuerdo con la presente invención, pero de ninguna manera es esencial. La concentración de la suspensión de partículas víricas se puede realizar mediante ultrafiltración. La suspensión puede concentrarse de 5 a 20 veces (y posiblemente tratarse con nucleasa, como se menciona aquí más adelante). La membrana de ultrafiltración particular seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño para retener las partículas de virus, pero lo suficientemente grande para eliminar las impurezas de manera efectiva. Dependiendo del fabricante y del tipo de membrana, pueden ser apropiados cortes de peso molecular nominal entre 10 y 1000 kDa. La elección del límite de tamaño molecular está dictada por las compensaciones entre el rendimiento y la eliminación de impurezas. Se prefiere la ultrafiltración utilizando el modo de flujo tangencial. En dicho modo, la etapa puede controlarse estableciendo un flujo cruzado fijo con o sin contrapresión en el retenido, estableciendo una presión de transmembrana fija, o fijando tanto el flujo cruzado como el flujo de permeado.

Otra etapa del proceso que puede incluirse en esta etapa del proceso, pero que de ninguna manera es esencial, es la introducción subsiguiente de una etapa del proceso de intercambio de tampón a través de diafiltración. La diafiltración, o intercambio de tampón, utilizando unidades de ultrafiltración se utiliza para la eliminación e intercambio de sales, azúcares y similares. El experto en la materia sabe en qué condiciones debe tener lugar el intercambio de tampones y qué tampones son apropiados para este paso.

El tratamiento con nucleasa también puede considerarse para su inclusión en el proceso en esta etapa del proceso, pero de ninguna manera es esencial. El tratamiento con nucleasas puede incluir el uso de un amplio espectro de nucleasas, por ejemplo, BENZONASE™, una ADNasa, una ARNasa o cualquier combinación de las mismas. Una nucleasa o cóctel con actividad tanto ARNasa como ADNasa se utiliza a menudo. Se puede contemplar una etapa de tratamiento con nucleasa en cualquier punto del proceso, siempre que el contenido de nucleasa residual en el producto final sea aceptable para la aplicación. El tratamiento con nucleasa puede ocurrir después de la clarificación solo o después de la clarificación y una etapa de concentración, pero antes de una etapa de purificación adicional, como una etapa de captura o pulido.

Una unidad de operación adicional que se puede usar para la reducción de impurezas podría ser, por ejemplo, una unidad de cromatografía, pero de ninguna manera es esencial para el proceso. Se puede utilizar la unidad de cromatografía que consiste en medios de cromatografía en diferentes formatos, como resinas, adsorbentes de membrana y monolitos. La(s) operación(es) de la unidad de cromatografía se pueden accionar en modo positivo o negativo (se explica a continuación). En ciertas realizaciones de la invención, la suspensión de partículas de virus alimentada a la(s) unidad(es) de cromatografía puede ajustarse a ciertas condiciones de alimentación, como por ejemplo pH y/o fuerza iónica de la solución. Durante dicha etapa, las partículas de virus se purifican adicionalmente separando las partículas de virus de las impurezas restantes como, por ejemplo, ácidos nucleicos de la célula huésped y proteínas de la célula huésped. La purificación de partículas de virus durante dicha etapa se puede lograr, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa, cromatografía hidrófoba, cromatografía de modo mixto y/o cromatografía de hidroxiapatita se utilizan como una etapa de proceso independiente o en una combinación con varias etapas de proceso.

En ciertas realizaciones de la presente invención, cuando se usan una o más operaciones de unidad de cromatografía, las partículas de virus se pueden purificar separándolas de las impurezas restantes en la suspensión de partículas de virus. Las partículas de virus se pueden separar uniéndolas a las partículas de virus en ciertas condiciones al medio de cromatografía, mientras que algunas, si no la mayoría de las impurezas, no están unidas al medio de cromatografía. De lo contrario, las partículas de virus se pueden separar uniéndolas a algunas, si no la mayoría de las impurezas, al medio de cromatografía, dejando la mayoría de las partículas de virus sin unir al medio de cromatografía. Los modos operativos mencionados anteriormente son conocidos en la técnica como modo de enlace positivo y modo de enlace negativo, respectivamente.

También es posible operar ciertas operaciones de unidad de cromatografía sin ninguna interacción de unión dependiendo de los medios de cromatografía utilizados. Los medios de cromatografía a modo de ejemplo pueden ser, pero de ningún modo están limitados a, medios de cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, Sepharose™ 6FF). El experto en la materia sabe cómo determinar las condiciones requeridas para separar las partículas de virus de las impurezas. Los ejemplos del uso secuencial de diferentes operaciones de unidad para lograr soluciones de virus de poliomielitis altamente purificadas como se describe anteriormente en la literatura, por ejemplo en Bakker et al., 2011, y Thomassen et al., 2013.

En ciertas realizaciones de la invención, la(s) operación(es) de la unidad de cromatografía se pueden usar como la etapa de captura, que es en esencia una combinación de una etapa de concentración y purificación, eliminando con ello la necesidad de una etapa de concentración autónoma como se describe anteriormente (por ejemplo, un paso de ultrafiltración). Los medios de cromatografía en diferentes formatos se pueden utilizar en los pasos de captura. Ejemplos de formatos de medios de cromatografía son, entre otros, resinas, adsorbentes de membrana y monolitos. El experto en la materia puede determinar fácilmente el formato de medios de cromatografía óptimo que se utilizará para una etapa de proceso particular.

En ciertas realizaciones de la invención, cuando la(s) operación(es) de la unidad de cromatografía se usa como paso(s) de captura, las partículas de virus se pueden purificar separándolas de las impurezas restantes en la suspensión de partículas de virus. Las partículas de virus se pueden separar uniéndolas a las partículas de virus en ciertas condiciones a los medios de cromatografía, mientras que algunas, si no la mayoría, de las impurezas no están unidas a los medios de cromatografía.

En ciertas realizaciones de la invención, cuando la(s) operación(es) de la unidad de cromatografía se usa como paso(s) de captura, la suspensión de partículas de virus, también denominada material de alimentación, debe ajustarse a ciertas condiciones para una separación óptima de las impurezas. Las condiciones ejemplares del material de alimentación a ajustar son, por ejemplo, pH y fuerza iónica de la suspensión de partículas víricas. Las partículas de virus pueden purificarse aún más mediante la siguiente etapa de elución que se puede lograr, por ejemplo, cambiando el pH y/o la fuerza iónica de la fase líquida del medio de cromatografía.

En una realización particular de la invención, se usa un medio de cromatografía de intercambio catiónico como un paso de captura. Las condiciones del material de alimentación se pueden ajustar mediante la adición de ácidos o bases (por ejemplo, ácido cítrico, NaOH) para alcanzar el pH deseado y mediante la adición de soluciones salinas o agua desionizada (por ejemplo, NaCl o MilliQ) para alcanzar la fuerza iónica deseada. Como una guía y ciertamente no una limitación, el pH podría variar potencialmente desde alrededor de 4,5 a 7,0 y la fuerza iónica pueden oscilar entre 10 mS/cm y 25 mS/cm. Se puede considerar una etapa de clarificación adicional (por ejemplo, filtración de 0,45 μm o 0,22 μm) después del ajuste del material de alimentación para su inclusión en el proceso, a fin de reducir la carga en la siguiente etapa de cromatografía, pero de ninguna manera es esencial. El experto en la materia puede determinar fácilmente qué soluciones y unidades de filtración usar para el paso del proceso en particular.

En realizaciones particulares de la invención, cuando la(s) operación(es) de la unidad de cromatografía se usa como paso(s) de captura y donde las partículas de virus se unen selectivamente a medios de cromatografía de intercambio catiónico fuerte para la separación, se logra una purificación adicional de las partículas de virus mediante la

siguiente elución selectiva de las partículas de virus al cambiar las condiciones de la fase líquida dentro de la unidad de operación. Como una guía y ciertamente no una limitación, la elución de las partículas de virus se puede lograr cambiando el pH de la fase líquida de valores de pH ácidos a valores de pH básicos (por ejemplo, rangos entre pH 4 - 10). Como una guía y ciertamente no una limitación, la elución de las partículas de virus también se puede lograr cambiando la fuerza iónica de la fase líquida de menor a mayor fuerza iónica (por ejemplo, un rango entre 10 mS/cm - 35 mS/cm).

En una realización preferida de la invención, una suspensión de partículas de poliovirus, también denominada material de alimentación, se ajusta a un pH ácido que varía de 4,4 a 5,6 y una fuerza iónica que varía de 14mS/cm a 22mS/cm. Posteriormente, el material de alimentación ajustado se carga en un adsorbente de membrana de cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, Sartobind S) donde el virus se une selectivamente a la membrana. Las partículas de virus se purifican aún más a partir de las impurezas en la siguiente etapa de elución al aumentar la fuerza iónica del tampón de elución en el rango entre 25 mS/cm - 40 mS/cm mientras se mantiene el rango de pH constante entre 4,4-5,6. La suspensión de partículas víricas eluidas se puede filtrar posteriormente a través de, por ejemplo, una unidad de filtración de 0,22 µm para reducir la carga biológica y los precipitantes.

De acuerdo con la presente invención, si es necesario para lograr una cierta pureza del producto, se puede incorporar al proceso una etapa de purificación adicional, llamada etapa de "pulido". El paso de "pulido" no es de ninguna manera esencial en todo el flujo del proceso de purificación, pero es un paso del proceso preferido para lograr la solidez en todo el flujo del proceso de purificación.

Durante dicha etapa, se desea eliminar trazas de impurezas tales como, por ejemplo, pero no se limita a, ácidos nucleicos de la célula huésped (por ejemplo, ADN) y proteínas de la célula huésped de la suspensión de partículas del virus. La etapa de "pulido" se puede lograr mediante, pero no se limita a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de fase inversa, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de modo mixto, cromatografía de hidroxiapatita y/o ultrafiltración, ya sea como una operación independiente, paso del proceso o en una combinación de varios pasos del proceso. Durante dicho paso, el intercambio de soluciones tampón de la suspensión de virus se puede considerar para su inclusión en el flujo del proceso, pero de ninguna manera es esencial.

