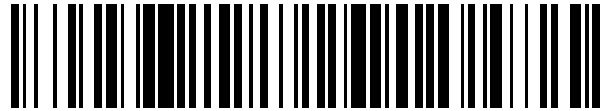


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 011**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2016 PCT/EP2016/057324**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16156613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2016 E 16714402 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3277802**

54 Título: **Proceso de purificación aséptica para virus**

30 Prioridad:

03.04.2015 EP 15248012

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

07.02.2020

73 Titular/es:

**VALNEVA SE (100.0%)
6 Rue Alain Bombard
44800 Saint-Herblain, Nantes, FR**

72 Inventor/es:

**SCHLEGL, ROBERT y
WEBER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 741 011 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 aséptica para virus

5 CAMPO DE LA INVENCION

La divulgación se refiere a procesos para la purificación de virus.

10 ANTECEDENTES

10 Las agencias reguladoras como la Organización Mundial de la Salud establecen estándares y directrices para la producción de composiciones farmacéuticas administradas a seres humanos, tales como vacunas, que limitan la cantidad y los componentes de las composiciones. Por ejemplo, para las vacunas, las preparaciones de vacuna deben ser estériles (es decir, exentas de organismos de replicación independiente) y no deben contener más de 15 10 ng de ADN por dosis humana, entre otros requisitos. Dichos estándares se aplican para garantizar la seguridad de la composición para la administración a seres humanos, pero pueden introducir desafíos en los procesos usados para producir las composiciones.

20 SUMARIO

20 Los aspectos de la invención proporcionan procesos para la purificación de partículas de virus que comprenden las etapas de (a) proporcionar un medio líquido que comprende partículas de virus, en el que las partículas de virus tienen un diámetro superior a aproximadamente 100 nm; (b) poner en contacto las partículas de virus con una matriz en fase sólida que comprende un núcleo activado por ligando y una envoltura inactiva que comprende poros, en el 25 que el umbral de corte de peso molecular de los poros impide que las partículas de virus entren en el núcleo activado por ligando, y en el que una molécula más pequeña que el umbral de corte de peso molecular de los poros puede entrar en el núcleo activado por ligando; y (c) separar la matriz en fase sólida de las partículas de virus por filtración para producir una preparación de virus final; en el que el proceso se realiza en condiciones asépticas.

30 En algunas realizaciones, el medio líquido que comprende las partículas de virus se somete a una o más etapas de purificación previa antes de la etapa (b). En algunas realizaciones, la etapa de purificación previa comprende (a) digerir el ADN genómico de la célula hospedadora en el medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o partículas de virus por tratamiento enzimático; y/o (b) ultra/diafiltración del medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o partículas de virus usando una membrana de fibra hueca que tiene un tamaño de poro igual o superior 35 a 750 kDa.

40 En algunas realizaciones, las partículas de virus tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm o más. En algunas realizaciones, el virus es un virus vivo, un virus vivo atenuado, un virus vivo modificado, o un virus vivo recombinante. En algunas realizaciones, el virus pertenece a una familia de virus seleccionada entre el grupo que consiste en *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae*, *Arenaviridae*, *Rhabdoviridae*, y *Coronaviridae*. En algunas realizaciones, el virus pertenece a la familia de virus *Paramyxoviridae* (que está vivo o inactivado). En algunas realizaciones, el virus es el virus del sarampión.

45 En algunas realizaciones, la molécula que entra en el núcleo de la matriz en fase sólida tiene un peso molecular inferior a 700 kDa. En algunas realizaciones, el ligando del núcleo activado por ligando de la matriz en fase sólida es capaz de unirse a la molécula que entra en el núcleo activado por ligando mediante interacciones catiónicas, aniónicas, hidrofóbicas o mixtas. En algunas realizaciones, el ligando del núcleo activado por ligando de la matriz en fase sólida es octilamina. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se usa como una suspensión y a una 50 concentración final entre un 2,5 % (v/v) y un 30 % (v/v), preferentemente un 3,3 %, un 5 %, un 6,6 % o un 10 %, lo más preferentemente un 10 %. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se incuba con el medio líquido que comprende las partículas de virus a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) con agitación durante al menos 1 hora, preferentemente 2 horas, 3 horas o 4 horas, lo más preferentemente 2 horas.

55 En algunas realizaciones, la reducción relativa de impurezas de la preparación de virus final con respecto al medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o partículas de virus está en un intervalo de un 60 a un 95 %. En algunas realizaciones, la impureza residual de la preparación de virus final es inferior a un 1 %.

60 En algunas realizaciones, la filtración de la etapa (c) de la reivindicación 1 se lleva a cabo usando un filtro que tiene un tamaño de poro igual o superior a 1 µm. En algunas realizaciones, el proceso va seguido por una o más etapa(s) de filtración aséptica.

65 En algunas realizaciones, el virus se propaga en una línea celular seleccionada entre el grupo que consiste en una línea de células EB66, una línea de células Vero, una línea de células Vero-aHis, una línea de células HeLa, una línea de células a HeLa-S3, una línea de células 293, una línea de células PC12, una línea de células CHO, una línea de células 3T3, una línea de células PerC6, una línea de células MDSK, una línea de células de fibroblastos embrionarios de pollo, una línea de células de pato, y una línea de células aviares diploides. En algunas

realizaciones, dicha línea celular es una línea de células de pato. En algunas realizaciones, dicha línea celular es una línea de células aviares diploides. En algunas realizaciones, dicha línea celular es la línea de células EB66.

5 Los aspectos de la invención proporcionan un uso de cualquiera de los procesos que se describen en el presente documento para fabricar una composición para la inmunización frente a una infección viral.

Otros aspectos proporcionan composiciones que comprenden las partículas de virus que se pueden obtener mediante cualquiera de los procesos que se describen en el presente documento para tratar y/o prevenir una infección viral.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

No se pretende dibujar a escala los dibujos adjuntos. Las Figuras son solo ilustrativas y no son necesarias para permitir la divulgación. Para fines de claridad, no todos los componentes se pueden etiquetar en cada dibujo. En los dibujos:

La Figura 1 muestra una visión general del proceso de purificación del virus del sarampión.

20 La Figura 2 muestra trazas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para el virus del sarampión en diferentes etapas de la purificación. La inserción muestra las trazas de SEC tanto para el virus del sarampión (pico a la izquierda) como para impurezas (pico a la derecha).

25 Las Figuras 3A-3B muestran la presencia de proteínas de la célula hospedadora (HCP) en muestras durante diversas etapas del proceso de purificación. La Figura 3A muestra un gel de SDS-PAGE representativo con tinción de plata. La Figura 3B muestra una transferencia de Western representativa usando un anticuerpo primario anti-EB66-HCP-IgG.

30 La Figura 4A-4C muestra la monitorización de la presencia de HCP en muestras después de diafiltración y tratamiento con BENZONASE®. La Figura 4A muestra un gel de SDS-PAGE representativo con tinción de plata. La Figura 4B muestra una transferencia de Western representativa usando un anticuerpo primario anti-EB66-HCP-IgG. La Figura 4C muestra una transferencia de Western representativa usando un anticuerpo primario de proteína de fusión a virus anti-sarampión.

35 Las Figuras 5A y 5B presentan análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) del virus del sarampión durante el proceso de purificación. La Figura 5A muestra el NTA de una muestra de la extracción del virus del sarampión. La Figura 5B muestra el NTA de una muestra sometida a diafiltración.

40 La Figura 6 muestra un cromatograma de exclusión por tamaño (señal de fluorescencia y UV_{214nm}; panel a la derecha) y determinación del tamaño del virus mediante dispersión de luz estática en múltiples ángulos (MALS; panel a la izquierda) de una muestra de la extracción del virus del sarampión (MV-GFP).

45 La Figura 7 muestra un cromatograma de exclusión por tamaño (señal de fluorescencia y UV_{214nm}) y determinación del tamaño del virus mediante dispersión de luz estática en múltiples ángulos (MALS; inserción) de una muestra del virus del sarampión (MV-GFP) altamente purificada.

La Figura 8 presenta un diagrama de flujo para adsorción discontinua después de ultrafiltración/diafiltración para reducir las impurezas de la preparación de virus.

50 La Figura 9 muestra un esquema del conjunto del proceso esterilizado previamente.

55 La Figura 10 presenta el porcentaje de recuperaciones de virus (MV GFP rec.; a rayas) y de impurezas (gris sólido) tal como se evalúa mediante cromatografía por exclusión de tamaño seguido por adsorción discontinua usando la resina CAPTO® Core 700 o una combinación de las resinas CAPTO® Core 700 y QSFF o de las resinas CAPTO® Core 700 e Hidroxiapatita (Hix).

La Figura 11 presenta el porcentaje de recuperaciones de virus (MV GFP rec.; a rayas) y de impurezas (gris sólido) tal como se evalúa mediante cromatografía por exclusión de tamaño seguido por adsorción discontinua usando la resina CAPTO® Core 700 a diversas concentraciones de suspensión (33 % v/v-2,5 % v/v).

60 La Figura 12 muestra el porcentaje de recuperaciones de virus (pico principal de MV rec.; diamantes) y de impurezas residuales (rest rec.; cuadrados) en muestras de adsorción discontinua tal como se evalúa mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

65 La Figura 13 muestra la reducción relativa de las impurezas residuales de las muestras procesadas con adsorción discontinua con respecto a muestras que no se adsorbieron de forma discontinua.

La Figura 14 presenta el rendimiento general de MV-GFP en muestras procesadas con adsorción discontinua en

CAPTO® Core 700 (diamantes) o sin adsorción discontinua (cuadrados).

La Figura 15 muestra la pureza de MV-GFP en muestras procesadas con adsorción discontinua en CAPTO® Core 700 (diamantes) o sin adsorción discontinua (cuadrados) en diversas etapas durante el proceso de purificación tal como se evalúa mediante cromatografía por exclusión de tamaño.

La Figura 16 muestra la pureza de MV-GFP en muestras procesadas con adsorción discontinua en CAPTO® Core 700 ("c/ CC700") o sin adsorción discontinua ("c/s CC700") en diversas etapas durante el proceso de purificación tal como se evalúa mediante gel SDS-PAGE.

La Figura 17 muestra el porcentaje de impurezas residuales en muestras procesadas con adsorción discontinua en CAPTO® Core 700 (diamantes) o sin adsorción discontinua (cuadrados) en diversas etapas durante el proceso de purificación tal como se evalúa mediante cromatografía por exclusión de tamaño.

La Figura 18 presenta un esquema que muestra la clasificación y propiedades de diversas familias de virus (<http://www.nlv.ch/Virologytutorials/Classification.htm>).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se desvelan procesos asepticos para la purificación de virus y composiciones que comprenden virus purificados. En la producción de composiciones farmacéuticas, tales como composiciones de vacunas, para la administración a sujetos, se debe garantizar la esterilidad y la seguridad de la composición. La preparación de composiciones estériles se consigue habitualmente sometiendo una composición final a filtración estéril, es decir, a través de una membrana de filtro de 0,2 µm, antes de su administración. Para composiciones, tales como composiciones de vacunas virales, que comprenden virus relativamente grandes (es decir, con un tamaño aproximadamente 100 nm o superior), la filtración estéril puede dar como resultado una pérdida sustancial de virus debido a que se retiene en la membrana, lo que reduce el rendimiento viral del proceso de purificación. Además, algunos virus, tales como el virus del sarampión y otros virus que son sensibles al estrés por cizalladura, cada etapa del proceso de purificación se debe llevar a cabo en condiciones suaves, haciendo que los métodos de esterilización alternativos sean inútiles. Los investigadores descubrieron que los métodos de purificación de virus que usan filtración de flujo tangencial no han sido lo suficientemente exitosos y no han sido lo suficientemente eficaces en la preparación de composiciones asepticas de virus relativamente grandes, tales como el virus del sarampión (véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.759.104 y ejemplos en el presente documento). Además, mantener y generar un sistema de filtración de flujo tangencial aseptico es de coste elevado y requiere un gran esfuerzo. Los procesos que se describen en el presente documento permiten la preparación de virus en condiciones asepticas completas dando como resultado una preparación viral que no requiere filtración estéril.

La invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes que se presentan en la siguiente descripción o que se ilustran en los dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones y de ser puesta en práctica o llevada a cabo de varias maneras. Además, las expresiones y la terminología usadas en el presente documento son para fines de descripción y no se deben considerar limitantes. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica", y las variaciones de los mismos en el presente documento, pretende abarcar los elementos que se enumeran en lo sucesivo y sus equivalentes, así como los elementos adicionales.

Los aspectos de la invención se refieren a procesos para purificar un virus. Cualquier virus para el que se desee una preparación de virus purificada puede ser compatible con aspectos de la invención. Los términos "virus", "partícula de virus", "partícula viral" y "virión" se pueden usar indistintamente y se refieren a un virus que comprende material genético rodeado por un revestimiento proteico (cápside) y, opcionalmente, una envoltura lipídica. En general, los virus se pueden clasificar basándose en el material genético del virus contenido en el revestimiento proteico y el método por el cual el virus es capaz de generar ARN mensajero (ARNm) en una célula infectada (una célula hospedadora), véase la Figura 18. Por ejemplo, el virus puede ser un virus de ADN o un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un retrovirus, lo que significa que el virus transcribe de manera inversa su ácido nucleico a través de un producto intermedio durante la replicación. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ADN bicatenario (ADNs), un virus de ADN monocatenario (ADNs), un virus de ARN bicatenario (ARNs), un virus de ARN monocatenario positivo (ARN+ss), un virus de ARN monocatenario negativo (ARN-ss), un retrovirus de ARN monocatenario (ARNs-RT), o un retrovirus de ADN bicatenario (ADNs-RT).