En ciertas realizaciones de la invención, cuando la(s) operación(es) de la unidad de cromatografía se usa como paso(s) de pulido, se pueden medios de cromatografía en diferentes formatos como, por ejemplo, resinas, adsorbentes de membrana y monolitos. La(s) operación(es) de la unidad de cromatografía pueden operarse en modo positivo o negativo. En ciertas realizaciones de la invención, la suspensión de partículas víricas alimentada a la(s) etapa(s) de pulido se puede ajustar a ciertas condiciones de alimentación, como por ejemplo pH y/o fuerza iónica de la solución. Las partículas de virus se pueden purificar mediante una etapa de elución posterior que se puede lograr, por ejemplo, cambiando el pH y/o la fuerza iónica de la fase líquida del medio de cromatografía.

En realizaciones particulares de la invención, la purificación de partículas de virus también se puede lograr mediante la explotación de las diferencias de tamaño entre las partículas de virus y las impurezas. Los pasos de proceso ejemplares pueden ser cromatografía de exclusión por tamaño y/o ultrafiltración.

En realizaciones particulares de la invención, las etapas de pulido pueden, además de purificar las partículas de virus, usarse como etapas de intercambio de tampón. Los pasos de proceso ejemplares pueden ser, pero de ninguna manera se limitan a, cromatografía de exclusión por tamaño y/o diafiltración.

En realizaciones particulares de la invención, donde se incorporan etapas de ultrafiltración/diafiltración, la eliminación de las impurezas residuales (por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ácidos nucleicos de la célula huésped), así como el intercambio del tampón con el tampón deseado (por ejemplo, el tampón de formulación) puede ser logrado. La ultrafiltración de flujo tangencial es útil para eliminar la proteína residual y el ácido nucleico y para intercambiar las partículas de virus en un tampón de formulación. La membrana de ultrafiltración seleccionada será de un tamaño suficientemente pequeño para retener partículas de virus, pero lo suficientemente grande para clarificar las impurezas. De acuerdo con el fabricante y el tipo de membrana, pueden ser apropiados valores de corte de peso molecular nominal entre 100 y 1000 kDa.

En realizaciones preferidas de la invención, las partículas de virus pueden separarse de las impurezas residuales mediante cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, Sepharose™ 6FF) mientras que simultáneamente el tampón se intercambia por un tampón de formulación. Los niveles deseados de pureza de partículas víricas, así como la calidad del intercambio de tampón, se pueden lograr alterando varias variables de la unidad de cromatografía de exclusión de tamaño. El experto en la materia puede determinar las condiciones óptimas de funcionamiento para lograr las especificaciones de rendimiento de proceso y pureza requeridas.

Un método particularmente preferido para obtener poliovirus purificado a partir de cultivo celular de acuerdo con la invención comprende las etapas de: a) añadir un detergente al cultivo celular; b) clarificar dicho cultivo celular que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus; c) someter la cosecha clarificada obtenida en la etapa b) a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico para obtener una

suspensión que contiene poliovirus; y d) purificar adicionalmente el poliovirus de la suspensión que contiene poliovirus mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

5 Se puede incluir una etapa de filtración estéril al final del proceso para reducir la carga biológica, tal etapa no es de ninguna manera esencial. El producto se puede filtrar a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno modificado (PVDF) de 0,22 μm (por ejemplo, Millipore Millipak).

Escalado de sistemas de cultivo celular y sistemas de procesamiento posteriores.

10 Los procesos de la presente invención son escalables. Los cultivos celulares para los cuales se puede usar la presente invención van desde cultivos a pequeña escala (por ejemplo, tiradas de 1 a 10 litros) hasta cortes de mediana escala (por ejemplo, tiradas de 20-1000 L) hasta preparaciones a gran escala comercial, como tiradas de producción entre 1000 y 50.000 L. Los pasos del proceso inicial, como la escala de filtración profunda con el volumen de cultivo, mientras que la cromatografía de intercambio catiónico o la etapa de captura alternativa y los
15 pasos subsiguientes se escalan con la cantidad de partículas de poliovirus. Por lo tanto, el tamaño del lote de los últimos pasos se basará en una estimación de la productividad del bioreactor de al menos 5×10^9 DICT50/ml y hasta aproximadamente 1×10^{11} DICT50/ml. Estos altos rendimientos de poliovirus se pueden obtener, por ejemplo, infectando cultivos de alta densidad celular (como se describe, por ejemplo, en el documento WO2011/006823). La purificación adicional de estas suspensiones celulares de alta densidad que contienen altas concentraciones de
20 partículas de poliovirus se hace posible con la presente invención. La posibilidad de procesar estas suspensiones, que contienen altas cantidades de residuos celulares e impurezas de las células huésped, permite la purificación de altas cantidades de partículas de poliovirus por volumen de suspensión. Es un mérito de esta invención proporcionar un método para procesar lotes de cultivos celulares con altas densidades celulares, que contengan altas concentraciones de partículas de poliovirus y, por lo tanto, permitan rendimientos de virus muy altos por volumen
25 procesado. El presente método, aunque es aplicable a cultivos celulares a gran escala, permitirá que las células se cultiven a una escala más pequeña, aún a densidades celulares más altas y todavía alcancen altos rendimientos de poliovirus que pueden procesarse de manera eficiente. Este método ofrece la posibilidad de procesar lotes de poliovirus altamente concentrados que tendrán un gran impacto en toda la industria de purificación de poliovirus.

30 Poliovirus y células productoras.

Una vacuna contra la polio puede ser monovalente, que contiene un tipo de poliovirus (tipo 1, 2 o 3), o divalente (que contiene dos tipos de poliovirus, por ejemplo, los tipos 1 y 2, 1 y 3 o 2 y 3), o trivalente (contiene tres tipos de poliovirus, es decir, los tipos 1, 2 y 3).

35 Es posible producir IPV a partir de poliovirus de tipo salvaje. Alternativamente, la IPV puede producirse a partir de poliovirus vivo no virulento, por ejemplo, de las cepas Sabin, lo que reduciría aún más el riesgo de reintroducir el poliovirus de tipo salvaje de la fabricación de IPV (véase, por ejemplo, el documento WO2007/007344, y Doi et al, 2001). La presente invención es adecuada para la purificación de poliovirus de tipo salvaje (tipos 1, 2 y 3, por
40 ejemplo, la cepa Mahoney tipo 1, la cepa MEF-1 tipo 2 o la cepa Saukett de tipo 3), así como de tipos no virulentos de poliovirus (por ejemplo, las cepas de Sabin). Los procesos de acuerdo con la invención aplicados para producir IPV pueden servir para reducir el costo hasta tal punto que la IPV puede estar disponible para los países menos desarrollados. Aunque en general, la OPV es más barata que la IPV cuando se prepara de acuerdo con métodos convencionales, los procesos altamente eficientes de la invención aún pueden reducir los costos de la masa de
45 material para la OPV y, por lo tanto, reducir los costos de los mismos.

En general, cada una de las cepas de poliovirus se cultiva en un lote separado, y si, por ejemplo, se prepara una vacuna trivalente que contiene tres tipos de poliovirus, los virus (inactivados, para IPV) se mezclan y se formulan para la preparación de dosis individuales. En ciertas realizaciones, por ejemplo, una vacuna final por dosis (por
50 ejemplo, 0,5 ml) puede comprender, por ejemplo, 40 unidades de antígeno D (UD) de poliovirus tipo 1, 8 UD de poliovirus tipo 2 y 32 UD de poliovirus tipo 3, determinadas por comparación a las preparaciones de referencia.

El método de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a la cosecha de cultivos celulares a partir de distintos tipos de células. Un tipo de células que se pueden usar en los métodos de la presente invención son las
55 células PER.C6, que son células inmortalizadas, también conocidas en la técnica como líneas celulares continuas, y como tales tienen el potencial de una vida útil infinita (véase, por ejemplo, Barrett et al, 2009). Las células PER.C6 para los fines de la presente solicitud significarán las células depositadas bajo ECACC no. 9602240 el 29 de febrero de 1996. Estará claro para la persona experta que esta definición incluirá las células de un pase anterior o posterior o un descendiente de un pase previo o posterior de estas células depositadas. Las células PER.C6 se describen en
60 la patente de EE. UU. 5.994.128 y en (Fallaux et al, 1998). Estas células son muy adecuadas para la producción de poliovirus para producir vacunas contra poliovirus basadas en células, ya que pueden infectarse y propagar el virus con alta eficiencia, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2011/006823. Aquí se demuestra que estas células también son muy adecuadas para la producción de poliovirus a niveles altos en cultivos en suspensión sin suero.

65 Como pueden usarse otros tipos de células para propagar poliovirus, los métodos de la presente invención también

son aplicables para procesar cosechas de células en bruto que contienen poliovirus que comprenden otros tipos de células. Como se ejemplifica en este documento, las cosechas de células Vero y células MRC-5 se procesaron con los métodos de la presente invención.

5 Para la fabricación a gran escala de poliovacunas inactivadas, el poliovirus generalmente se propaga en células Vero adherentes, que derivan de células de monos. Las células Vero, que se cultivan en microtransportadores, se usan ampliamente para la producción de vacunas, incluidas las poliovacunas inactivadas y las poliovacunas vivas atenuadas, y hasta ahora son las líneas celulares continuas más aceptadas por las autoridades reguladoras para la fabricación de vacunas virales y los expertos en la materia esperan que el uso de estas células para la producción de vacunas aumente (Barrett et al, 2009). Montagnon et al., 1982 y 1984, describieron un cultivo de microtransportadores a gran escala de células Vero para la vacuna contra el poliovirus inactivado. En la patente de los Estados Unidos 4.525.349 también se describe un proceso para la producción a gran escala de una poliovacuna con células Vero y la vacuna resultante.

15 Se han obtenido altos títulos de producción de poliovirus (Sabin tipo 1) (casi 2×10^9 DICT50/ml) en células Vero cultivadas en microtransportadores en medio que contiene suero antes de la fase de producción del virus que tuvo lugar en medio sin suero (Merten et al., 1997). En vista de las desventajas de usar suero, los autores han indicado que se desea un proceso completamente libre de suero. Bajo condiciones de ausencia de suero, los autores pudieron obtener un título de producción de poliovirus de $6,3 \times 10^8$ DICT50/ml. Los títulos de producción de poliovirus obtenidos por el método de la presente invención en células PER.C6 oscilaron entre $5,0 \times 10^9$ y $3,2 \times 10^{10}$ DICT50/ml (a una densidad celular a una infección de 12,5 millones/ml).

25 Una plataforma celular alternativa utilizada comúnmente para la producción de vacunas en general, y la producción de IPV en particular son células de fibroblastos de pulmón fetales humanas (células MRC-5) iniciadas por J.B. Jacobs, 1966. Un estudio de comparación de líneas de células huésped (Vlecken et al., 2013) demostraron que las líneas celulares adherentes MRC-5 y VERO son los productores más altos entre un panel de células huésped extendido, lo que las hace adecuadas para la producción de vacunas virales. Usando cultivos adherentes en la superficie del matraz, los títulos de virus logrados fueron $(0,7-2,6) \times 10^6$ DICT50/ml y $(1,4-5,8) \times 10^6$ DICT50/ml para cultivos de células MRC-5 y Vero, respectivamente.

30 Los métodos de purificación de la invención son adecuados para poliovirus propagado en cualquier tipo de célula susceptible de propagación de poliovirus, es decir, los métodos de la invención son independientes del tipo de célula usado para cultivar poliovirus.

35 La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no limitan la invención de ninguna manera. Simplemente sirven para aclarar la invención.

Ejemplos

40 Ejemplo 1: Aumento del rendimiento de purificación de poliovirus a partir de la cosecha de cultivo celular en bruto que contiene poliovirus mediante la adición de un detergente catiónico.

45 Las células, de la línea celular PER.C6, se hicieron crecer en un medio de cultivo libre de suero en un bioreactor de 10 l operado en modo de perfusión a una densidad celular de aproximadamente 50×10^6 células viables/ml (cv/ml). Antes de la infección con poliovirus tipo 1 (Mahoney), tipo 2 (MEF-1) o tipo 3 (Saukett), el cultivo se diluyó con medio de cultivo fresco a densidad celular viable en el rango entre $12,5 \times 10^6$ y 50×10^6 cv/mL. El proceso de infección por lotes tuvo lugar en bioreactores de 10 L a 35 °C, a una multiplicidad de infección de 1. En el momento de la cosecha, 20-24 horas después de la infección, se tomó una muestra de 50 ml que se distribuyó posteriormente en 11 alícuotas de 4 ml.

50 Para determinar el efecto de un detergente en las cosechas de cultivos celulares que contienen poliovirus, se realizó un experimento de valoración con bromuro de domifeno (DB). Se añadió una cantidad discreta de solución madre de DB a las alícuotas de la muestra a una concentración de DB diana (entre 0 y 4 mM). Las muestras se mezclaron y se incubaron durante una hora a 35 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g para depositar el ADN precipitado. Las muestras de sobrenadante se analizaron para determinar la cantidad de virus mediante ELISA de antígeno D y para el ADN de la célula huésped mediante Q-PCR.

55 La Fig. 1 (A, B y C) muestra la liberación de antígeno D de cosechas de cultivos celulares que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con un detergente (DB). Varias cosechas con distintas densidades celulares y cada una con una cepa de polio diferente (Mahoney, MEF-1 o Saukett) se trataron con un detergente y luego se centrifugaron. La concentración de antígeno D en el sobrenadante, que se corrige por la dilución de detergente añadido, se da en función de la concentración de detergente. La figura 1 muestra que después de la adición de un detergente (DB), el título del virus aumentó sustancialmente en comparación con antes de la adición de un detergente (DB). Para cada cepa y para cada densidad celular viable, se puede observar el mismo patrón, es decir, aumentar la concentración de detergente (DB) conduce a una mayor liberación de virus de la cosecha de células en bruto en la fase líquida.

La Fig. 2 (A, B y C) muestra la precipitación del ADN de la célula huésped en cosechas de cultivos de células en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con un detergente (bromuro de domifeno). Las concentraciones en el eje y, se han corregido por el factor de dilución del detergente. Para cada cepa y para cada densidad celular viable, el ADN de la célula huésped se precipita a partir de la recolección del cultivo celular en bruto. La Fig. 2 indica claramente que se produjo una clarificación efectiva del ADN en las alícuotas para concentraciones de detergente (DB) por encima de 1,3 mM.

Además, se podría determinar una concentración mínima de DB a partir de cada curva individual (Fig. 1 y 2), para lo cual se obtiene un nivel de meseta de antígeno D y, al mismo tiempo, se obtiene la máxima clarificación del ADN. Esta cantidad mínima de detergente aumenta con la densidad celular para adaptarse a mayores cantidades de células y un mayor nivel de ADN de la célula huésped soluble en el medio.

Como el aumento de detergente no condujo a la precipitación del poliovirus, una persona experta en la técnica extrapolaría estos resultados a suspensiones celulares que contienen poliovirus de densidades celulares incluso superiores, por ejemplo, de aproximadamente 70×10^6 células/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 120×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 150×10^6 células/ml. El experto en la materia concluiría que el poliovirus de tales cosechas de cultivos celulares en bruto de alta densidad celular puede purificarse mediante los métodos de la presente invención.

Ejemplo 2: Eficacia del tratamiento con detergente en la liberación de poliovirus de las cosechas de cultivos celulares VERO y MRC5 en bruto

Tratamiento de una cosecha de poliovirus en bruto de un cultivo de células VERO adherentes

Las células Vero se cultivaron previamente en matraces T-175 y se escalaron para inocular un matraz giratorio de 1 L Cytodex 3, a 30×10^3 células/cm² en medio giratorio VERO (MEM + FBS al 10% + Glutamina 6 mM + glucosa 4,6 g/L) y microtransportadores Cytodex3 5 g/L. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5% y se agitaron a 60 rpm durante las primeras 24 horas y a 90 rpm durante los días siguientes. En el día 3 después de la siembra (en microtransportadores), las células se lavaron con PBS precalentado y se realizó un cambio de medio con medio de infección (MEM + glutamina 4 mM). El cultivo celular recargado se distribuyó en tubos de 50 ml que contenían 20 ml de cultivo celular sembrados a 1×10^6 células/ml. Los tubos se infectaron para cada una de las tres cepas de virus (Mahoney, MEF-1, Saukett) con una MOI de 1. La infección se realizó a 35 °C, 170 rpm, CO₂ 5% y el virus se recogió 72 horas después de la infección. Con el fin de determinar el efecto de un detergente sobre las células VERO en bruto que contienen poliovirus, los cultivos crecieron en microtransportadores, se añadió una solución de DB en los cultivos a una concentración final de 1,6 mM. Para este experimento, se utilizó una solución madre de DB (1,05% p/v, NaCl 40 mM). Las muestras se mezclaron y se incubaron durante una hora a 35 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g para reducir el ADN precipitado. Las muestras de sobrenadante se analizaron para determinar la cantidad de virus mediante ELISA de antígeno D y para el ADN de la célula huésped mediante Q-PCR.

Tratamiento de una cosecha de poliovirus en bruto de un cultivo de células MRC5 adherente

Las células MRC-5 se cultivaron en BME + FBS al 10% (nHI) + glutamina 4 mM y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 10% en un matraz T75. Cada 3-4 días, cuando los cultivos estaban aproximadamente confluentes en un 80-90%, los cultivos de MRC-5 se pasaron y se expandieron en matraces T-175. Cuando las células alcanzaron una densidad de aproximadamente 80-90% (día 4), las células se lavaron con PBS y se realizó un cambio de medio con BME + glutamina 4 mM. Los matraces T-175 se infectaron para cada una de las tres cepas de virus (Mahoney, MEF-1, Saukett) con una MOI de 1, en un volumen total de 25 ml por matraz. La infección se realizó a 35 °C, 10% de CO₂ y el virus se recolectó 72 horas después de la infección. Con el fin de determinar el efecto de un detergente en las cosechas de células adherentes de MRC5 en bruto que contienen poliovirus, se añadió una solución de stock de DB al cultivo a una concentración final de 0,6 mM. Las muestras se mezclaron y se incubaron durante una hora a 35 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g para reducir el ADN precipitado. Las muestras de sobrenadante se analizaron para determinar la cantidad de virus mediante ELISA de antígeno D y para el ADN de la célula huésped mediante Q-PCR.

Tabla 1: concentración de antígeno D en el sobrenadante de la cosecha de cultivos celulares [UD/ml]

Concentración de DB	Cultivo de células adherentes vero crecido en microtransportadores		Cultivo de células adherentes MRC-5 cultivado en matraces T-175	
	0 mM	1,6 mM	0 mM	0,6 mM
Tipo 1 (Mahoney)	153	160	30	36
Tipo 2 (MEF-1)	19	34	8	13
Tipo 3 (Saukett)	106	119	11	16

La tabla 1 muestra la concentración de antígeno D en el tratamiento con DB, a una concentración de DB de 1,6 mM para las cosechas de poliovirus de células VERO y de 0,6 mM para las cosechas de poliovirus de células MRC-5.

Las concentraciones de antígeno D en la tabla se corrigen para la dilución causada por la adición de detergente.

Los resultados muestran que la adición de detergente (DB) causó la liberación de virus adicionales en la fase líquida de las cosechas de cultivos de células VERO y MRC5, mientras que el ADN precipita lejos del virus. De hecho, la clarificación de ADN a DB 1,6 mM fue más de 2 log₁₀ en el cultivo de células VERO. La clarificación de ADN a DB 0,6 mM fue más de 3 log₁₀ en el cultivo de células MRC5 (datos no mostrados). Esto demuestra que la invención es aplicable a varios tipos de células usadas para la producción de poliovirus.

Ejemplo 3: Impacto del tratamiento con detergente en la liberación de poliovirus y la clarificación del ADN en un bioreactor antes de la clarificación celular.