Un virus también se puede clasificar basándose en el tipo de célula hospedadora que es capaz de infectar. Como se usa en el presente documento, un virus es capaz de infectar una célula si puede entrar en la célula, replicarse y liberarse de la célula. En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus muerto o inactivado. En tales ejemplos, se considera que el virus es capaz de infectar las células hospedadoras en las que el virus podría entrar, replicarse y liberarse si el virus no se eliminó o inactivó. En algunas realizaciones, el virus es capaz de infectar células eucariotas. En algunas realizaciones, el virus es un virus animal (es decir, capaz de infectar células animales). En otras realizaciones, el virus es un virus de planta (es decir, capaz de infectar células de plantas).

Los procesos que se describen en el presente documento se pueden usar para purificar virus vivos o virus muertos o

inactivados. En algunas realizaciones, el virus es un virus vivo atenuado. Por ejemplo, el virus puede tener una capacidad de infección, virulencia y/o replicación reducida en un hospedador, en comparación con un virus de tipo silvestre. En otras realizaciones, el virus puede tener una capacidad de infección, virulencia y/o replicación mejorada en un hospedador, en comparación con un virus de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el virus es un virus mutado o modificado, por ejemplo, el ácido nucleico del virus puede contener al menos una mutación en relación con el virus de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el virus es un virus vivo recombinante, es decir, un virus que se genera de forma recombinante y que puede contener ácido nucleico de diferentes fuentes. En algunas realizaciones, el virus es sensible al estrés por cizalladura. En algunas realizaciones, el virus se manipula con suavidad para reducir la pérdida del título viral y la capacidad infección.

En general, el tamaño de los virus varía de aproximadamente 20 nm hasta más de 1 µm de longitud. Como se describe en el presente documento, los procesos de preparaciones virales que implican filtración a través de 0,2 µm ("filtración estéril"), en particular las preparaciones virales para la administración a sujetos, son difíciles o no posibles para virus que son aproximadamente 100 nm o más grandes que el tamaño de poro del filtro. Los procesos que se describen en el presente documento se pueden usar para purificar cualquier virus, pero pueden ser particularmente útiles para virus de aproximadamente 100 nm o de mayor tamaño. En algunas realizaciones, los virus tienen como promedio un tamaño de aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o aproximadamente 1000 nm o son de mayor tamaño. En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus pleomórfico, lo que significa que dentro de una población del virus, los virus pueden estar presentes en diferentes tamaños y/o formas. En algunas realizaciones, el virus pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae*, *Arenaviridae*, *Rhabdoviridae*, o *Coronaviridae*. En algunas realizaciones, el virus es un virus de la familia *Retro*, *Corona*, *Fil*, *Rhabdo*, *Buyna*, *Orthomyxo*, *Paramyxo*, *Arena*, *Herpes*, *Irido*, *Baculo*, o *Pox*. Los virus particularmente preferentes para su uso con los procesos que se describen en el presente documento son el virus del sarampión, VIH, mimivirus gigante o el virus del Herpes. En algunas realizaciones, el virus es una forma de vida atenuada, tal como un virus atenuado de cualquiera de los virus que se describen en el presente documento, por ejemplo, un virus del sarampión atenuado.

Los aspectos de la invención que se describen en el presente documento se refieren a procesos asépticos para purificar un virus. Como se usa en el presente documento, el término "aséptico" se refiere a composiciones, procesos y condiciones que están exentas de cualquier organismo vivo contaminante. En algunas realizaciones, cada etapa del proceso se lleva a cabo en condiciones asépticas de modo que la preparación del virus resultante puede estar exenta de organismos vivos que se replican de forma independiente.

Los procesos que se describen en el presente documento proporcionan métodos asépticos para la purificación de virus a través de etapas secuenciales que eliminan las impurezas o contaminantes de la preparación viral. Como se usa en el presente documento, "impurezas" y "contaminantes" se pueden usar indistintamente y se refieren a componentes no deseados en la preparación viral en cualquier etapa durante el proceso de purificación. En algunas realizaciones, las impurezas o contaminantes pueden ser células hospedadoras o fragmentos de las mismas, incluyendo el ADN de la célula hospedadora y/o proteínas de la célula hospedadora; fragmentos virales o ácido nucleico viral; enzimas, tal como la nucleasa BENZONASE®, sales; y componentes del medio líquido. La expresión "impureza residual" se refiere a cualquier cantidad de impureza o contaminante restante que sigue una o más etapas del proceso de purificación. En algunas realizaciones, las impurezas residuales son las impurezas restantes en la preparación viral final.

Los procesos que se describen en el presente documento implican proporcionar un medio líquido que comprende una pluralidad de virus para la purificación. Los virus se pueden producir o proporcionar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el virus se puede producir al propagarse en un hospedador vivo, un huevo embrionario, cultivo de tejidos o línea celular, tal como en la línea celular EB66®. La selección del método para producir el virus dependerá de varios factores tales como el virus y el tipo de célula hospedadora que es capaz de replicar y la cantidad de producción de virus deseada.

En ciertas realizaciones, el virus se propaga en cultivos de células o tejidos. Para la propagación del virus se puede usar cualquier célula que sea permisiva (capaz de infectarse con el virus) para la entrada y replicación del virus. En algunas realizaciones, las células son células primarias (por ejemplo, células que se han aislado de un organismo hospedador). En algunas realizaciones, las células son de una línea celular. En algunas realizaciones, la línea celular se obtiene a partir de células de un mamífero (tal como un mamífero humano o no humano), un ave, un insecto o una planta. En algunas realizaciones, las células de la línea celular son células EB66®, células Vero, células Vero-Hisa, células HeLa, células HeLa-S3, células 293, células PC12, células CHO, células 3T3, células PerC6, fibroblastos embrionarios de pollo (los CEF), o células aviares diploides. En algunas realizaciones, las células de la línea celular son células que crecen en suspensión y no se adhieren. En algunas realizaciones, las células aviares diploides se obtienen a partir de células madre aviares. En algunas realizaciones, las células aviares diploides son células de pato. En algunas realizaciones, las células son de la línea celular EB66®.

Después de la replicación viral en una célula o población celular, el virus se puede liberar a un medio líquido que rodea la célula infectada. En algunas realizaciones, la célula hospedadora se puede someter a lisis (por ejemplo, por vía enzimática, por vía mecánica) para liberar el virus en el medio líquido. El tipo de medio líquido en el que se libera

el virus dependerá del tipo de célula hospedadora y del método de propagación viral usado. En algunas realizaciones, el medio líquido contiene suero, plasma, sangre, líquido extracelular, líquido alantoico, líquido amniótico, saco vitelino, tampón o medio de cultivo celular o tisular. Se puede usar cualquier medio de cultivo celular o tisular que soporte el crecimiento de la célula o población celular.

5 En algunas realizaciones, las células se cultivan como una monocapa sobre un sustrato de cultivo, tal como un matraz, una placa o una lámina. En tales realizaciones, el virus se extrae de las células eliminando el medio de cultivo de las células. En algunas realizaciones, las células se someten a lisis para liberar el virus en el medio de cultivo y el medio de cultivo se recoge para extraer el virus. En otras realizaciones, las células se hacen crecer en
10 suspensión en la que las células están flotando o solo se adhieren ligeramente al sustrato de cultivo. En algunas realizaciones, el sustrato de cultivo puede ser un matraz rodante, matraz agitador, matraz de centrifugación, o biorreactor. Además en otras realizaciones, las células se cultivan en un cultivo mixto en el que una parte de las células se adhieren al sustrato de cultivo y una parte de las células están flotando y no son adherentes. En algunas realizaciones, las células y el virus están presentes en el medio líquido.

15 Los métodos para cultivar células serán evidentes para un experto en la materia. Véase, por ejemplo, *General Techniques of Cell Culture*, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

20 En algunas realizaciones, el medio líquido que contiene el virus se somete a una o más etapas de purificación previa. En algunas realizaciones, se puede usar una o más etapas de purificación previa, por ejemplo, para reducir la presencia de una o más impurezas o contaminantes, eliminar células hospedadoras o fragmentos de las mismas, mejorar el rendimiento del virus y/o reducir el tiempo total de procesamiento.

25 En algunas realizaciones, cualquier célula hospedadora o fragmentos de la misma se pueden separar o eliminar del medio líquido que comprende el virus mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, las células hospedadoras se eliminan mediante centrifugación o filtración del medio líquido. La centrifugación se puede realizar a una velocidad y una duración que dé como resultado la separación de las células hospedadoras o fragmentos de las mismas del virus. Por ejemplo, las células hospedadoras o fragmentos de la misma forman un sedimento mientras el virus permanece en el medio líquido. Alternativamente o además, se
30 pueden usar métodos de filtración, tales como filtración por membrana, para eliminar las células hospedadoras o fragmentos de las mismas del medio líquido que contiene el virus (por ejemplo, ultrafiltración). En algunas realizaciones, se selecciona una membrana de filtro de un modo tal que el virus pueda pasar a través del filtro pero las células hospedadoras y fragmentos de las mismas permanecen atrapados en la membrana.

35 En algunas realizaciones, la una o más etapas de purificación previa implican la degradación del ADN genómico de la célula hospedadora en el medio líquido que comprende el virus. En algunas realizaciones, el ADN genómico de la célula hospedadora se degrada mediante tratamiento enzimático. Cualquier enzima de degradación del ADN puede ser compatible con los procesos que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la enzima es una nucleasa. En algunas realizaciones, la nucleasa degrada tanto el ADN como el ARN. Los ejemplos no limitantes de nucleasas incluyen, pero no se limitan a, BENZONASE®, ADNsa I, ADNsa II, Exonucleasa II, nucleasa microcócica, nucleasa P1, nucleasa S1, fosfodiesterasa I, fosfodiesterasa II, ARNsa A, ARNsa H, ARNsa T1, o
40 endonucleasa T7. En algunas realizaciones, el tratamiento enzimático de degradación del ADN reduce o elimina la presencia de fragmentos de ADN con una longitud superior a aproximadamente 200 pares de bases. La concentración enzimática, el tiempo de incubación y la temperatura para degradar el ácido nucleico en el medio líquido que comprende el virus serán evidentes para alguien con experiencia en la materia. En algunas realizaciones, la concentración iónica (por ejemplo, Mg²⁺, Mn²⁺) y/o el pH del medio líquido que comprende el virus también se puede optimizar para aumentar o reducir la actividad de la enzima. Las enzimas que degradan el ADN se pueden aislar u obtener a partir de cualquier fuente conocida en la técnica, por ejemplo, la enzima puede ser una enzima microbiana, vegetal o de mamífero; se puede producir de forma recombinante y/o está disponible en el
50 mercado.

En algunas realizaciones, la una o más etapas de purificación previa implican ultrafiltración y/o diafiltración del medio líquido que comprende el virus. Como se usa en el presente documento, "ultrafiltración" se refiere a un método para separar componentes de una mezcla basándose en el tamaño o peso molecular de los componentes al pasar el
55 medio líquido a través de una membrana semipermeable. Los componentes que tienen un peso molecular mayor que el tamaño de poro (el umbral de corte de peso molecular (MWCO)) de la membrana semipermeable se retienen en la membrana, mientras que los componentes de menor peso molecular pueden pasar a través de la membrana. Como se usa en el presente documento, "diafiltración" se refiere a un método para reducir la concentración de un componente, tal como una impureza o contaminante, en una mezcla, y/o intercambio de tampones. La diafiltración se puede llevar a cabo mediante cualquiera de una serie de métodos, por ejemplo, diafiltración continua, diafiltración discontinua o diafiltración secuencial. En algunas realizaciones, los métodos de ultrafiltración y diafiltración se realizan de forma simultánea o secuencial.

65 En algunas realizaciones, la ultrafiltración y la diafiltración se llevan a cabo usando filtración de flujo tangencial. Como se usa en el presente documento, "filtración de flujo tangencial", también denominada "filtración de flujo cruzado", es un método de filtración en el que la corriente de alimentación (es decir, el medio líquido que contiene el

virus) es tangencial a la membrana de filtro. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se lleva a cabo mediante una membrana de fibra hueca. La corriente de alimentación se alimenta a la fibra tubular y los componentes de la alimentación que son más pequeños que el MWCO de la membrana pueden pasar a través de la corriente y salir de ella, mientras que los componentes más grandes se mantienen en la corriente y pueden recircularse a través del sistema. Se puede añadir continuamente medio líquido adicional o un tampón alternativo a la corriente a la misma velocidad que la eliminación de pequeños componentes de la mezcla, manteniendo de ese modo una concentración constante de virus. En algunas realizaciones, el medio líquido que comprende el virus se somete a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o al menos 30 intercambios de volumen de medio líquido o un tampón alternativo. Los ejemplos no limitantes de tampones alternativos incluyen solución tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con fosfato modificada por Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Earle (EBSS), solución salina equilibrada de Hank (HBSS) o agua.

En algunas realizaciones, el MWCO de la membrana es al menos 500 kilodaltons (kDa), 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, o al menos 900 kDa. En algunas realizaciones, el MWCO de la membrana es superior o igual a 750 kDa.

Los aspectos de la divulgación se refieren a poner en contacto el medio líquido que comprende el virus con una matriz en fase sólida. En algunas realizaciones, el medio líquido que comprende el virus se pone en contacto con una matriz en fase sólida mediante adsorción discontinua. Como se usa en el presente documento, "adsorción discontinua" se refiere a un método en el que una matriz en fase sólida se añade a una mezcla de componentes en fase líquida (por ejemplo, el medio líquido que comprende el virus) incluye una molécula para la cual se desea la purificación (por ejemplo, un virus). En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se suspende en una solución tampón denominada suspensión. La matriz en fase sólida los componentes de la mezcla. A continuación, la matriz en fase sólida y los componentes adsorbidos se pueden separar de la mezcla usando cualquier método conocido en la técnica, tal como centrifugación, filtración o floculación. En algunas realizaciones, la molécula para la cual se desea la purificación (por ejemplo, un virus) se adsorbe a la matriz en fase sólida. En otras realizaciones, las impurezas o contaminantes se adsorben a la matriz en fase sólida y la molécula para la cual se desea la purificación permanece en la fase líquida. Los métodos y consideraciones generales de adsorción discontinua se pueden encontrar, por ejemplo, en Protein Purification: Principles and Practice, 3ª Edición, Springer Advanced Texts in Chemistry, Nueva York, NY.

En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida comprende una matriz y un ligando que se une a los componentes de una mezcla. En algunas realizaciones, la matriz es SEPHAROSE® o agarosa, s tal como agarosa altamente reticulada. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida comprende un núcleo activado por ligando que contiene el ligando que se une a los componentes de una mezcla y una envoltura inactiva. En algunas realizaciones, la envoltura inactiva rodea la matriz y el ligando del núcleo y comprende poros con un MWCO. En general, los poros de la envoltura inactiva evitan la unión del virus con el ligando de la matriz en fase sólida y permiten la entrada de componentes de tamaño inferior al MWCO en la envoltura inactiva e interactúa con el ligando. En algunas realizaciones, el MWCO de la envoltura inactiva es al menos 500 kilodaltons (kDa), 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, o al menos 900 kDa. En algunas realizaciones, el MWCO de la envoltura inactiva es superior o igual a 700 kDa. En algunas realizaciones, los poros de la envoltura inactiva permiten la entrada de impurezas en el núcleo activado por ligando de la matriz en fase sólida. En algunas realizaciones, las impurezas interactúan o se unen al núcleo activado por ligando. En algunas realizaciones, las impurezas pueden interactuar o unirse al núcleo activado por ligando mediante cualquier tipo de interacción conocida en la técnica. En algunas realizaciones, las impurezas pueden interactuar o unirse al núcleo activado por ligando mediante interacciones catiónicas, aniónicas, hidrófobas o mixtas.

En algunas realizaciones, el ligando de la matriz en fase sólida es octilamina, dietilaminoetilo, amonio cuaternario, o sulfonato. Los ejemplos no limitantes de matrices de fase sólida que pueden ser compatibles con los procesos que se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, CAPTO® Core 700, CAPTO® DEAE, CAPTO® MMC, CAPTO® Q, CAPTO® S, FRACTOGEL® TMAE, Hix T II, Q SEPHAROSE® Fast Flow. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida es CAPTO® Core 700.

En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se suspende en una solución tampón en forma de una suspensión antes de combinarse con el medio líquido que comprende el virus. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se combina con el medio líquido que comprende el virus en forma de una suspensión a una concentración final entre un 2,5 % (v/v) - 30 % (v/v), un 5 % (v/v) - 20 % (v/v), o un 7,5 % (v/v) - 15 % (v/v). En algunas realizaciones, la suspensión se añade a una concentración final de aproximadamente un 2,5 %, un 3,0 %, un 3,5 %, un 4,0 %, un 4,5 %, un 5,0 %, un 5,5 %, un 6,0 %, un 6,5 %, un 7,0 %, un 7,5 %, un 8,0 %, un 8,5 %, un 9,0 %, un 9,5 %, un 10 %, un 10,5 %, un 11 %, un 12 %, un 13 %, un 14 %, un 15 %, un 16 %, un 17 %, un 18 %, un 19 %, un 20 %, un 21 %, un 22 %, un 23 %, un 24 %, un 25 %, un 26 %, un 27 %, un 28 %, un 28 %, un 29 %, o un 30 % (v/v). En algunas realizaciones, la suspensión se añade una concentración final de aproximadamente un 10 % (v/v). Las condiciones, incluyendo la duración, temperatura, y modo de contacto entre la matriz en fase sólida y el medio

líquido que comprende el virus, se pueden variar con el fin de aumentar la recuperación del virus y aumentar la unión y eliminación de impurezas del medio líquido. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se pone en contacto o se incuba con el medio líquido que comprende el virus a una temperatura entre 15 °C-30 °C, tal como 17 °C-27 °C, o 20°-25 °C. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se pone en contacto o se incuba con el medio líquido que comprende el virus a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se pone en contacto o se incuba con el medio líquido que comprende el virus a una temperatura de 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, o 30 °C.

En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se pone en contacto o se incuba con el medio líquido que comprende el virus durante un período de tiempo entre 1 y 5 horas, 1 y 10 horas, 1 y 24 horas, 5 y 10 horas, 10 y 15 horas, o entre 15-24 horas. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se pone en contacto o se incuba con el medio líquido que comprende el virus durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida se pone en contacto o se incuba con el medio líquido que comprende el virus durante aproximadamente 2 horas.

En cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento, la matriz en fase sólida se puede poner en contacto o incubar con el medio líquido que comprende el virus mediante cualquier modo conocido en la técnica. Por ejemplo, la matriz en fase sólida y el medio líquido que comprende el virus se pueden poner en contacto o incubar en un recipiente de forma estática o con movimiento, inversión, oscilación, o agitación. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida y el medio líquido que comprenden el virus se incuban con agitación.

Después de la adsorción discontinua, la matriz en fase sólida y cualquier componente unido se puede eliminar de la fase líquida mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como centrifugación, filtración, o floculación. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida y cualquier componente unido se eliminan por filtración, tal como mediante cualquiera de los métodos de filtración que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la matriz en fase sólida y cualquier componente unido se eliminan mediante filtración con membrana usando una membrana con un tamaño de poro de al menos 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o al menos 2,0 µm. En algunas realizaciones, el tamaño de poro de la membrana es superior o igual a 1,0 µm. Las matrices de fase sólida usadas en los procesos que se describen en el presente documento se pueden regenerar (por ejemplo, limpiar y reesterilizar) y se pueden usar para adsorción discontinua de nuevo.

Las preparaciones de virus producidas usando cualquiera de los procesos que se describen en el presente documento se pueden someter además a etapas de procesamiento adicionales, incluyendo etapas adicionales de filtración y/o liofilización. La preparación de virus también se puede someter a análisis para pureza de la preparación. Por ejemplo, la preparación de virus también se puede evaluar para la presencia de impurezas y contaminantes, ADN genómico de la célula hospedadora, y/o proteínas de la célula hospedadora. La pureza de una preparación de virus se puede evaluar usando cualquier método conocido en la técnica, tal como cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), densidad óptica a diferentes longitudes de onda, electroforesis en gel de proteína (por ejemplo, SDS-PAGE), transferencia de Western, ELISA, PCR, y/o qPCR.

En algunas realizaciones, la preparación de virus se evalúa para la cantidad de impurezas o contaminantes residuales. En algunas realizaciones, la cantidad de impurezas o contaminantes residuales se compara con la cantidad de impurezas o contaminantes en una etapa anterior en el proceso de purificación. En algunas realizaciones, la reducción relativa de impurezas en la preparación de virus final está entre un 60-95 % con respecto a la presencia de impurezas en una etapa anterior en el proceso de purificación. En algunas realizaciones, la reducción relativa de impurezas en la preparación de virus final es de aproximadamente un 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, o un 95 %. En algunas realizaciones, la preparación de virus final contiene menos de un 5 % de impurezas o contaminantes. En algunas realizaciones, la preparación de virus final contiene menos de un 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o menos de un 0,1 % de impurezas. En algunas realizaciones, la preparación de virus final contiene menos de un 1 % de impurezas.

En lo sucesivo, se describen diversas realizaciones de la invención:

1. Un proceso de purificación de partículas de virus que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un medio líquido que comprende partículas de virus, en el que las partículas de virus tienen un diámetro superior a aproximadamente 100 nm;

(b) poner en contacto las partículas de virus con una matriz en fase sólida que comprende un núcleo activado por ligando y una envoltura inactiva que comprende poros, en el que el umbral de corte de peso molecular de los poros impide que las partículas de virus entren en el núcleo activado por ligando, y en el que una molécula más pequeña que el umbral de corte de peso molecular de los poros puede entrar en el núcleo activado por ligando; y

(c) separar la matriz en fase sólida de las partículas de virus por filtración para producir una preparación de virus final;

en el que la matriz en fase sólida se usa como una suspensión y a una concentración final entre un 2,5 % (v/v) y

ES 2 741 011 T3

- un 30 % (v/v), preferentemente un 3,3 %, un 5 %, un 6,6 % o un 10 %, lo más preferentemente un 10 %; y en el que el proceso se realiza en condiciones asépticas.
- 5 2. El proceso de la realización 1, en el que el medio líquido que comprende las partículas de virus se somete a una o más etapa(s) de purificación previa antes de la etapa (b).
3. El proceso de la realización 1 o 2, en el que las partículas de virus tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm o más.
- 10 4. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que la molécula que entra en el núcleo de la matriz en fase sólida tiene un peso molecular inferior a 700 kDa.
- 15 5. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que el ligando del núcleo activado por ligando de la matriz en fase sólida es capaz de unirse a la molécula que entra en el núcleo activado por ligando mediante interacciones catiónicas, aniónicas, hidrófobas o mixtas.
6. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que el ligando del núcleo activado por ligando de la matriz en fase sólida es octilamina.
- 20 7. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que la matriz en fase sólida se incuba con el medio líquido que comprende las partículas de virus a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) con agitación durante al menos 1 hora, preferentemente 2 horas, 3 horas o 4 horas, lo más preferentemente 2 horas.
- 25 8. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en el que la reducción relativa de impurezas de la preparación de virus final con respecto al medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o partículas de virus están un intervalo de un 60 a un 95 %.
9. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en el que la filtración de la etapa (c) de la realización 1 se lleva a cabo usando un filtro que tiene un tamaño de poro igual o superior a 1 µm.
- 30 10. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 2 a 9, en el que la etapa de purificación previa comprende
- (a) digerir el ADN genómico de la célula hospedadora en el medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o partículas de virus por tratamiento enzimático; y/o
- 35 (b) ultra/diafiltración del medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o partículas de virus usando una membrana de fibra hueca que tiene un tamaño de poro igual o superior a 750 kDa.
11. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 10, en el que el proceso va seguido por una o más etapa(s) de filtración aséptica.
- 40 12. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 11, en el que la impureza residual de la preparación de virus final es inferior a un 1 %.
- 45 13. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 12, en el que el virus se propaga en una línea celular seleccionada entre el grupo que consiste en una línea de células EB66, una línea de células Vero, una línea de células Vero-aHis, una línea de células HeLa, una línea de células a HeLa-S3, una línea de células 293, una línea de células PC12, una línea de células CHO, una línea de células 3T3, una línea de células PerC6, una línea de células MDSK, una línea de células de fibroblastos embrionarios de pollo, una línea de células de pato, y una línea de células aviares diploides.
- 50 14. El proceso de la realización 13, en el que dicha línea celular es una línea de células de pato.
15. El proceso de la realización 13, en el que dicha línea celular es una línea de células aviares diploides.
- 55 16. El proceso de la realización 13, en el que dicha línea celular es la línea de células EB66.
17. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 16, en el que el virus es un virus vivo, un virus vivo atenuado, un virus vivo modificado, o un virus vivo recombinante.
- 60 18. El proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en el que el virus pertenece a una familia de virus seleccionada entre el grupo que consiste en *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae*, *Arenaviridae*, *Rhabdoviridae*, y *Coronaviridae*.
- 65 19. El proceso de la realización 18, en el que el virus pertenece a la familia de virus *Paramyxoviridae*.
20. El proceso de la realización 19, en el que el virus es el virus del sarampión.

También se describe el uso del proceso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 20 para preparar una composición para la inmunización frente a una infección viral y una composición que comprende las partículas de virus que se pueden obtener con el proceso de una cualquiera de las realizaciones 1 a 20 para tratar y/o prevenir una infección viral.