Se cultivaron células PER.C6 en un medio de cultivo sin suero en un bioreactor de vidrio de 10 l operado en modo de perfusión a una densidad celular de aproximadamente 50x10⁶ cv/mL. Antes de la infección con poliovirus de tipo 1 (Mahoney), tipo 2 (MEF-1) o tipo 3 (Saukett), el cultivo se diluyó con medio de cultivo fresco hasta una densidad celular viable de 12,5x10⁶ cv/mL. El proceso de infección por lotes tuvo lugar en bioreactores de 10 l a 35 °C a una multiplicidad de infección de 1. En el momento de la recolección, 20-24 horas después de la infección, se añadió una solución madre de bromuro de domifeno (DB) en 30 minutos mientras se agitaba hasta alcanzar una concentración final de DB de 2,2 mM. Después de la adición del detergente, se dejó incubar el bioreactor durante una hora a 35 °C, mientras se agitaba constantemente.

Las muestras de la recolección de células en bruto (sin tratamiento con DB y el tratamiento posterior a DB) se centrifugaron (3000 g, 5 minutos) para sedimentar las células. Las muestras en bruto (no centrifugadas antes del tratamiento con DB, que contienen células) y las muestras del sobrenadante se analizaron para determinar la cuantificación de poliovirus y el ADN de la célula huésped, utilizando un ELISA de antígeno D y Q-PCR respectivamente.

Los resultados representados en la Fig. 3 muestran que en todas las tiradas (para las tres cepas), el tratamiento con detergente dio como resultado un aumento doble de la liberación de antígeno D, desde la recolección del poliovirus bruto hasta la fase líquida. Además, el ADN fue efectivamente precipitado por el tratamiento con DB. En todas las tiradas, la clarificación de ADN con respecto a la recolección en bruto fue más de 5 log después del tratamiento con detergente, a diferencia de 2 log antes del tratamiento con detergente (no se muestran los datos). Esto demuestra que la invención también se puede usar a escala de bioreactor.

La adición de un detergente se había usado previamente para eliminar el ADN de la célula huésped en el campo de los procesos de purificación de adenovirus, como se describe en, por ejemplo, US7326555 y WO2011/045378. Sin embargo, la precipitación selectiva de ADN no se ha descrito hasta ahora en el campo de la purificación de poliovirus. Los poliovirus y los adenovirus son virus muy distintos. De hecho, un poliovirus está compuesto por un genoma de ARN monocatenario encapsulado con una cápside proteica y la partícula viral tiene un diámetro de aproximadamente 30 nanómetros. Por contra, los adenovirus representan los virus no envueltos más grandes, con un diámetro de aproximadamente 90-100 nm. La proteína de la cápside del adenovirus contiene una hélice de ADN de doble cadena y está poblada de forma única con fibras o picos que ayudan en la unión a la célula huésped que está ausente en los poliovirus. El punto isoelectrico de los adenovirus está alrededor de pH 5,5, lo que significa que el virus está cargado negativamente en condiciones fisiológicas. Un artículo de revisión sobre el punto isoelectrico del poliovirus sugiere que su valor es más alto que para los adenovirus pH 5,8-7,5 (Thomassen et al, 2013). Dado que el tamaño y la carga son determinantes clave en los procesos de cromatografía y precipitación, no se pudo predecir que el tratamiento con un detergente tendría un efecto similar en una cosecha de cultivo de células en bruto que contiene poliovirus como en una cosecha de cultivos de células en bruto que contiene adenovirus.

Más importante aún, el efecto inesperado del tratamiento con detergente sobre la liberación de partículas de poliovirus de la cosecha de cultivo celular en bruto en la fase líquida de la cosecha no se había observado en los métodos de purificación para adenovirus. Por lo tanto, este sorprendente efecto no podría haberse previsto en base a los métodos de purificación de virus utilizados anteriormente.

Ejemplo 4: Proceso de purificación de poliovirus con y sin tratamiento con detergente e impacto en la recuperación del antígeno D y la clarificación del ADN.

Las células PER.C6 se cultivaron en un medio de cultivo libre de suero en un bioreactor de 10 l operado en modo de perfusión a una densidad celular de aproximadamente 50x10⁶ cv/mL. Antes de la infección con poliovirus serotipo 1 (Mahoney) o tipo 3 (Saukett), el cultivo se diluyó con medio de cultivo fresco hasta una densidad celular viable de 11x10⁶ cv/mL y 9,5x10⁶ cv/mL, respectivamente. El proceso de infección por lotes tuvo lugar en bioreactores de 10 l a 35 °C a una multiplicidad de infección de 1. En el momento de la cosecha, 22 horas después de la infección, se tomaron dos muestras de 1,5 l de volumen del bioreactor y se transfirieron a botellas de 2 l. Se tomó una botella para realizar la filtración directa, la otra se trató con un detergente (DB) y posteriormente se sometió a filtración.

El tratamiento con DB se realizó en una botella de 2 l a temperatura ambiente. La solución de reserva de DB se agregó a través de una pipeta en 30 porciones iguales en 30 minutos mientras se agitaba para alcanzar una

5 concentración final de DB de 2,1 mM. Después de la adición del detergente, se dejó incubar la botella durante dos horas mientras se mezclaba. La clarificación celular se realizó pasando la cosecha bruta no tratada o la cosecha tratada con DB a través de una serie de filtros, es decir, un filtro de profundidad cargado positivamente (Millipore Millistak + HC POD DOHC) con una distribución de tamaño de poro de 4 - 8/0,6 - 1,5 μm , seguido de dos filtros de membrana de poliéter sulfón (PES) consecutivos de tamaño descendente 0,8/0,45 μm (Sartorius, Sartopore 2) y 0,22 μm (Millipore, Millipak). Durante la filtración, el primer filtrado recibido se desechó, luego el filtrado se recogió en una botella de producto hasta que la botella de alimentación estuvo vacía. La recuperación del virus se completó mediante la adición de 1 volumen del sistema de PBS al filtrado recogido. La cosecha clarificada se analizó para determinar la cantidad de virus, el ADN de la célula huésped y la HCP utilizando un ELISA de antígeno D, Q-PCR y una proteína ELISA específica de la célula huésped, respectivamente. El impacto del tratamiento con DB en el rendimiento del proceso de cosecha se muestra en la Tabla 2. La recuperación se calcula con respecto a una muestra de caldo completo tomada de la cosecha bruta en el momento de la recogida.

15 De acuerdo con los ejemplos anteriores, la recuperación del antígeno D después del tratamiento con un detergente (bromuro de domifeno) se incrementó significativamente en comparación con el proceso sin bromuro de domifeno. Como resultado, la productividad volumétrica del proceso se incrementó significativamente. De hecho, la concentración de antígeno D en la cosecha clarificada se duplicó después del tratamiento con detergente (DB).

20 Además, se observó la clarificación de HC-ADN mediante la etapa de tratamiento con detergente, que estaba de acuerdo con los resultados descritos en los ejemplos anteriores. De acuerdo con la tabla 2, el tratamiento de una cosecha de células en bruto que contiene poliovirus con un detergente (DB) ayudó a eliminar el ADN en un factor de 1000. Además, muestra que las proteínas de la célula huésped (HCP) se eliminaron parcialmente mediante el uso de detergente.

25 Tabla 2: Clarificación de la cosecha de 1,5 L de virus en bruto con (+) y sin (-) tratamiento con DB para dos cepas de virus.

Cepa	Mahoney		Saukett	
Densidad de células viables en la infección	11		9,5	
Tratamiento con DB	-	+	-	+
Cosecha clarificada				
Concentración de antígeno D (UD/ml)	1439	2977	510	1195
Concentración de HC-ADN (pg/ml)	1731	<0,4	702	<0,4
Concentración de HCP / $\mu\text{g/ml}$)	79	52	76	55
Recuperación de antígeno D de la cosecha (5)	57	110	52	122
Eliminación log de DNA	1,9	>5,5	2,1	>5,3
Eliminación de HCP (%)	25	54	38	55

30 Ejemplo 5: Tratamiento de DB como parte del proceso de fabricación de sustancias farmacéuticas en la vacuna contra el poliovirus inactivado (IPV)

Este ejemplo demuestra la purificación de los serotipos de poliovirus de tipo salvaje (Mahoney, MEF-1 y Saukett) de una cosecha de cultivo de células en bruto en una escala de 20L. Los pasos del proceso posterior involucrados se muestran en la Figura 3.

35 Las células PER.C6 se cultivaron en un medio de cultivo libre de suero en un bioreactor de 10 l operado en modo de perfusión a una densidad celular de aproximadamente 50×10^6 cv/mL. Antes de la infección con poliovirus serotipo 1 (Mahoney), tipo 2 (MEF-1) o tipo 3 (Saukett), el cultivo se dividió en tres bioreactores y se diluyó con medio de cultivo fresco a una densidad celular viable de 12×10^6 cv/mL, 11×10^6 cv/mL y 13×10^6 cv/mL respectivamente. El proceso de infección por lotes tuvo lugar en bioreactores de 10 l a 35 °C a una multiplicidad de infección de 1.

40 En el momento de la recolección, 23 horas después de la infección, se añadió solución madre de DB a los bioreactores durante un período de 30 minutos, hasta una concentración final de DB de 2,2 mM. Después de la adición del detergente, la cosecha tratada con DB se mezcló durante 60 min. Posteriormente, se realizó la clarificación pasando la cosecha tratada con DB a través de una serie de filtros, es decir, dos filtros Millistak DOHC POD de 8-4/1,5-0,6 μm en paralelo, seguidos de un filtro Sartopore 2 de 0,8/0,45 μm , un único filtro Sep Q y finalmente un filtro Millipak de 0,22 μm .

50 La cosecha clarificada de dos filtraciones se agrupó, se acidificó a pH 5,0 y se diluyó hasta una conductividad de 11 mS/cm y se filtró sobre un filtro de Sartorius Sartopore 0,8/0,45 μm antes de cargarlo en una membrana Sartorius Sartobind S. El virus se recuperó de la membrana por elución en etapas utilizando PBS. En la etapa final, la fracción de virus de intercambio catiónico (CEX) se cargó en una columna empaquetada con resina de cromatografía de exclusión de tamaño Sepharose 6FF con un rango de fraccionamiento de 10-4000 kDa. Durante la elución isocrática, los HCP residuales se separaron de la fracción de virus, y también la matriz del poliovirus se intercambié completamente a un tampón de fosfato que contenía NaCl.

Después de la purificación, la solución de virus purificada se diluyó adicionalmente con un tampón de elución SEC a una unidad de absorbancia predefinida (DO 260 nm), luego se agregaron M199 y glicina (concentración final 5 g/L) y el fluido se filtró en un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm antes de la inactivación con formaldehído.

La inactivación se realizó con formalina al 0,025% durante 13 días (con una filtración entre medias de 0,22 µm) a 37 °C de acuerdo con los requisitos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Farmacopea Europea (EP).

En el proceso descrito anteriormente, los intermediarios principales del producto, la cosecha bruta, la cosecha clarificada, el eluido de SEC y el virus de la polio inactivado (IPV) se analizaron para determinar la cantidad de virus, el ADN de la célula huésped y la proteína total (PT) utilizando un ELISA de antígeno D, Q-PCR y ensayo de Bradford respectivamente.

Resultados y discusión

La tabla 3 resume los atributos de calidad y los rendimientos de poliovirus purificado por serotipo. La concentración de ADN y proteína específica residual cumple con los requisitos reglamentarios (OMS/EP). Además, la relación de absorbancia DO260/DO280 es indicativa de virus altamente purificados (Westdijk et al., 2011). Finalmente, los geles de SDS-PAGE de los diferentes serotipos muestran cuatro bandas de proteínas principales correspondientes a las proteínas de superficie del poliovirus (Figura 5). Por lo tanto, el proceso de purificación descrito aquí es robusto para la purificación de los tres serotipos, independientemente de las diferencias en las propiedades superficiales de los serotipos y los títulos de virus en el momento de la recolección.

Tabla 3: Calidad del virus de la polio inactivado monovalente y el poliovirus purificado (eluito de SEC) para el proceso de fabricación del virus de la polio inactivado monovalente

Serotipos	virus de la polio inactivado monovalente			eluito de SEC	
	antígeno D (UD/mL)	TP/UD (µg/UD)	HC-ADN (pg/UD)	DO260/DO280 (-)	Pureza en el gel SDS-page
Mahoney	2014	0,008	< 0,2	1,67	VP1, VP2, VP3 y VP4 son las bandas principales (Ver Figura 5)
MEF-1	343	0,037	< 1,2	1,75	
Saukett	1201	0,012	< 0,3	1,71	

El rendimiento del proceso se evalúa en función de la eliminación de las impurezas de la célula huésped, el ADN y el HCP, así como los rendimientos por etapas para las diferentes etapas de producción. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Rendimiento del proceso de fabricación del virus de la polio inactivado monovalente

Etapa del proceso	Recuperación del antígeno D [%]			Eliminación de HCP [%]			Eliminación log de ADN		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Cosecha	86	77	101	40	51	42	> 5,6	> 5,6	> 5,5
Purificación	42	39	56	> 99,9	> 99,9	> 99,9	*	*	*
Inactivación	89	77	82	NA	NA	NA	NA	NA	NA
General	32	23	46	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 5,6	> 5,6	> 5,5

* No se pudo determinar la eliminación ya que la alimentación ya estaba por debajo del nivel de detección

Para los tres serotipos, los niveles de HC-ADN residual después de la etapa de clarificación están por debajo del límite de cuantificación. La Tabla 5 muestra la productividad general del poliovirus expresado en dosis equivalentes/ml de cultivo celular. Este cálculo se basa en una proporción de 40:8:32 de unidades de antígeno D/dosis para poliovirus de tipo 1-3. La comparación de la productividad final después de la inactivación muestra que este proceso supera la actual plataforma de proceso de células VERO para la fabricación de IPV en todo el mundo, que produce un cultivo de virus de 0,64, 1,04 y 0,34 dosis/ml para los tipos 1-3 respectivamente (Kreeftenberg, 2007). Por lo tanto, se puede concluir que a pesar del alto nivel de impureza inicial en la alimentación que se origina a partir de la cosecha de alta densidad celular, se desarrolló un proceso de alta resolución y alta recuperación, que produjo una productividad insuperablemente alta para la producción masiva de virus de polio inactivado monovalente como parte integral de la fabricación de vacunas IPV.

Tabla 5: Productividad del proceso de fabricación del virus de la polio inactivada monovalente de 20 L (nº dosis equivalentes/ml cultivo celular)

Producto intermedio	Tipo 1 (Mahoney)	Tipo 2 (MEF-1)	Tipo 3 (Saukett)
Cosecha en bruto	69	37	29
Cosecha clarificada	53	32	29
Cosecha purificada	22	12	16
Cantidad de virus de la polio inactivado	20	9,4	13

Ejemplo 6: Aumento de los rendimientos de la purificación de poliovirus de la cosecha de cultivo celular en bruto mediante la adición de diferentes detergentes catiónicos.

Las células PER.C6® se cultivaron en un medio de cultivo libre de suero en un bioreactor de 10 l operado en modo de perfusión a una densidad celular de aproximadamente 50×10^6 cv/mL. Antes de la infección con poliovirus de tipo 2 (MEF-1), el cultivo se diluyó con medio de cultivo fresco hasta una densidad celular viable de aproximadamente $12,5 \times 10^6$ cv/mL. El proceso de infección por lotes tuvo lugar en bioreactores de 10 l a 35 °C, a una multiplicidad de infección de 1. En el momento de la cosecha, 20-24 horas después de la infección, se tomó una muestra de 120 ml que se distribuyó posteriormente en 18 alícuotas de 5 ml.

Con el fin de determinar el efecto de un detergente sobre el cultivo de células en bruto que contiene poliovirus, se realizó un experimento de titulación con varios detergentes catiónicos; bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), cloruro de hexadecilpiridinio (CPC) y cloruro de bencetonio (BTC). Se añadió una cantidad fija de soluciones madre de CTAB, CPC y BTC (69, 70, 56 mM, respectivamente, todas con NaCl 40 mM) a las alícuotas de la cosecha a una concentración de detergente diana (entre 0 y 4 mM). Las muestras se mezclaron completamente y se incubaron durante una hora a 35 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g para depositar el ADN precipitado. Las muestras de sobrenadante se analizaron para determinar la cantidad de virus mediante ELISA de antígeno D y mediante Q-PCR para el ADN de la célula huésped.

La Fig. 6 (A) muestra la liberación de antígeno D a partir de cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con diferentes detergentes catiónicos; CTAB, CPC y BTC, respectivamente. Las concentraciones de antígeno D en el sobrenadante, que se corrigen para la dilución de adición de detergente, se describen en función de la concentración de detergente. La Fig. 6 (A) revela que después de la adición de un detergente (CTAB, CPC y BTC), el título del virus aumentó sustancialmente en comparación con antes de la adición de un detergente (CTAB, CPC y BTC). Para cada detergente catiónico, se puede observar el mismo patrón, es decir, aumentar la concentración de detergente (CTAB, CPC y BTC) conduce a una mayor liberación de virus de la cosecha de células en bruto en la fase líquida.

La Fig. 6 (B) muestra la precipitación del ADN de la célula huésped en cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con un detergente (CTAB, CPC y BTC). Las concentraciones en el eje y, se han corregido para el factor de dilución del detergente. Para cada detergente catiónico, se puede observar el mismo patrón, es decir, el ADN de la célula huésped se precipita de la cosecha de cultivo celular en bruto. La Fig. 6 (B) indica claramente que se produjo una clarificación efectiva del ADN en las alícuotas para concentraciones de detergente (CTAB, CPC o BTC) por encima de 0,5 mM.

Dado que el aumento de detergente no condujo a la precipitación del poliovirus, una persona experta en la técnica extrapolaría estos resultados a suspensiones celulares que contienen poliovirus de densidades celulares aún más altas, por ejemplo, de aproximadamente 70×10^6 células/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 120×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 150×10^6 células/ml. El experto en la materia concluiría que el poliovirus de tales cosechas de cultivos celulares en bruto de alta densidad celular puede purificarse mediante los métodos de la presente invención.

Ejemplo 7: Aumento de los rendimientos de la purificación de poliovirus de la cosecha de cultivo celular en bruto mediante la adición de diferentes tipos de detergentes (aniónicos, zwitteriónicos y no iónicos).

Las células PER.C6® se cultivaron en un medio de cultivo libre de suero en un bioreactor de 10 l operado en modo de perfusión a una densidad celular de aproximadamente 50×10^6 cv/mL. Antes de la infección con el virus de la polio tipo 2 (MEF-1), el cultivo se diluyó con medio de cultivo fresco hasta una densidad celular viable de aproximadamente $12,5 \times 10^6$ cv/mL. El proceso de infección por lotes tuvo lugar en bioreactores de 10 l a 35 °C, a una multiplicidad de infección de 1. En el momento de la cosecha, 20-24 horas después de la infección, se tomó una muestra de 240 ml que se distribuyó posteriormente en 42 alícuotas de 5 ml.

Con el fin de determinar el efecto de un detergente sobre las cosechas de células en bruto que contienen el poliovirus, se realizó un experimento de valoración con diferentes tipos de detergentes. Se utilizaron detergentes aniónicos (hidrato de taurodeoxicolato de sodio (STH) y dodecilsulfato de sodio (SDS)), detergentes zwitteriónicos (3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato (SB3-14), y 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS)), y detergentes no iónicos (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton® X-100) y decil β-D-1-tiomaltopiranosido (DTP)) como detergentes ejemplares para su clase de detergente. Se añadió una cantidad fija de soluciones madre de detergente a las alícuotas de la cosecha a una concentración de detergente diana. La concentración de detergente objetivo para los detergentes aniónicos (STH y SDS), los detergentes zwitteriónicos (SB3-14 y CHAPS) y los detergentes no iónicos (Triton® X-100 y DTP) estuvo entre 0 y 4 mM. Las muestras de todos los tipos de detergentes (aniónicos, zwitteriónicos, no iónicos) se mezclaron completamente y se incubaron durante una hora a 35 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g para depositar el ADN precipitado. Las muestras de sobrenadante se analizaron para determinar la cantidad de virus mediante ELISA de antígeno D y mediante Q-PCR para el ADN de la célula huésped.