Cualquiera de los procesos que se describen en el presente documento se puede usar en la preparación de una composición que comprende virus purificados para su administración a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto mamífero, tal como un ser humano o un animal no humano, que incluye ganado, mascotas o animales de compañía. En algunas realizaciones, la composición se puede administrar a un sujeto que necesite inmunización frente al virus o virus similar al de la preparación del virus. En algunas realizaciones, las preparaciones de virus o composiciones que comprenden virus purificados usando los procesos que se describen en el presente documento son para tratar o prevenir la infección con el virus o un virus similar al de la preparación del virus.

Las preparaciones de virus o composiciones de virus purificados usando los procesos que se describen en el presente documento se pueden administrar a un sujeto mediante cualquier vía conocida en la técnica. En algunas realizaciones, las preparaciones o composiciones se pueden administrar a través de rutas convencionales, tales como por vía parenteral. Como se usa en el presente documento, la administración "parental" incluye, pero no se limita a, subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intratecal o por infusión.

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Los métodos y técnicas de la presente divulgación se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica. En general, las nomenclaturas usadas en relación con las técnicas de bioquímica, enzimología, biología molecular y celular, microbiología, virología, cultivo celular o tisular, genética y química proteica y nucleica que se describen en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente divulgación se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y se discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique de otro modo.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes Ejemplos, que de ninguna manera se deberían interpretar como una limitación adicional.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Desarrollo de un proceso de purificación para vacuna del virus del sarampión vivo producida en células EB66

Se desarrolló un proceso de purificación en sentido descendente para la vacuna atenuada frente al virus del sarampión producida en las células EB66®.

Aclarado de medios de cultivo celular infectados

Después de la producción del virus en el cultivo celular, las células se eliminaron por filtración. Tanto la filtración en profundidad como la filtración en membrana, así como los intervalos de separación adecuados (filtración en profundidad) y el tamaño de poro (filtración en membrana) se evaluaron para eliminar las células del sobrenadante del cultivo celular sin una pérdida significativa de partículas virales. Se usó un filtro combinado que contenía 3 µm/µm (Parker PLPLK-01DD-PNL-S) para separar las células de las partículas de virus. Después de la filtración, no se detectaron células EB66® en el sobrenadante aclarado mediante análisis microscópico visual.

Eliminación de ADN

La endonucleasa BENZONASE® se usó para eliminar el ADNg del sobrenadante de cultivo celular de extracción aclarado (la "extracción"). Se evaluaron diversas concentraciones de enzimas, temperaturas y tiempos. También se añadió una concentración mínima de Mg²⁺ o Mn²⁺ de 1 a 2 mM a la extracción con la enzima. El pH de la mezcla se mantuvo entre 7,2 y 8,0. La cantidad y el tamaño de cualquier ADN restante, así como cualquier pérdida de capacidad de infección viral, se sometieron a ensayo en varios puntos temporales.

Se usó una concentración final de enzima de 5 U/ml en una incubación durante toda la noche (~12-16 h) a temperatura ambiente (18-22 °C) para la degradación del ADN. El contenido y el tamaño de ADN restante se analizaron mediante qPCR para amplicones de 90, 176 y 316 pb. Usando estos métodos, la cantidad total de ADN de la célula hospedadora (HCD) se redujo de 440 ng a 0,5 ng para el ADN de tamaño mayor que 317 pb y de 1400 ng a 2 ng para el ADN de tamaño mayor que 176 pb (Tabla 1).

Purificación del virus del sarampión mediante filtración de flujo tangencial

Se aplicó un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) basado en fibra hueca y los parámetros correspondientes del proceso para minimizar las fuerzas de cizalladura y evitar la ruptura de la envoltura viral y la pérdida de capacidad de infección viral. Se encontró que diversos diámetros de lumen (de 0,5 a 1,0 mm) y caudales de recirculación tenían velocidades de cizalladura entre 1000 a 6000 s⁻¹. El umbral de corte de la membrana se optimizó para permitir la retención completa del virus del sarampión, mientras que se permitió que diversas impurezas (proteínas, fragmentos de ADN, componentes de los medios) pasaran a través de la membrana. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente, por lo que también se tuvo en cuenta el tiempo del proceso.

La extracción aclarada y tratada con BENZONASE® se concentró de 5 a 10 veces usando una membrana de fibra hueca de 750 kD (GE Healthcare) a un caudal correspondiente a una tasa de cizalladura de 2000 s⁻¹. Después de la concentración, se realizaron aproximadamente 10 ciclos de diafiltración usando el tampón PBS para eliminar las impurezas restantes (por ejemplo, componentes de los medios, proteínas de la célula hospedadora (HCP), fragmentos de ADN). Los excipientes para la estabilización del virus (es decir, para la posterior liofilización) se pueden añadir en el tampón de diafiltración directamente o se pueden añadir como solución de reserva al volumen viral concentrado. A pesar de las condiciones suaves aplicadas en el proceso que se ha descrito anteriormente, la pérdida total de capacidad de infección viral fue de casi 1 log TCID₅₀ (50 % de la Dosis de Infección de Cultivo Tisular).

Purificación del virus del sarampión mediante adsorción discontinua

Se desarrolló una etapa de proceso de adsorción discontinua opcional que se podría aplicar después de la etapa de ultra/diafiltración. Se evaluaron diversas resinas de cromatografía con diferentes ligandos (modo catiónico, aniónico, hidrófobo y mixto) para determinar la unión de impurezas residuales (por ejemplo, las HCP, fragmentos de ADN), mientras que el virus del sarampión se mantuvo en el sobrenadante. El uso de la resina CAPTO® Core 700 (GE Healthcare) dio como resultado una mayor reducción de las HCP con una alta recuperación de MV-GFP (un virus del sarampión vivo atenuado (cepa de Schwartz) que codifica la proteína fluorescente verde). La resina CAPTO® Core 700 está formada por un núcleo activado por ligando y una envoltura inactiva. La envoltura inactiva evita que las moléculas grandes (MWCO aproximadamente 700 kDa) entren en el núcleo a través de los poros de la envoltura. Por lo tanto, las moléculas más grandes se recogen en el sobrenadante, mientras que las impurezas más pequeñas se unen a los ligandos internos de la resina. El núcleo de cada perla de la resina está funcionalizado con ligandos que son hidrófobos y con carga positiva, lo que da como resultado una unión multimodal altamente eficaz de varias impurezas lo suficientemente pequeñas como para entrar en el núcleo. La concentración final de la suspensión después de la adición se optimizó a un 10 % en v/v. Después de la adición del medio CAPTO® Core 700, las residuales HCP se pueden reducir aún más. De forma interesante, los fragmentos de ADN restantes no se unieron a la resina. La evaluación de las impurezas restantes y la capacidad infección viral se presentan en la Tabla 1.

Pulido Final mediante Filtración

Una etapa final de pulido se llevó a cabo filtrando en membrana el volumen viral concentrado con o sin resina CAPTO® Core 700. Se evaluaron los filtros de membrana con tamaño de poros en el intervalo de 1-2 µm, y se evaluó la recuperación de partículas de virus.

Tabla 1: Eliminación de impurezas mediante el proceso de purificación

Muestra	ADNhc por qPCR (ng/ml)			HCP por ELISA	Benzonasa Residual	Concentración capacidad de infección viral	Capacidad de infección Total
	90 pb	176 pb	317 pb	µg/ml	ng/ml	Log ₁₀ TCI D ₅₀ / ml	Log ₁₀ TCI D ₅₀
Extracción RG25 MV (volumen de partida ~1 l)	4003	1400	440	208	-	6,60	9,60
Extracción RG25 Aclarada + Benzonasa	11	2,0	0,5	-	Adición de 5 U/ml*	6,74	9,74
Fracción retenida de UF/DF (0,2 l) (concentrado 5x, 10 ciclos de diafiltración)	14	3,7	1,2	31		6,50	8,80
Sobrenadante después de adsorción discontinua (0,22 l) (Sustancia farmacológica antes de la filtración final)	14	3,8	1,2	< 10		6,17	8,51

Métodos

Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se usó para determinar la pureza del virus en todo el proceso de purificación con respecto a las impurezas (por ejemplo, HCP, ADN) que también generan absorción UV. La Figura 2 y la Tabla 2 presentan una aproximación de la pureza viral en todo el proceso de purificación. Se observó una reducción significativa de las impurezas (principalmente proteínas de la célula hospedadora).

La SEC se aplicó junto con absorción UV (a diversas longitudes de onda) y emisión de fluorescencia (específica para GFP) para el análisis de virus. En resumen, la separación se realizó en una columna Sephacryl S500 (10 x 300 mm; intervalo de separación de hasta 20 Mio Da) en tampón PBS suplementado con cloruro de sodio 250 mM a un caudal de 0,5 ml/min. Las señales de UV se registraron a 214 nm, 280 nm y 260 nm. La fluorescencia se detectó a una longitud de onda de EM509 nm (EX395 nm) que es específica para GFP. Los datos adicionales con respecto al tamaño del virus se recogieron mediante la conexión de la SEC a un detector de dispersión de luz estática en múltiples ángulos (MALS). El tamaño de la partícula viral se midió con un instrumento miniDAWN® TREOS® (Wyatt). Un ejemplo de cromatograma de una muestra de extracción se muestra en la Figura 6, y una preparación de virus altamente purificada se muestra en la Figura 7.

Tabla 2: Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de trazas presentadas en la Figura 2

Muestra	Pureza de ac. con SEC (214 nm) (área del pico del virus con respecto al área total)
Extracción de RG25 MV	1 %
Extracción RG25 Aclarada + Benzonasa	3 %
Fracción retenida de UF/DF (concentrado 5x, 10 ciclos de diafiltración)	43 %
Sobrenadante después de adsorción discontinua	70 %

SDS-PAGE y Transferencia de Western

Además de un ELISA cuantitativo, la presencia y reducción de proteínas de la célula hospedadora en todo el proceso de purificación se monitorizó cualitativamente mediante SDS-PAGE y Transferencia de Western (Figuras 3A, 3B, 4A y 4B). Además, la presencia de proteínas virales se detectó usando anticuerpos específicos (Figura 4C).

En resumen, las muestras reducidas se separaron en gel BisTris al 4-12 % durante 50 minutos a 200 V. Los geles teñidos con plata o no teñidos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para la transferencia de Western. La HCP o la proteína del virus se detectaron con los anticuerpos apropiados (proteína de fusión del virus (F) anti-EB66®-HCP-IgG o anti-Sarampión, respectivamente). Como anticuerpo secundario se usó conjugado anti-conejo IgG-HRP.

Análisis de Rastreo de Nanopartículas

Se usó análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) para determinar la concentración y el tamaño de las to partículas de virus usando un instrumento NanoSight. Los cambios en el tamaño de las partículas durante el proceso en sentido descendente (DSP) pueden ser indicativos de la pérdida de integridad de las partículas virales. Se encontró que el tamaño de partícula de los viriones estaba en el intervalo de ~100 - 400 nm de acuerdo con NTA (Figuras 5A-5B). La distribución del tamaño no era uniforme, pero mostró un pleomorfismo significativo (de acuerdo con la bibliografía) pero se mantuvo casi constante durante la purificación. Los gráficos de análisis de rastreo de la extracción y después de la diafiltración no mostraron cambios significativos en la distribución del tamaño de partícula, como se ilustra en las Figuras 5A-5B.

Cuantificación de ADN de Célula Hospedadora (HCD)

El ADN de la célula hospedadora residual de EB66® se determinó mediante qPCR. En resumen, se amplificaron tres fragmentos diferentes parcialmente superpuestos de LINE (elementos de nucleótidos intercalados largos) (90, 176 y 319 pb) (véase, por ejemplo, Walker *et al.*, (2004) Genomics 83: 518-527). Los LINE a son secuencias variables repetitivas presentes en numerosas copias en el genoma del pato. La cuantificación del ADN de la célula hospedadora residual EB66® se llevó a cabo mediante la amplificación del fragmento de 176 pb. Los otros dos amplicones de qPCR (90 y 316 pb) se usaron para determinar la distribución de tamaño del ADN de la célula hospedadora residual de EB66®. El límite de cuantificación (LOQ) de las tres amplificaciones fue de 0,01 ng/ml y el coeficiente de variación (CV) para la amplificación del fragmento de 176 pb fue de un 21,3 %, tal como se determina en el ensayo de validación.

Evaluación de Proteínas de Célula Hospedadora

La presencia de proteína de célula hospedadora residual (HCP) de EB66® se determinó mediante ELISA. En resumen, los anticuerpos policlonales de conejo purificados se obtuvieron inmunizando conejos con lisado de células completas EB66® y se purificaron por afinidad con EB66-HCP acoplado a SEPHAROSE® y se usaron para la detección de HCP residual. Las placas de microtitulación se revistieron con los anticuerpos policlonales y a continuación se incubaron con muestras de ensayo y controles. Las proteínas EB66® capturadas se detectaron con anticuerpos policlonales secundarios biotinilados de conejo. El intervalo dinámico del ensayo fue de 5 - 1280 ng/ml, y el CV del ensayo fue de un 9,2 %, tal como se obtuvo a partir de la tabla de control.

Detección de Benzonasa Residual

El BENZONASE® residual se determinó usando un kit ELISA disponible en el mercado (Benzonase ELISA II, Art. 1.01681 de Merck). En resumen, se usaron placas de microtitulación revestidas previamente para capturar el BENZONASE® residual que se detectó con un anticuerpo de detección acoplado a HRP. El límite de detección para ELISA fue de 0,1 ng/ml.