La Fig. 7 (A, B y C) muestra la liberación de antígeno D de las cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con diferentes tipos de detergentes; detergentes aniónicos (STH y SDS), detergentes zwitteriónicos (SB3-14 y CHAPS) y detergentes no iónicos (Triton® X-100 y DTP), respectivamente. Las concentraciones de antígeno D en el sobrenadante, que se corrigen para la dilución de adición de detergente, se describen en función de la concentración de detergente. Fig.7 (A, B y C) describe que tras la adición de un detergente (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X- 100 y DTP), el título del virus aumentó sustancialmente en comparación con antes de la adición de un detergente (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 y DTP). Para cada tipo de detergente (aniónico, zwitteriónico o no iónico), se puede observar el mismo patrón, es decir, aumentar la concentración del detergente (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 y DTP) conduce a un aumento de la liberación del virus de la cosecha de células en bruto en la fase líquida.

La Fig. 8 (A, B y C) muestra la liberación de ADN de la célula huésped a partir de cosechas de cultivos celulares en bruto que contienen poliovirus como resultado del tratamiento con un detergente (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 y DTP). Las concentraciones en el eje y, se han corregido para el factor de dilución del detergente. Para cada tipo de detergente (aniónico, zwitteriónico o no iónico), se puede observar el mismo patrón, es decir, el aumento de la concentración del detergente (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 y DTP) conduce a un aumento de la liberación de ADN celular de la célula huésped de la cosecha de células en bruto en la fase líquida.

Dado que el aumento de la concentración de los tipos de detergente (aniónico, zwitteriónico o no iónico) no condujo a la precipitación del poliovirus, un experto en la técnica puede extrapolar estos resultados a suspensiones celulares que contienen poliovirus de densidades celulares aún mayores, por ejemplo, de aproximadamente 70×10^6 células/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 120×10^6 células/ml, por ejemplo, hasta aproximadamente 150×10^6 células/ml. El experto en la materia concluiría que el poliovirus de tales cosechas de cultivos celulares en bruto de alta densidad celular puede purificarse mediante los métodos de la presente invención.

Ejemplo 8: Tratamiento de DB y clarificación como parte del tren de purificación Sabin IPV

Este ejemplo describe la aplicación del proceso de recolección (tratamiento DB seguido de clarificación celular) como parte del proceso de purificación de los serotipos de poliovirus atenuados (Sabin tipo 1, Sabin tipo 2 y Sabin tipo 3) de cosechas de cultivos de células en bruto.

Las células, de la línea celular PER.C6, se cultivaron en un medio de cultivo libre de suero en un bioreactor de 10 l operado en modo de perfusión a una densidad celular de aproximadamente 50×10^6 cv/mL. Antes de la infección con serotipos de poliovirus de tipo 1 (Sabin tipo 1), tipo 2 (Sabin tipo 2) o tipo 3 (Sabin tipo 3), el cultivo se diluyó con medio de cultivo fresco hasta una densidad celular viable de $12,5 \times 10^6$ cv/mL o 25×10^6 cv/mL. La multiplicidad de infección de 1 y 0,1 se usó para los cultivos celulares de $12,5 \times 10^6$ cv/mL y 25×10^6 cv/mL, respectivamente. En ambos casos, el proceso de infección por lotes tuvo lugar en bioreactores de 10 l a 32,5 °C.

En el momento de la cosecha (48 horas después de la infección por Sabin tipo 1 o Sabin tipo 3, y 72 horas después de la infección por Sabin tipo 2), se añadió una solución de DB a los bioreactores durante un período de 30 minutos, a una concentración final de DB de 2,2 mM. Después de la adición del detergente, la cosecha tratada con DB (~ 11 l) se mezcló durante 60 min. Finalmente, la cosecha tratada con DB se clarificó y se purificó de manera similar a como se describe para Salk IPV en la Figura 4 y el Ejemplo 5.

La tabla 6 muestra la recuperación global de antígeno D y la eliminación de HC-ADN de la etapa de tratamiento de DB seguida de una filtración en serie. La Tabla 7 resume los atributos de calidad del poliovirus Sabin purificado.

Tabla 6: Recuperación del antígeno D y concentración de HC-ADN después del tratamiento con DB y la etapa de clarificación celular.

Serotipos	VCDAl (x 10 ⁶ cv/mL)	Recuperación de antígeno D (%)	HC-ADN (ng/ml)
Sabin tipo 2	12,5	126	<0,4
Sabin tipo 3	12,5	105	<0,4
Sabin tipo 1	25	83	<0,4
Sabin tipo 2	25	76	<0,4
Sabin tipo 3	25	85	<0,4

Tabla 7: Calidad del virus de polio Sabin purificado antes de la inactivación

Serotipos	VCDAl (x 10 ⁶ cv/mL)	TP/UD (µg/UD)	HC-DNA (pg/UD)	DO260/DO280 (-)
Sabin tipo 2	12,5	0,040	<1,3	1,72
Sabin tipo 3	12,5	0,004	<0,2	1,63
Sabin tipo 1	25	0,009	<0,3	1,74
Sabin tipo 2	25	0,03	<1,1	1,67
Sabin tipo 3	25	-*	<0,3	1,84

* No disponible debido a uno o más datos perdidos.

Los resultados para el proceso del virus de la polio de Sabin muestran una gran similitud con los resultados obtenidos para las cepas de tipo salvaje. También para las cepas del virus de la polio Sabin, el proceso combinado de recolección y clarificación del DB logra una alta recuperación del virus con la eliminación completa del ADN-HC (Tabla 6). La Tabla 7 muestra que las cosechas de cultivos de virus de la polio Sabin basadas en PER.C6® se podrían purificar suficientemente usando el proceso de recolección y purificación descrito en la invención. La concentración de ADN y proteína específica residual cumple con los requisitos reglamentarios (OMS/EP). Además, la relación de absorbancia DO260/DO280 es indicativa de virus altamente purificados (Westdijk et al., 2011). La pureza general es la misma que la obtenida para las cepas del virus de la poliomiелitis de tipo salvaje (consulte la Tabla 3 en el ejemplo 5).

Los resultados son muy prometedores, especialmente cuando se considera que los dos tipos de virus, tipo salvaje y cepas Sabin, difieren en la carga neta de la superficie (Thomassen et al., 2013). Esto demuestra una vez más la robustez del proceso genérico de fabricación de vacunas contra el virus de la polio de alta productividad.

Referencias

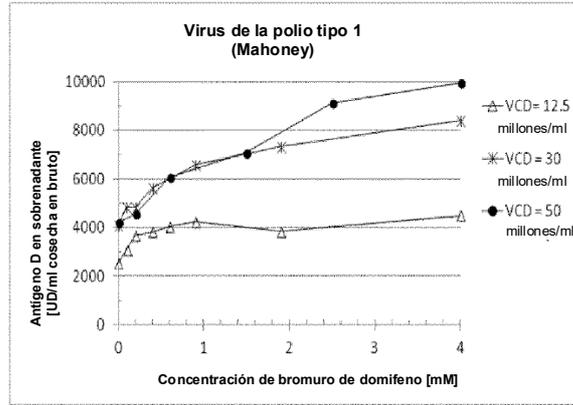
- Bakker WAM, Thomassen YE, van't Oever AG, Westdijk J, van Oijen MGCT, Sundermann LC, van't Veld P, Sleeman E, van Nimwegen FW, Hamidi A, Kersten GFA, van den Heuvel N, Hendriks JT, van der Pol LA. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine* 2011; 29(41):7188-96
- Cortin V, Thibault J, Jacob D, Garnier A. High-Titer Poliovirus Vector Production in 293S Cell Perfusion Culture. *Biotechnol. Prog.* 2004.
- European Pharmacopoeia 7.0, Poliomyelitis vaccine (inactivated). 04/2010:0214
- Fuchs F, Minor P, Daas A, Milne C. Establishment of European Pharmacopoeia BRP batch 2 for inactivated poliomyelitis vaccine for in vitro D-antigen assay. *Pharmeuropa Bio* 2003-1, 23-50, 2003.
- Goerke A, To B, Lee A, Sagar S, Konz K. Development of a Novel Poliovirus Purification Process Utilizing Selective Precipitation of Cellular DNA. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 91, No. 1, July 5, 2005.
- Henderson M, Wallis C, Melnick J. Concentration and purification of enteroviruses by membrane chromatography. *Applied and environmental microbiology*, Nov. 1976, p.689-693.
- Kreeftenberg H, van der Velden T, Kersten G, van der Heuvel N, de Bruijn M. Technology transfer of Sabin-IPV to new developing country markets. *Biologicals* 2006; 34(2):155-8
- Sanders BA, Edo-Matas D, Custers JHHV, Koldijk MH, Klaren V, Turk M, Luitjens A, Bakker WAM, UytdeHaag F, Goudsmit J, Lewis JA, Schuitemaker H, PER.C6 cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: a potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine* 2013; 31(5):850-6
- Thomassen YE, van 't Oever AG, Vinke M, Spiekstra A, Wijffels RH, van der Pol LA, Bakker WAM. Scale down of the inactivated polio production process. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 110 (5):1354-1365, May 2013.
- Thomassen YE, van Eikenhorst G, van der Pol LA, Bakker WAM. Isoelectric focusing with whole column Imaging detection. *Anal. Chem.* 85:6089-6094 (2013).
- Vlecken DHW, Pelgrim RPM, Ruminski S, Bakker WAM, van der Pol LA. Comparison of initial feasibility of host cell lines for viral vaccine production *Journal of Virological Methods* 2013 193 (2): 278-283
- Westdijk J, Brugmans D, Martin J, van't Oever A, Bakker WAM, Levels L, Kersten, G. Characterization and standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: Proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines. *Vaccine* 2011; 29: 3390-3397
- WHO technical report Series, No. 910, 2002. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated).
- Yuk IHY, Olsen MM, Geyer S, Forestell SP. Perfusion Cultures of Human Tumor Cells: A Scalable Production Platform for Oncolytic Adenoviral Vectors. *Biotechnol. Bioengin.* 86: 637-641 (2004).