El proceso de purificación MV-GFP mostró una eliminación eficaz del ADN de la célula hospedadora. El contenido inicial de ADN de la célula hospedadora de la extracción fue de 1400 ng/ml para el amplicón de 176 pb y 440 ng/ml para el amplicón de 317 pb. El ADN de la célula hospedadora se eliminó de manera eficaz mediante el tratamiento con Benzonasa y se mantuvo casi constante a lo largo de las etapas de purificación posteriores. De acuerdo con el análisis de qPCR del amplicón de 176 pb, la concentración de ADN de la célula hospedadora residual después de ultrafiltración/diafiltración fue inferior a 4 ng/ml. Los fragmentos de ADN más grandes, de acuerdo con lo analizado por el amplicón de 317 pb, fueron de aproximadamente 1 ng/ml. La aplicación de cromatografía discontinua no redujo aún más el contenido de ADN residual. Las composiciones finales que se administran a los sujetos se ajustan a al menos 10^3 TCID50/dosis. Puede ser necesaria una dilución adicional de la preparación de virus ($\sim 10^6$ TCID50) y podría reducir el contenido final del ADN de la célula hospedadora a una cantidad estimada de aproximadamente 0,4 a 0,04 ng/dosis.

La concentración final de proteína de la célula hospedadora determinada por ELISA fue inferior a 10 µg/ml, que también se podría reducir aún más a menos de 1 µg por dosis. La detección y cuantificación de BENZONASE® usando el ensayo ELISA II de BENZONASE® sugiere que el BENZONASE® residual se puede eliminar de manera eficaz durante el proceso de purificación, lo que da como resultado una concentración final por debajo del límite de detección del ensayo (< 0,1 ng/ml).

Ejemplo 2: Optimización de la etapa de cromatografía de adsorción discontinua

Para reducir aún más las impurezas residuales en el material de MV-GFP después de la etapa de ultra/diafiltración se desarrolló adsorción discontinua con una resina de cromatografía como adsorbente. La adsorción discontinua es una etapa única e implica la adición del adsorbente (resina) al material de MV-GFP en un recipiente de mezcla adecuado y la incubación durante un periodo de tiempo definido. El adsorbente se elimina posteriormente, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación. El adsorbente se puede introducir asépticamente en una bolsa de proceso después de la esterilización del adsorbente en autoclave. En la Figura 8 se muestra un diagrama de flujo del proceso. El montaje del proceso, incluida la adsorción discontinua, se muestra en diagrama en la Figura 9.

Identificación sistemática de resinas para adsorción discontinua

Para identificar una resina adecuada para la reducción de impurezas residuales, se llevó a cabo una identificación sistemática de diversas resinas de cromatografía con diferentes ligandos (modo catiónico, aniónico, hidrófobo y mixto) a pequeña escala. Las resinas sometidas a ensayo incluyeron CAPTO® Core 700, CAPTO® DEAE, CAPTO® MMC, CAPTO® Q, CAPTO® S, FRACTOGEL® TMAE, Hidroxiapatita de Tipo II y QSFF.

Cada una de las diferentes resinas de cromatografía se preparó como una suspensión al 50 % en PBS y se añadió un 10 % en v/v a la extracción de MV-GFP después de ultrafiltración/diafiltración. Todas las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C. Las resinas se eliminaron por centrifugación. Los sobrenadantes se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño, como se describe en el Ejemplo 1. La resina CAPTO® Core 700 mostró una reducción significativa de las impurezas residuales (HCP) a la vez que conservaba una alta recuperación de MV-GFP (Tabla 3).

Tabla 3: Identificación sistemática de resinas de cromatografía para selección de la matriz en fase sólida

Resina*	Recuperación de MV-GFP [%]	Recuperación de impurezas [%]
CaptoCore700	100	39
CaptoDEAE	89	73
CaptoMMC	95	66 5
CaptoQ	77	69

CaptoS	101	100
FractogelTMAE	48	53
Hix T II	74	50
QSFF	84	67

También se evaluaron combinaciones de resinas, incluyendo CAPTO® Core 700 con QSFF y CAPTO® Core 700 con Hidroxiapatita (Hix T II). Las suspensiones al 50 % de cada uno de CAPTO® Core 700 y las combinaciones se prepararon en PBS y se añadió un 10 % en v/v a la extracción de UF/DF MV-GFP. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las resinas se eliminaron mediante centrifugación y los sobrenadantes se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño. A pesar de que el uso de la resina CAPTO® Core 700 dio como resultado una reducción de las impurezas residuales (HCP) a la vez que mantenía una alta recuperación de MV-GFP, las combinaciones de CAPTO® Core 700 y QSFF y CAPTO® Core 700 e Hix no mejoraron la reducción de impurezas residuales ni la recuperación de MV-GFP (Figura 10).

La cantidad de suspensión CAPTO® Core 700 añadida a la muestra viral también se optimizó. La suspensión de CAPTO® Core 700 (50 % en PBS) a una concentración de un 33 % (v/v) a un 2,5 % (v/v) se sometió al ensayo. En resumen, la suspensión de CAPTO® Core 700 se añadió a la extracción de MV-GFP con ultrafiltración/diafiltración y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las resinas se eliminaron mediante centrifugación y los sobrenadantes se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Los resultados indicaron que la adición de la suspensión > 10 % (v/v) no mejoró de forma significativa la reducción de las impurezas residuales en comparación con la adición de la suspensión añadida al 10 % (v/v), y además afectaba a la recuperación de MV-GFP (Figura 11). Las adiciones de suspensiones de menos de un 10 % (v/v) dieron como resultado produjeron un pequeño aumento de la cantidad de impurezas recuperadas, pero mejoraron la cantidad de virus recuperado en comparación con la muestra de un 10 % (v/v) (Figura 11). La concentración de suspensión más baja sometida al ensayo fue de un 2,5 % (v/v) y se eliminó aproximadamente un 75 % de las impurezas residuales en comparación con la muestra no tratada (Figura 11).

Desarrollo de Procesamiento en Sentido Descendente

Después de la optimización de la adsorción discontinua de CAPTO® Core 700, el método se evaluó con muestras del desarrollo del proceso en sentido descendente (DSP) de MV-GFP. Se sometieron a ensayo muestras de varias ejecuciones de desarrollo de DSP. En resumen, el material de extracción concentrado se concentró usando el proceso de TFF del módulo de fibra hueca que se ha descrito anteriormente, y a continuación se sometió a varios ciclos de diafiltración (es decir, 5, 10, 15 y 20 cambios de volumen). Una visión general de los resultados de todos los experimentos llevados a cabo se muestra en la Tabla 4.

La reducción relativa de las impurezas en comparación con el material procesado sin adsorción discontinua estaba entre un 66 y un 93 %. La pureza de las preparaciones de MV varió de un 50 a un 76 % y se consiguió en muestras procesadas con 20 ciclos de diafiltración (intercambios de volumen de tampón) combinados con la adsorción discontinua. Los rendimientos virales del material procesado con adsorción discontinua fueron comparables con el rendimiento del material respectivo procesado sin adsorción discontinua.

El material de extracción se filtró y se trató con 50 Unidades de BENZONASE® para digerir el ADN de la célula hospedadora. El material se concentró mediante TFF con un módulo de fibra hueca de 750 kDa y posteriormente se sometió a diafiltración frente a PBS. Las muestras se eliminaron del material concentrado y después de 5, 10, 15 y 20 intercambios de volúmenes. La suspensión CAPTO® Core 700 se añadió una concentración de un 10 % (v/v) a las muestras de cada etapa. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se eliminó mediante centrifugación y los sobrenadantes se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y electroforesis en gel SDS-PAGE.

Las recuperaciones de MV-GFP e impurezas residuales en muestras sometidas a adsorción discontinua y muestras que no se sometieron a adsorción discontinua se presentan en la Figura 12. Se muestra la reducción relativa de impurezas residuales en muestras con adsorción discontinua con respecto a las muestreadas sin adsorción discontinua en la Figura 13. Aunque la recuperación relativa de MV-GFP se mantuvo estable en todas las muestras, las impurezas residuales se redujeron de forma significativa mediante la adsorción discontinua usando muestras de CAPTO® Core 700. Se consiguió una reducción de un 82 % en las impurezas recuperadas cuando las muestras se procesaron con 20 cambios de volumen de diafiltración (20 DV) y adsorción discontinua usando la resina CAPTO® Core 700 en comparación con las muestras procesadas con 20 DV pero sin adsorción discontinua.

Los rendimientos generales de MV-GFP recuperado de muestras procesadas con y sin adsorción discontinua se calcularon con datos de cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 14). El rendimiento de MV-GFP después de 20 ciclos de diafiltración fue de un 51 % en muestras procesadas sin adsorción discontinua y de un 54 % para las muestras procesadas con adsorción discontinua.

- La pureza del material de MV-GFP después de cada etapa del proceso se evaluó cuantitativamente mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño y cualitativamente mediante electroforesis SDS-PAGE. La pureza del material de MV-GFP mejoró de forma significativa después de la adsorción discontinua (Figura 15 y Figura 16).
- 5 Aunque la pureza máxima alcanzada sin la adsorción discontinua fue de un 29 % con la muestra de 20 DV, ya se consiguió una pureza comparable después de de solo 5 intercambios de volumen de diafiltración (5 DV) combinados con la adsorción discontinua. Esto presenta una reducción significativa del tiempo de procesamiento. El mayor nivel de pureza (69 %) se consiguió con la muestra de 20 DV combinada con la adsorción discontinua.
- 10 La reducción de impurezas residuales en muestras procesadas con y sin adsorción discontinua en comparación con una muestra de extracción concentrada se muestra en la Figura 17. Sin adsorción discontinua, las impurezas residuales se redujeron en un 96 % o log 1,4. Usando adsorción discontinua con CAPTO® Core 700, las impurezas residuales se redujeron en > 99 % o log 2,2.
- 15 En conclusión, la adsorción discontinua con resina CAPTO® Core 700 permitió una reducción significativa de las impurezas residuales sin un impacto negativo en el rendimiento del virus. La adsorción discontinua con la resina CAPTO® Core 700 dio como resultado un nivel de pureza del virus que no se podía conseguir solo con la diafiltración. Los niveles de pureza después de 20 ciclos de diafiltración sin adsorción discontinua se consiguieron con solo 5 ciclos de diafiltración combinados con la adsorción discontinua.
- 20

Tabla 4: Visión general de experimentos de adsorción discontinua de MV

Experimento	Material de MV	DV	Reducción de impurezas comp. con spl. c/s CC700 (%)	Pureza de MV (%)		Rendimiento de MV (%)	
				c/ CC700	c/s CC700	c/ CC700	c/s CC700
MV Adsorción discontinua 20140306	Extracción RG25 de MV, muestras de Filtertest 20140207 combinadas, digestión c/ 50 U Benzonasa o/n, TA°, 5,7 x conc	5	56	29	17	64	74
		10	77	57	24	63	64
		15	80	65	26	67	62
		20	82	69	29	54	51
MV Adsorción discontinua 20140314	Extracción RG25 de MV, muestras de Filtertest 20140207 combinadas, digestión c/ 50 U Benzonasa o/n, TA°, 5,7 x conc	5	n.a.	17	n.a.	19	n.a.
		10	68	38	16	25	25
		15	71	47	20	29	28
		20	66	50	22	24	24
MV Adsorción discontinua 20140320	Extracción RG25 de MV, muestras A-C de Filtertest 20140206 combinadas, 5,6 x conc	5	45	30	18	105	99
		10	62	55	30	86	81
		15	71	72	41	72	67
		20	69	76	48	66	64
MV Adsorción discontinua 20140327	Extracción RG25 de MV, digestión c/ 50 U Benzonasa o/n, TA°, 10 x conc	5	32	13	9	45	46
		10	63	37	18	30	31
		15	70	50	22	28	27
		20	93	61	25	26	22
MV Adsorción discontinua 20140424	Extracción RG25 de MV, digestión c/ 5 U Benzonasa o/n, TA°, 10 x conc	5	43	17	10	202	194
		10	59	29	16	193	206

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de purificación de partículas de virus que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un medio líquido que comprende partículas de virus, en el que las partículas de virus tienen un diámetro superior a aproximadamente 100 nm;
 (b) poner en contacto las partículas de virus con una matriz en fase sólida que comprende un núcleo activado por ligando y una envoltura inactiva que comprende poros, en el que el umbral de corte de peso molecular de los poros impide que las partículas de virus entren en el núcleo activado por ligando, y en el que una molécula más
 10 pequeña que el umbral de corte de peso molecular de los poros puede entrar en el núcleo activado por ligando; y
 (c) separar la matriz en fase sólida de las partículas de virus por filtración para producir una preparación de virus final;

15 en el que la matriz en fase sólida se añade al medio líquido que comprende la partícula de virus como una suspensión a una concentración final entre un 2,5 % (v/v) y un 30 % (v/v), preferentemente un 3,3 %, 5 %, 6,6 % o 10 %, lo más preferentemente un 10 %; y en el que el proceso se lleva a cabo en condiciones asépticas.

20 2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el medio líquido que comprende las partículas de virus se somete a una o más etapa(s) de purificación previa antes de la etapa (b).

3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en el que las partículas de virus tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm o más.

25 4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la molécula que entra en el núcleo de la matriz en fase sólida tiene un peso molecular inferior a 700 kDa.

5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la matriz en fase sólida se incuba con el medio líquido que comprende las partículas de virus a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) con agitación durante al menos 1 hora, preferentemente 2 horas, 3 horas o 4 horas, lo más preferentemente 2 horas.

30 6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la filtración de la etapa (c) de la reivindicación 1 se lleva a cabo usando una membrana con un tamaño de poro de al menos 0,5 µm.

35 7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la filtración de la etapa (c) de la reivindicación 1 se lleva a cabo usando un filtro que tiene un tamaño de poro igual o superior a 1 µm.

8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la etapa de purificación previa comprende

- 40 (a) digerir el ADN genómico de la célula hospedadora en el medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o las partículas de virus por tratamiento enzimático; y/o
 (b) ultra/diafiltración del medio líquido que comprende la pluralidad de los virus o las partículas de virus usando una membrana de fibra hueca que tiene un tamaño de poro igual o superior a 750 kDa.

45 9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el proceso va seguido por una o más etapa(s) de filtración aséptica.

10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la impureza residual de la preparación de virus final es inferior a un 1 %.

50 11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el virus se propaga en una línea celular seleccionada entre el grupo que consiste en una línea de células EB66, una línea de células Vero, una línea de células Vero-aHis, una línea de células HeLa, una línea de células a HeLa-S3, una línea de células 293, una línea de células PC12, una línea de células CHO, una línea de células 3T3, una línea de células PerC6, una línea de células MDSK, una línea de células de fibroblastos embrionarios de pollo, una línea de células de pato, y una línea de
 55 células aviares diploides.

12. El proceso de la reivindicación 8, en el que dicha línea celular es la línea de células EB66.

60 13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el virus pertenece a una familia de virus seleccionada entre el grupo que consiste en *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Filoviridae*, *Arenaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae*, *Baculoviridae*, y *Poxviridae*.

14. El proceso de la reivindicación 13, en el que el virus pertenece a la familia de virus *Paramyxoviridae*.

65 15. El proceso de la reivindicación 14, en el que el virus es el virus del sarampión.