REIVINDICACIONES

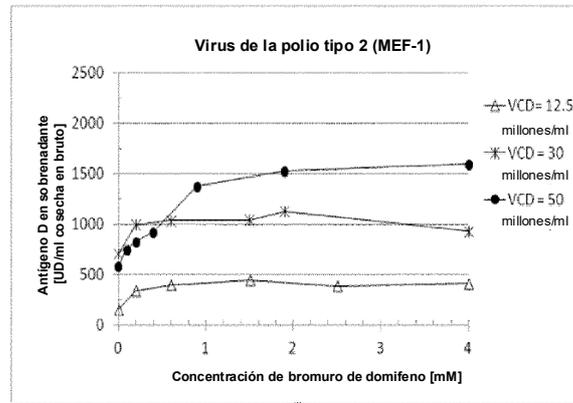
- 5 1. Un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) agregar un detergente a la cosecha de cultivo celular en bruto;
 - b) clarificar dicha cosecha de cultivo celular que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus.
- 10 2. Un método para mejorar la liberación de poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) agregar un detergente a la cosecha de cultivo de células en bruto;
 - b) clarificar dicha cosecha de cultivo celular que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus.
- 15 3. Un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) agregar un detergente a la cosecha de cultivo de células en bruto;
 - b) clarificar dicho cultivo celular que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus; y
 - c) someter la cosecha clarificada obtenida en el paso b) a un paso de captura para obtener una suspensión que contiene poliovirus.
- 20 4. Un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha etapa de captura es una etapa de cromatografía de intercambio catiónico.
- 30 5. Un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el poliovirus obtenido en la etapa c) se separa adicionalmente de la suspensión que contiene poliovirus por exclusión de tamaño.
- 35 6. Un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha exclusión por tamaño se realiza mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
- 40 7. Un método para purificar poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) agregar un detergente a la cosecha de cultivo celular en bruto
 - b) clarificar dicho cultivo de células que contiene poliovirus para obtener una cosecha clarificada con partículas de poliovirus;
 - c) someter la cosecha clarificada obtenida en la etapa b) a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico para obtener una suspensión que contiene poliovirus;
 - d) una purificación adicional separando el poliovirus de la suspensión que contiene poliovirus mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
- 45 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho detergente es seleccionado del grupo de detergentes catiónicos, detergentes aniónicos, detergentes no iónicos y detergentes zwitteriónicos.
- 50 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho detergente es un detergente catiónico.
- 55 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho detergente catiónico se selecciona del grupo de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), cloruro de hexadecilpiridinio (CPC), cloruro de bencetonio (BTC) y bromuro de domifeno (DB).
- 60 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el detergente catiónico es bromuro de domifeno (DB).
- 65 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho detergente es un detergente aniónico.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho detergente aniónico se selecciona del grupo de hidrato de taurodeoxicolato de sodio (STH), dodecilsulfato de sodio (SDS).
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el detergente es un detergente no iónico.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho detergente no iónico se selecciona del grupo de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton® X-100) y decil-β-D-1-tiomaltopiranosido (DTP).

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el detergente es un detergente zwitteriónico.
- 5 17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho detergente zwitteriónico se selecciona del grupo de 3-(N,N-dimetilristilamonio)propanosulfonato (SB3-14), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS).
18. El uso de un detergente para mejorar la liberación de poliovirus de una cosecha de cultivo celular en bruto.

A



B



C

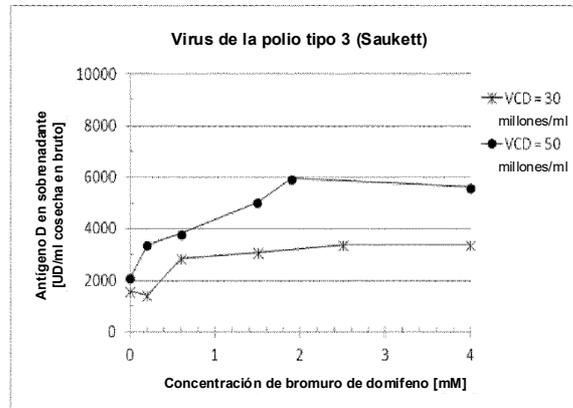
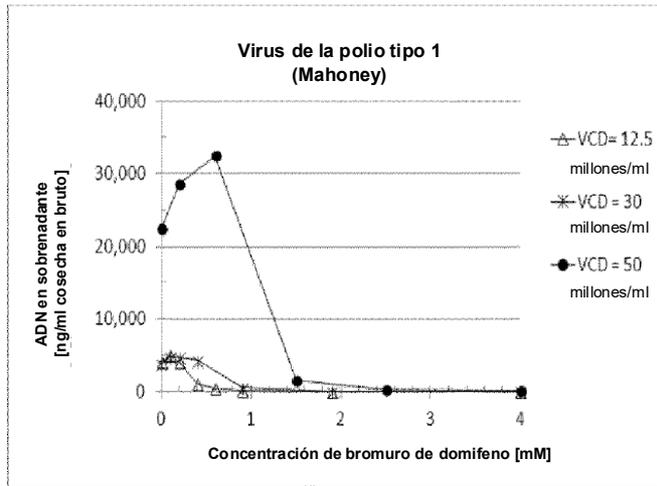
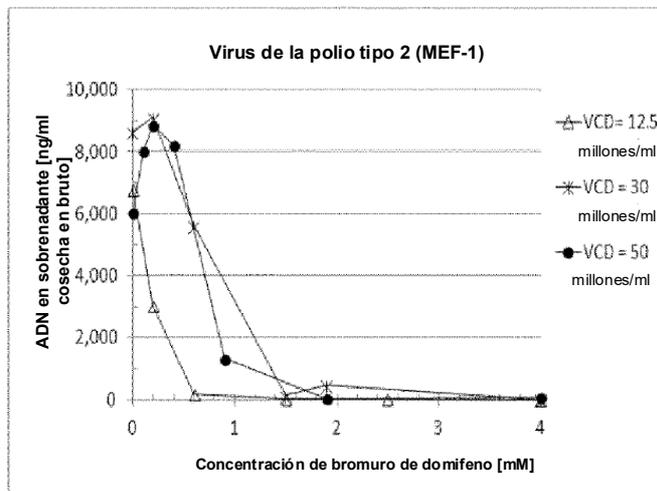


Fig. 1

A



B



C

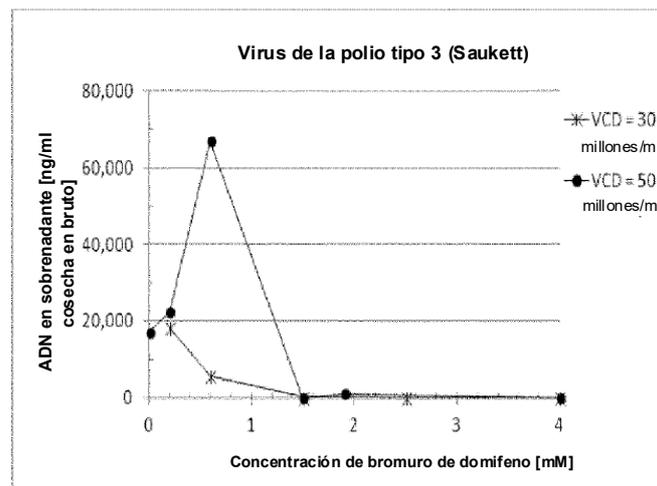


Fig. 2

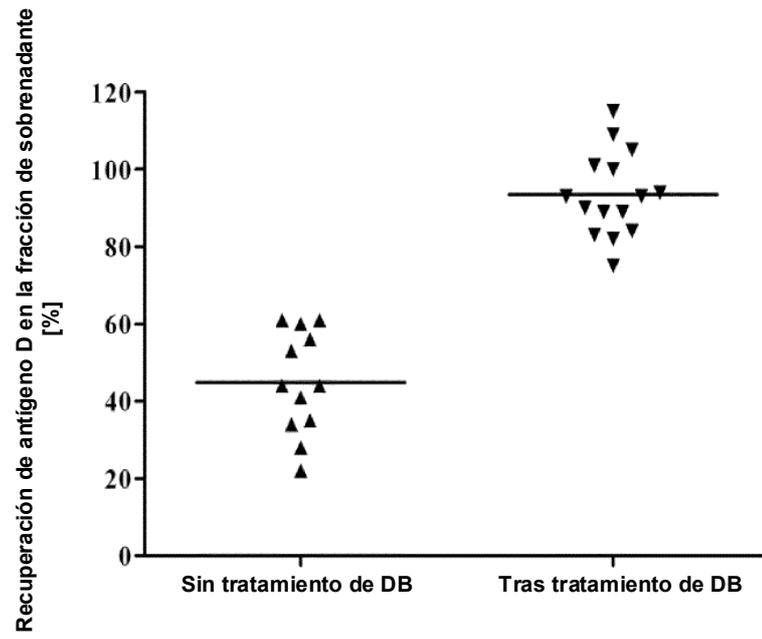


Fig. 3



Fig. 4

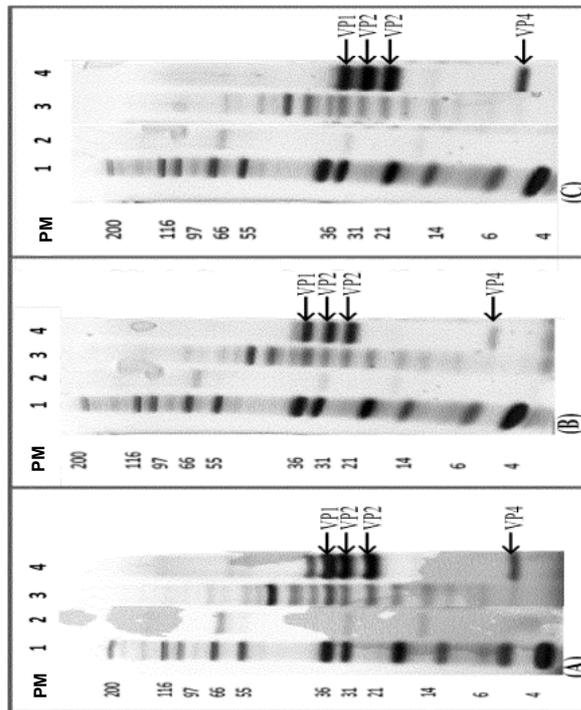
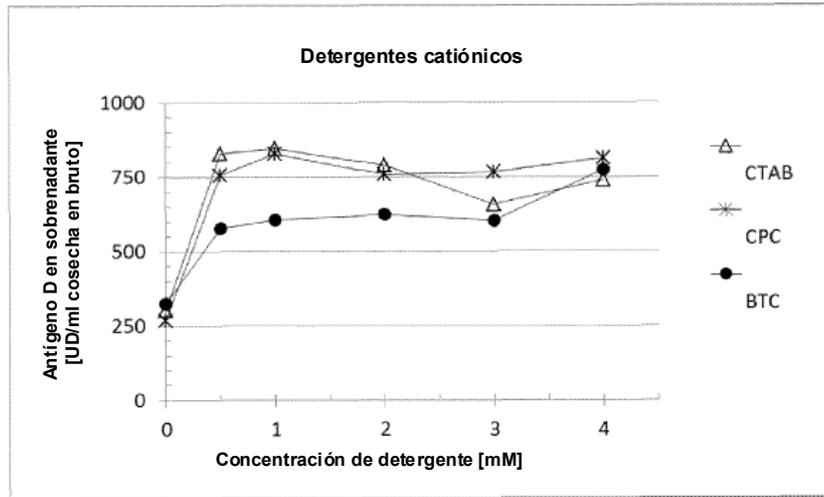