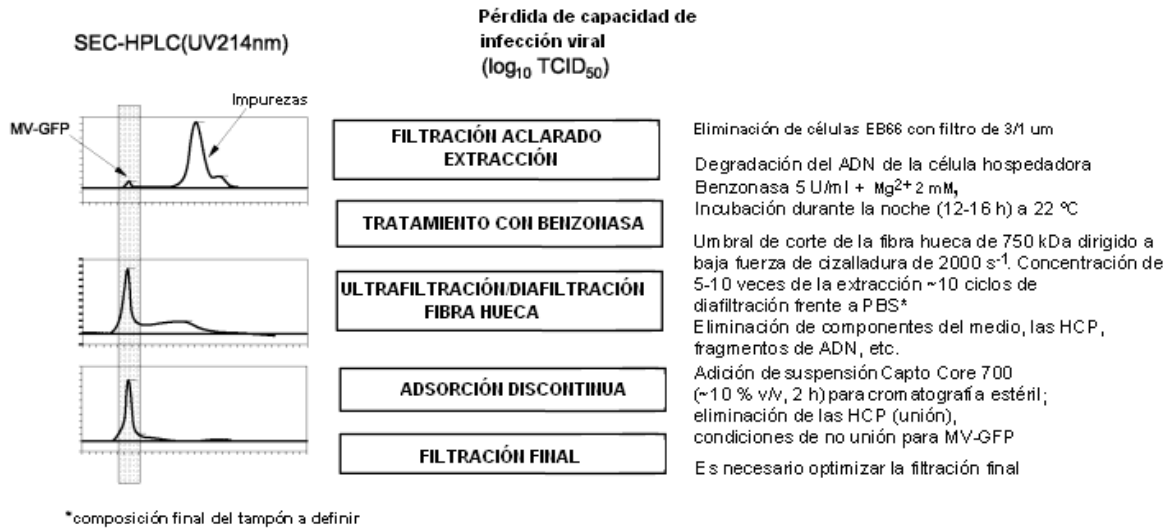


FIG. 1

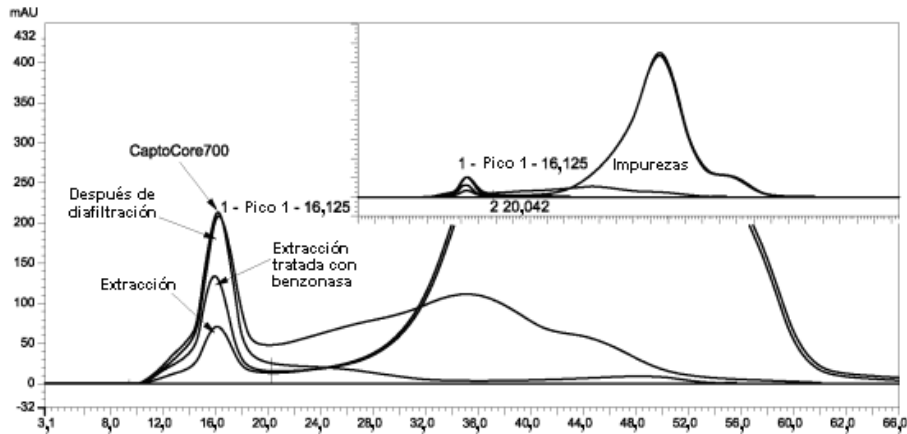


FIG. 2

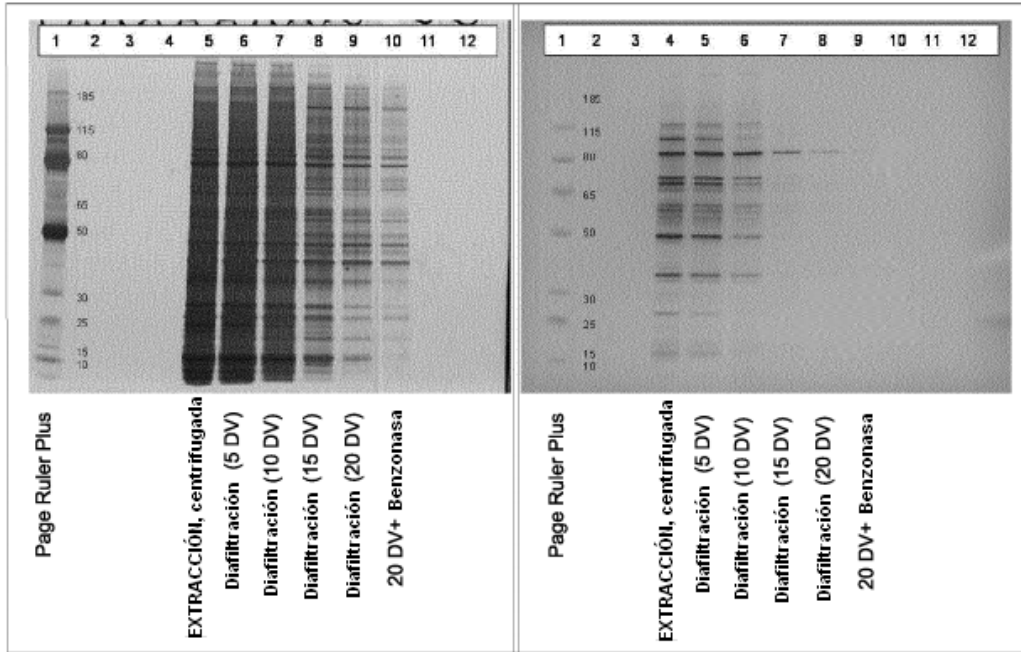


FIG. 3A

FIG. 3B

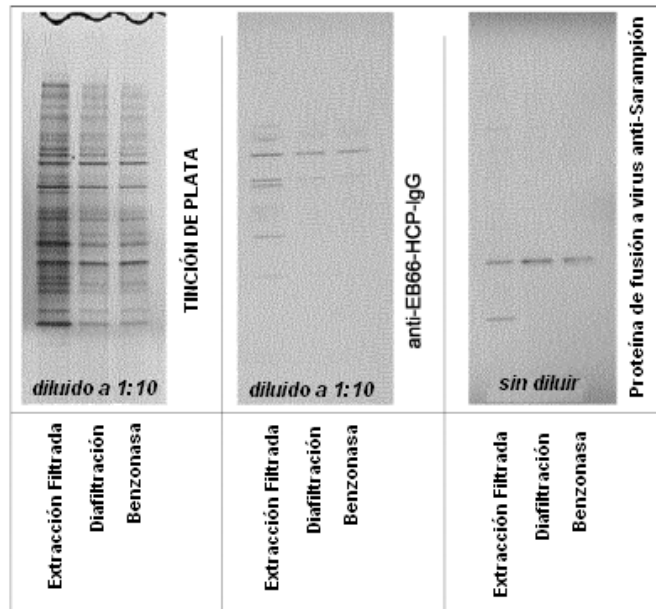


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

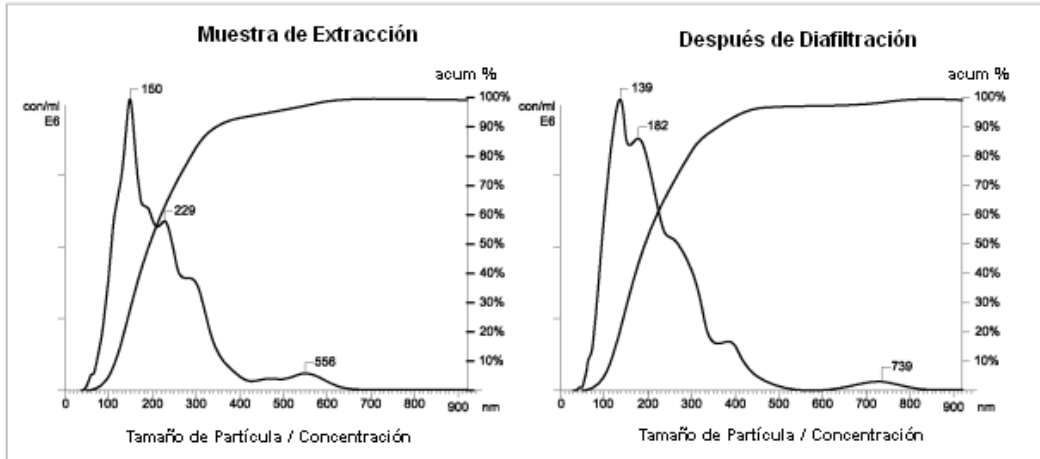


FIG. 5A

FIG. 5B

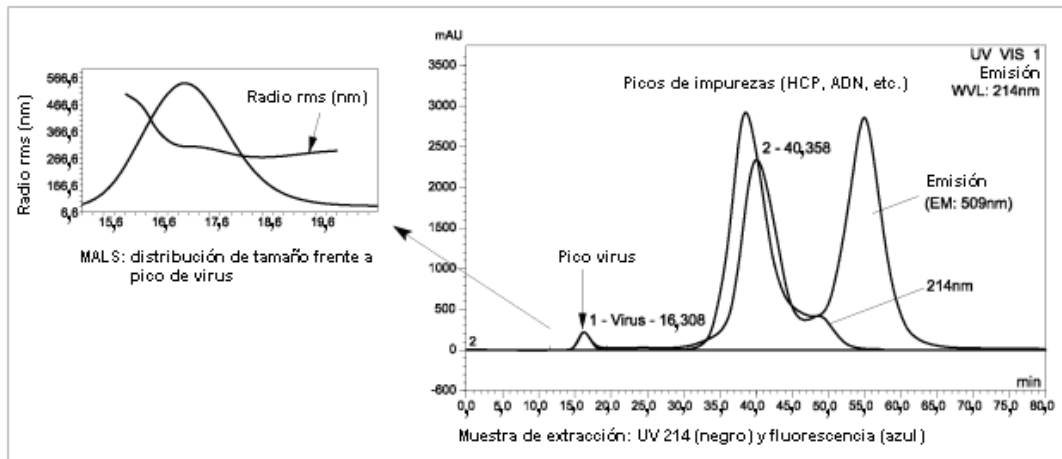


FIG. 6

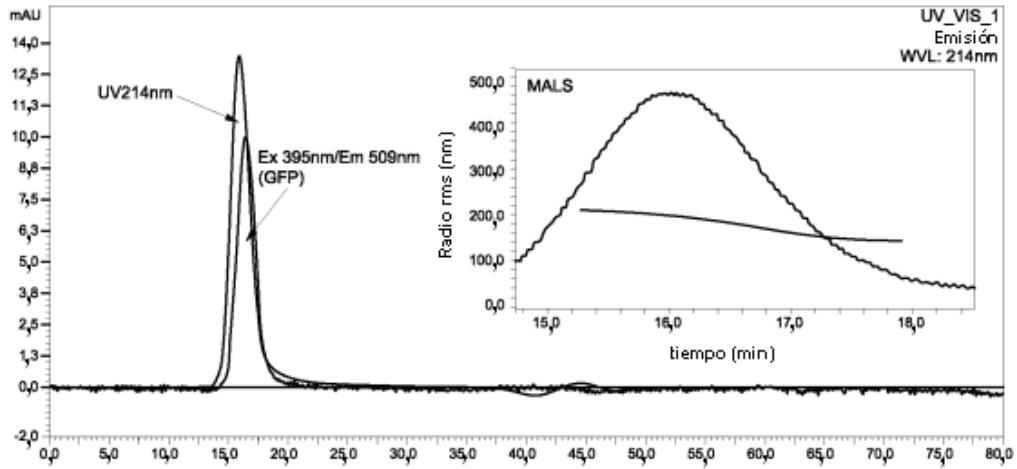


FIG. 7

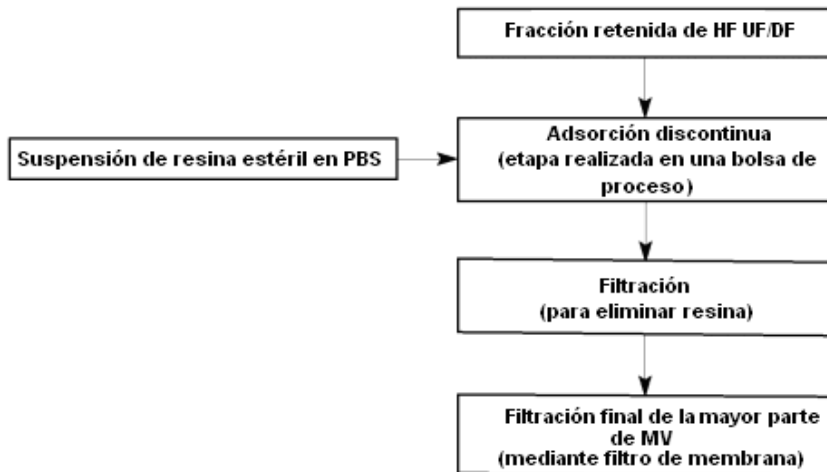


FIG. 8