Fig. 5

A



B

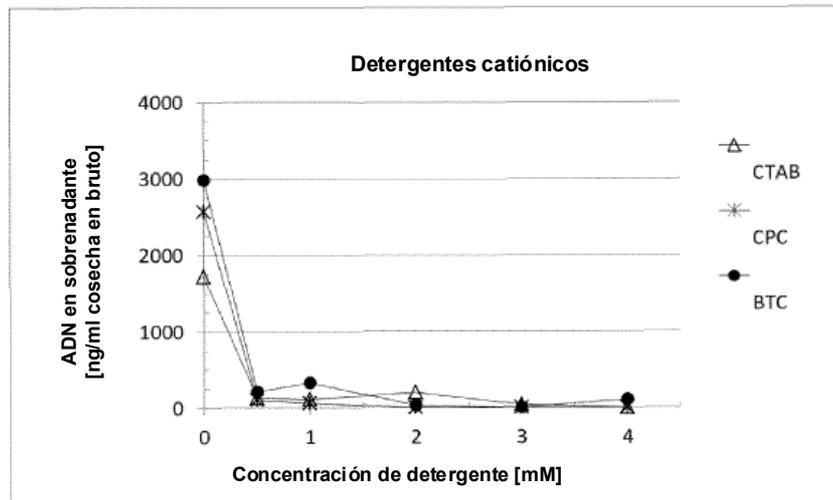
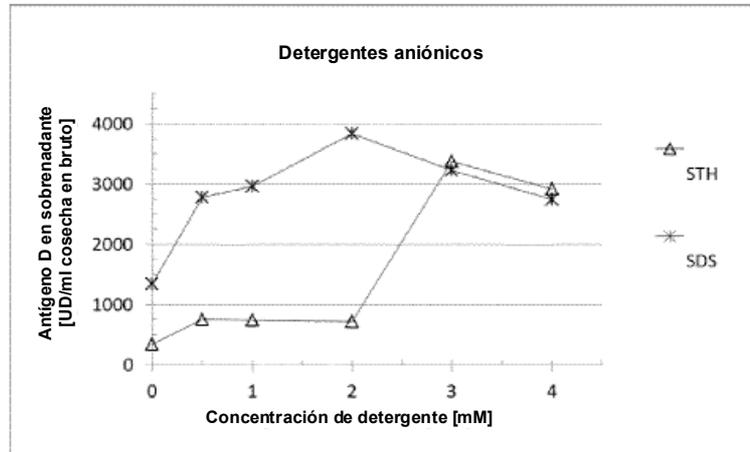
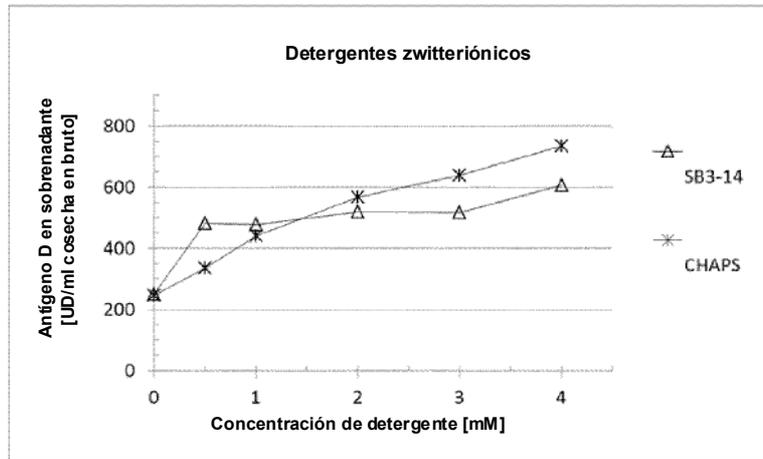


Fig. 6

A



B



C

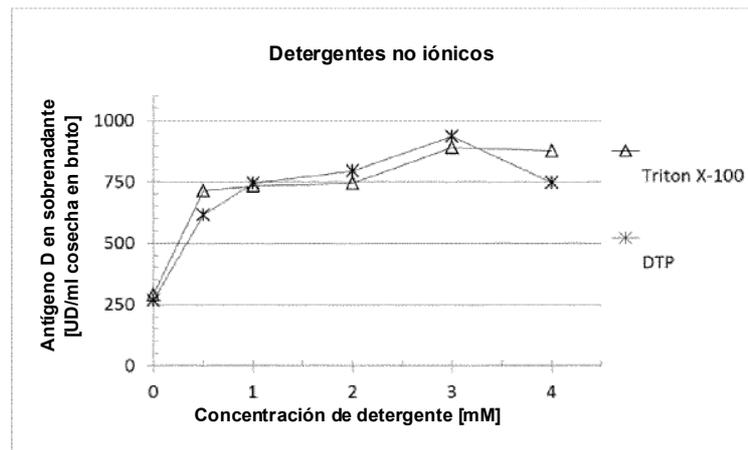
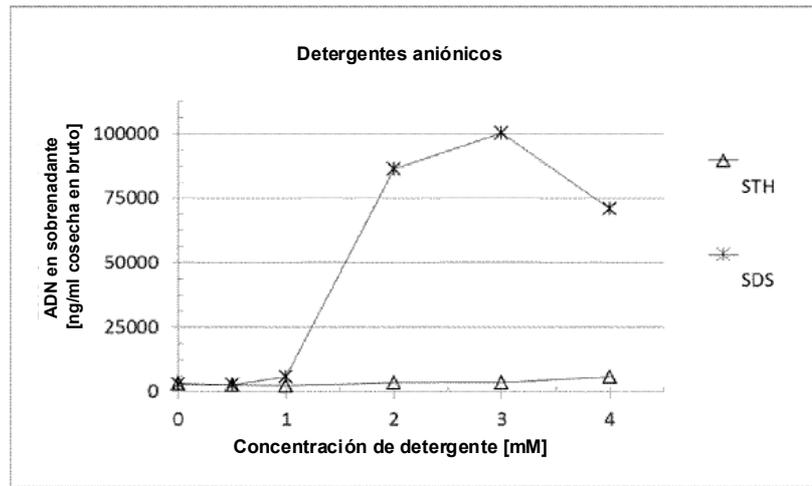
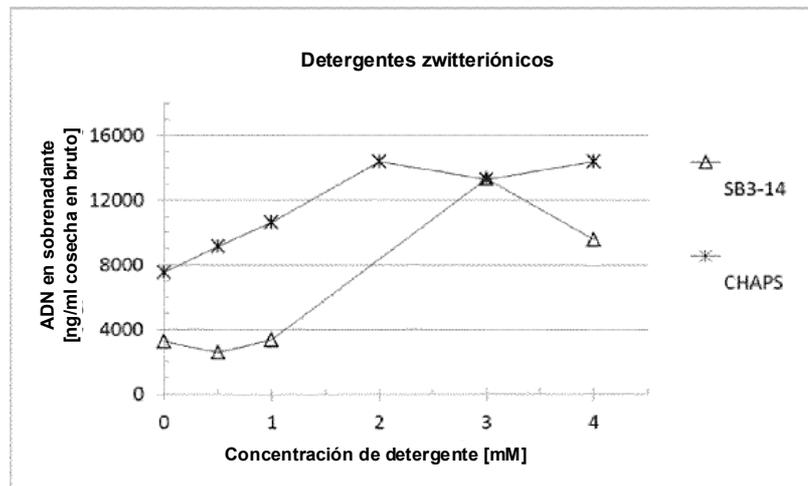


Fig. 7

A



B



C

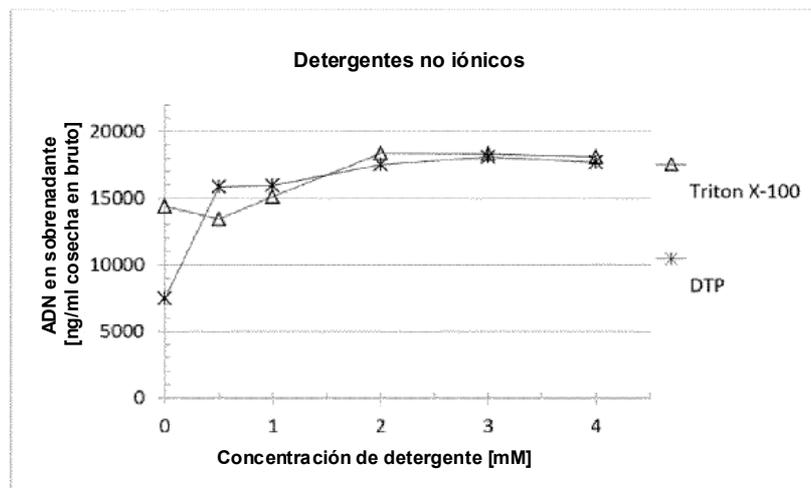


Fig. 8