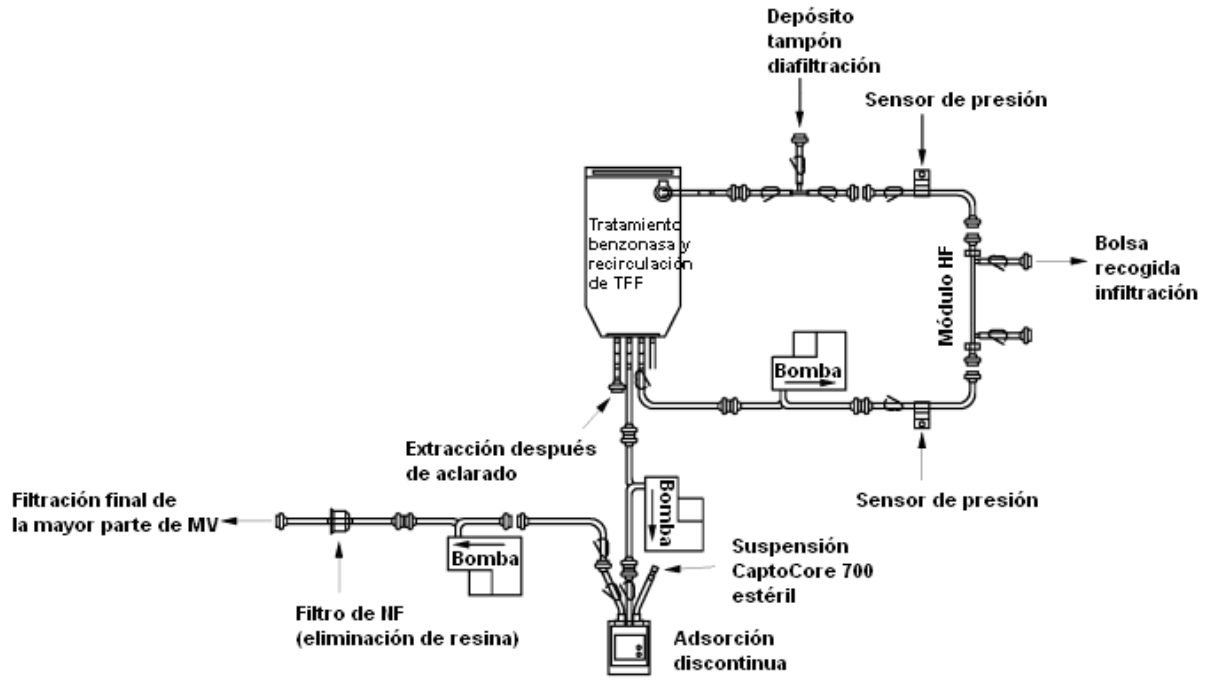


FIG. 9

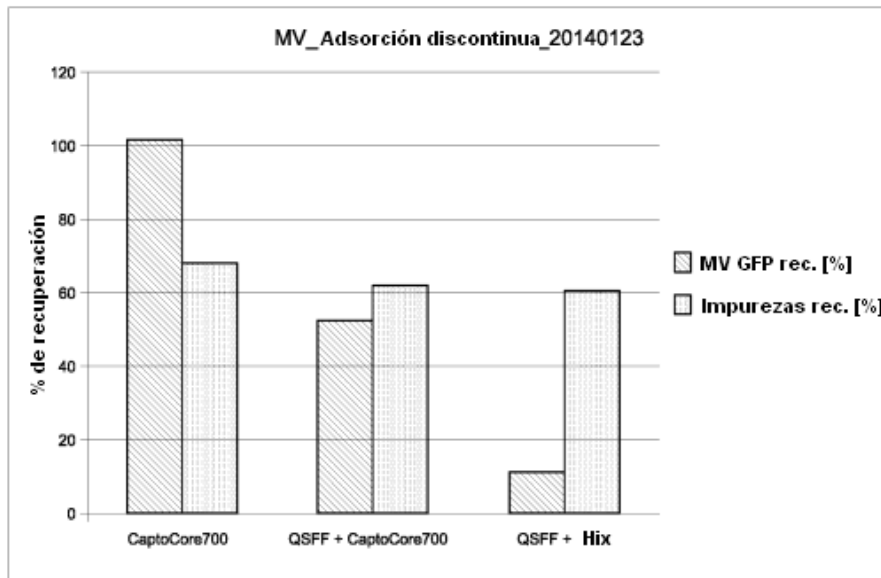


FIG. 10

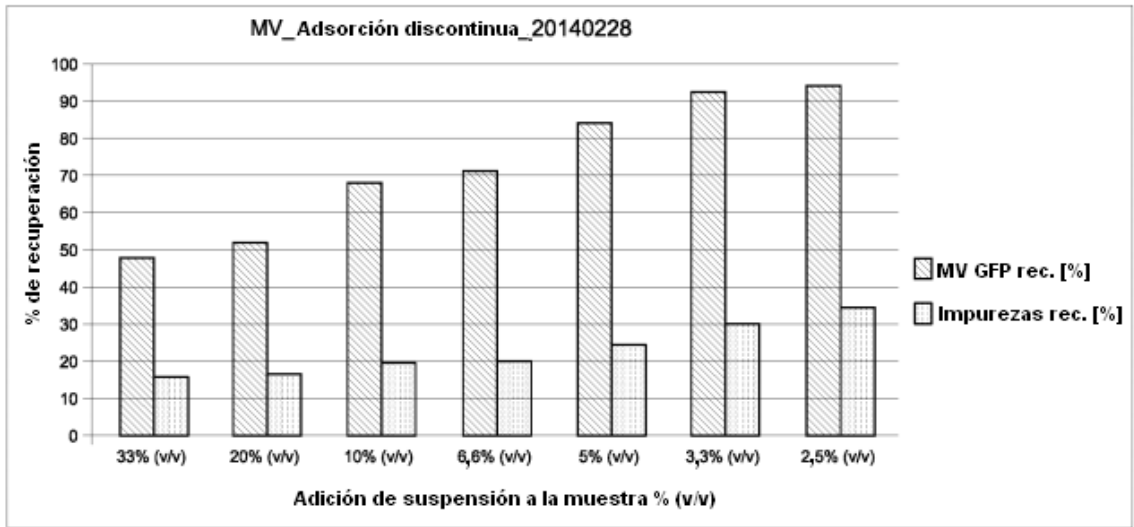


FIG. 11

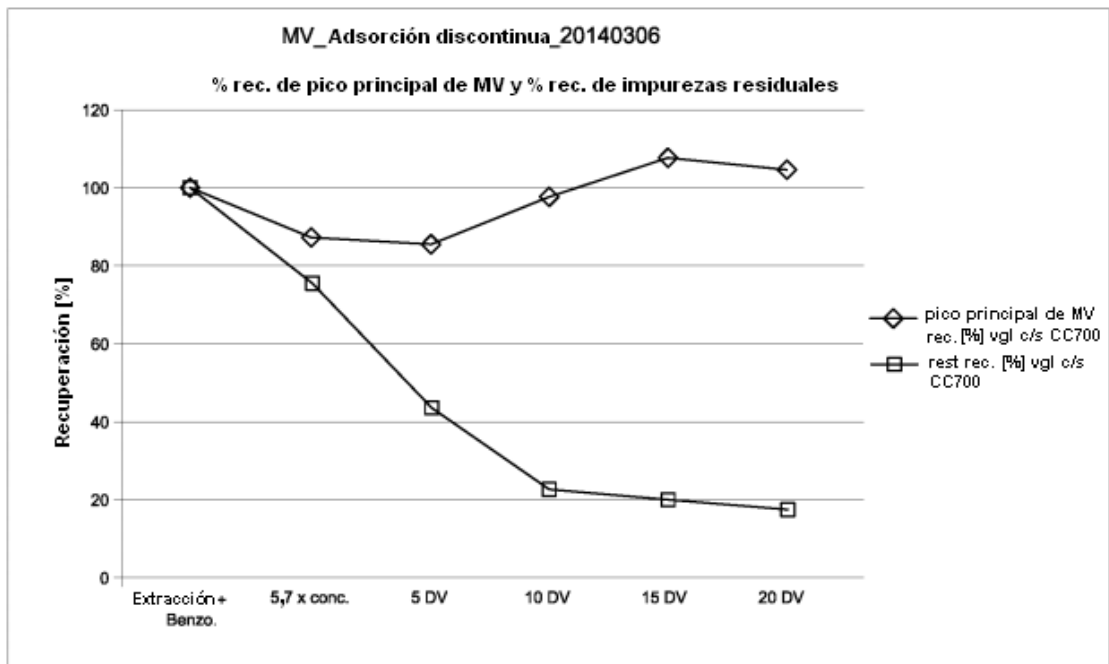


FIG. 12

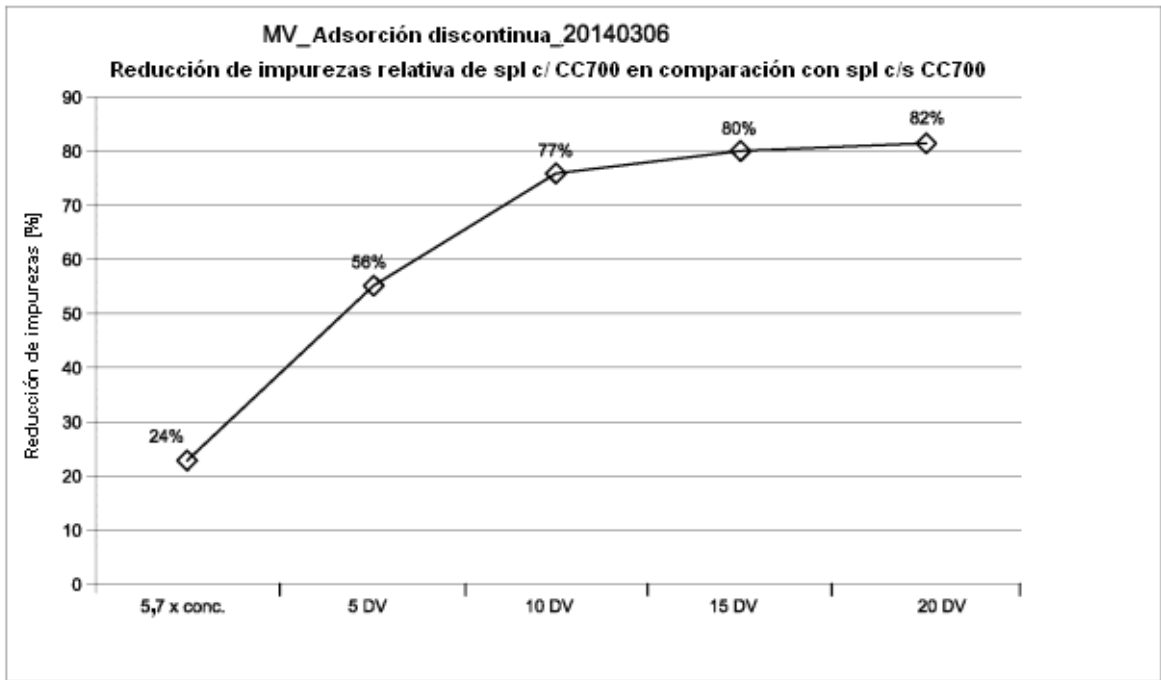


FIG. 13

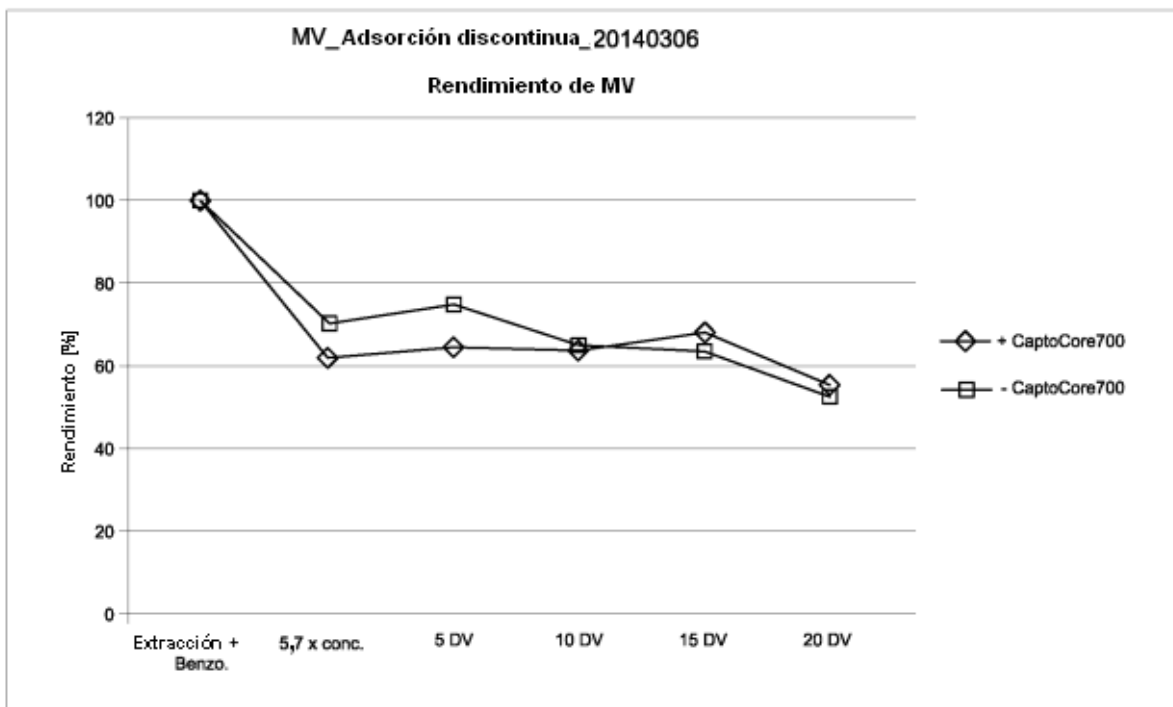


FIG. 14

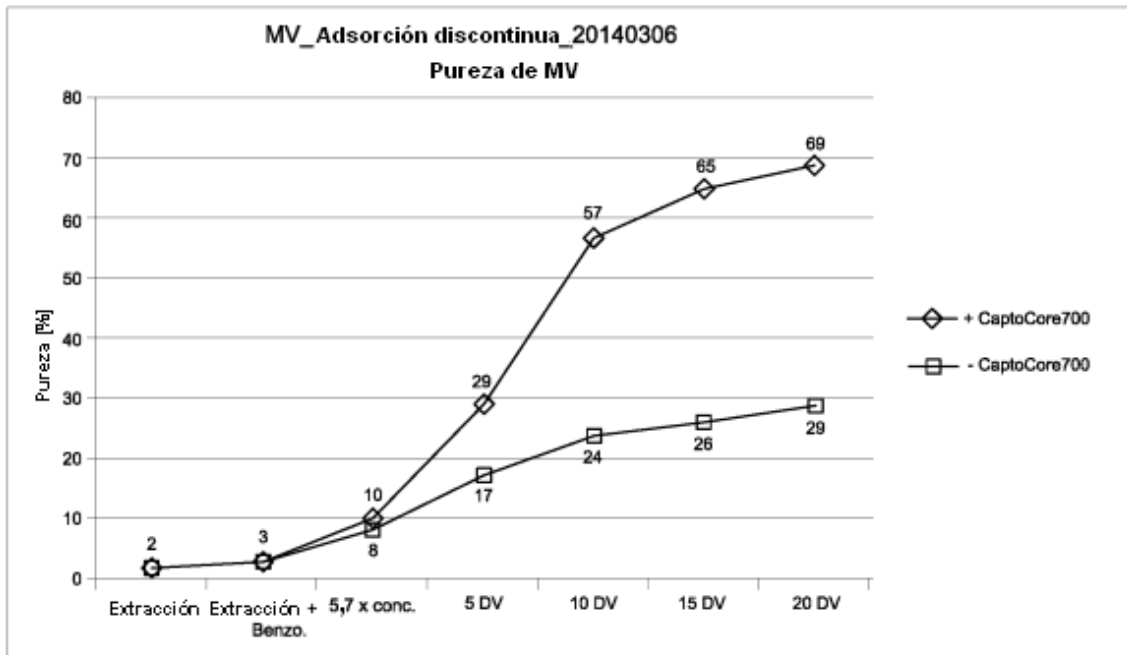


FIG. 15

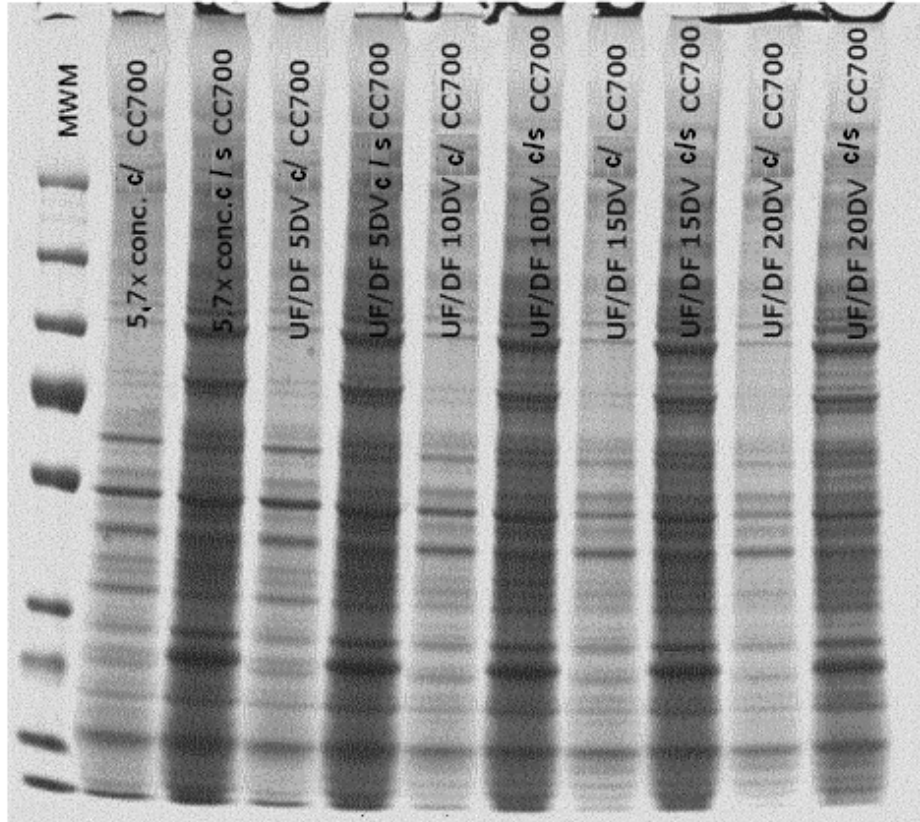


FIG. 16

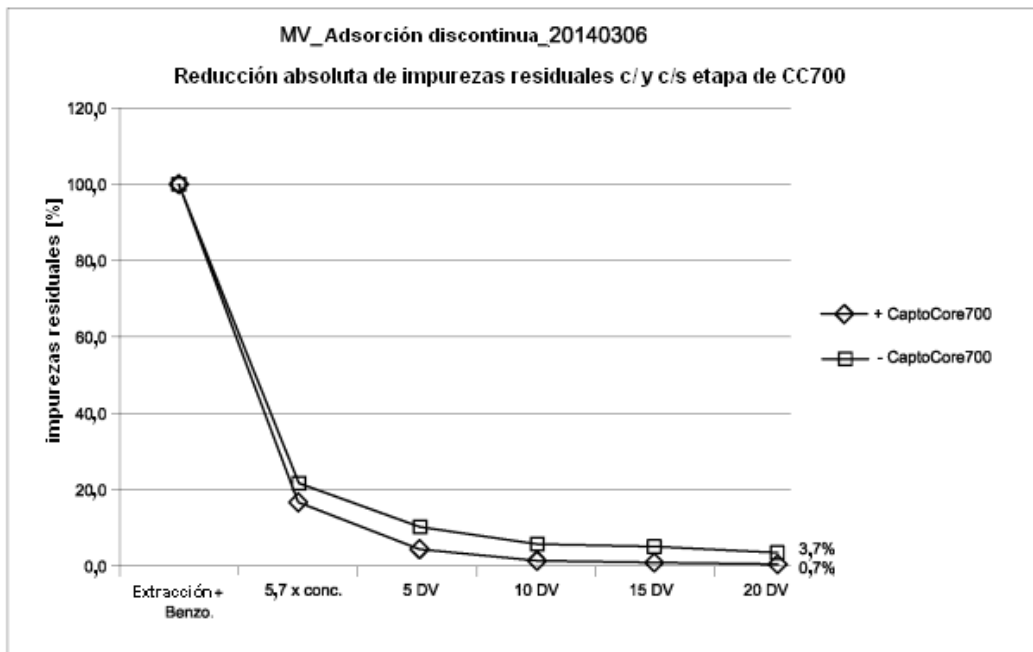


FIG. 17

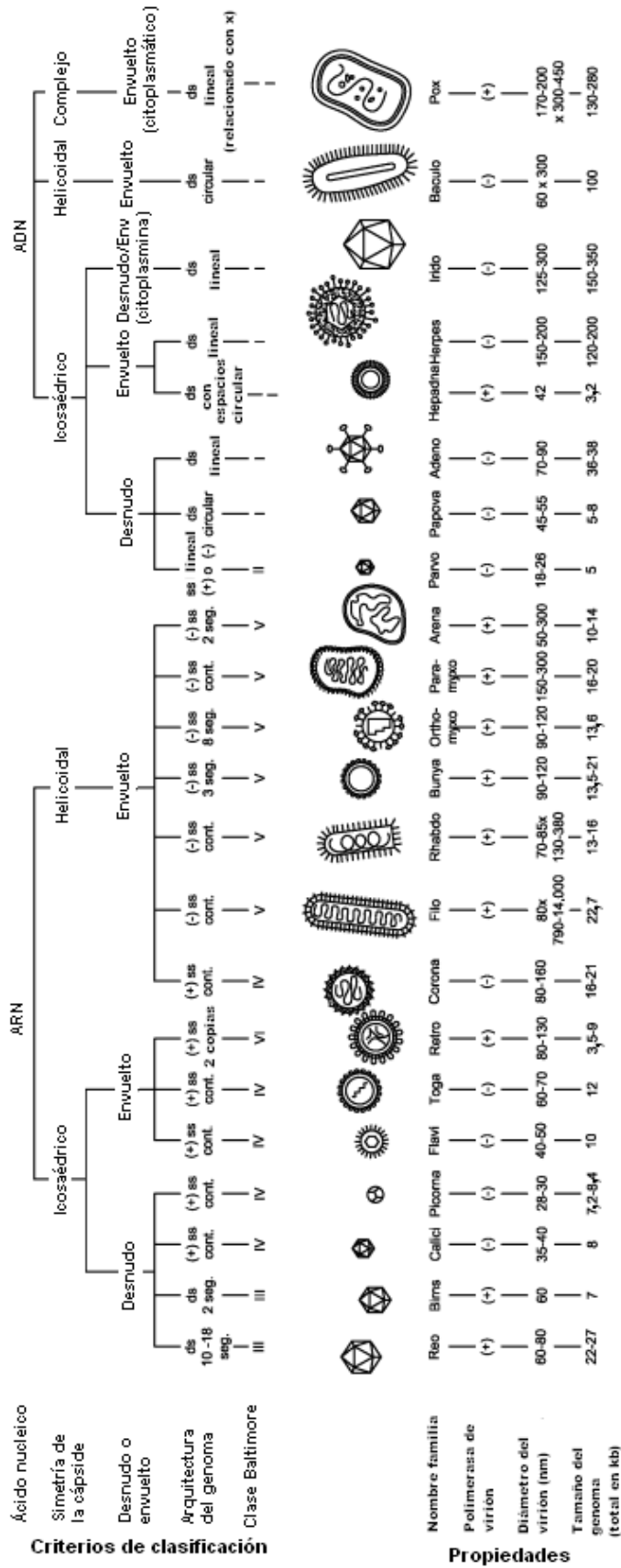


FIG. 18