

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 300**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/FR2014/053406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14828237 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3083970**

54 Título: **Procedimiento de purificación de virus o vectores virales envueltos**

30 Prioridad:

17.12.2013 FR 1362835

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

08.04.2020

73 Titular/es:

**GENETHON (100.0%)
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry, FR**

72 Inventor/es:

**BOUDEFFA, DRISS;
MERTEN, OTTO-WILHELM y
FENARD, DAVID**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 300 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

Procedimiento de purificación de virus o vectores virales envueltos

La invención se refiere a un procedimiento de purificación de retrovirus. El procedimiento de la invención es útil para la recuperación a gran escala de retrovirus en condiciones que respetan las buenas prácticas de fabricación y que permiten la obtención de virus de calidad clínica.

Antecedentes tecnológicos

Los vectores lentivirales derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (principalmente VIH-1) forman parte de los vectores más utilizados para terapia génica. Estos vectores están generalmente pseudotipados con glicoproteínas que provienen de otros virus: virus leucemógeno de gibón (GALV en inglés por *Gibbon Ape Leukemia Virus*; glicoproteínas GaLV-TR), virus de la estomatitis vesicular (VSV-g), virus del sarampión (o MV para *Measles Virus* en inglés). Se han descrito procedimientos de purificación de lotes clínicos de vectores lentivirales pseudotipados con la proteína VSV-G (Schweizer and Merten, 2010). Sin embargo, los vectores virales pseudotipados con otras proteínas de envoltente, y más particularmente con glicoproteínas derivadas de GaLV o MV, son relativamente poco utilizados porque actualmente no está disponible ningún protocolo de purificación satisfactorio. El principal obstáculo limitante para la purificación de este tipo de vectores pseudotipados está relacionado con la inestabilidad y fragilidad de ciertas glicoproteínas de membranas. Sin embargo, estos vectores son particularmente interesantes debido a su tropismo menos amplio que el de los vectores pseudotipados con la proteína VSV-G. Por ejemplo, los vectores pseudotipados con una glicoproteína derivada de GALV poseen un tropismo más restringido y se dirigen más específicamente a las células madre hematopoyéticas. La puesta a disposición de un procedimiento eficaz para purificar vectores pseudotipados con glicoproteínas GALV representa por tanto un desafío importante en el campo de la terapia génica.

Por tanto, los inventores han propuesto desarrollar un procedimiento de purificación de retrovirus y principalmente de virus pseudotipados por la glicoproteína de envoltente GaLV o por otras proteínas de envoltente, con el fin de producir preparaciones de virus para uso clínico.

Sumario de la invención

La presente invención resulta de la observación inesperada hecha por los inventores de la influencia del pH de las soluciones utilizadas durante la purificación de un virus envuelto y de la influencia positiva de ciertos aditivos sobre el rendimiento de dicha purificación.

La presente invención resulta principalmente de la observación de la sorprendente mejora de la purificación de virus envueltos cuando se utilizan tampones ácidos durante una cromatografía de intercambio de aniones. La invención tiene por tanto por objeto un procedimiento de purificación de virus envueltos que comprende una etapa de cromatografía de intercambio de aniones, teniendo los tampones utilizados durante dicha cromatografía un pH comprendido entre 5,5 y 6. Según una alternativa, el pH de los tampones utilizados durante la cromatografía de intercambio de aniones está comprendido entre 6 y 8 y además comprenden un poliol.

Los inventores han podido demostrar que la adición de un poliol en uno o varios de los tampones utilizados durante una o más etapas de un procedimiento de purificación de un virus envuelto permitía obtener un aumento sustancial del rendimiento de purificación. En particular, se observa la mejora del rendimiento de una purificación que comprende una etapa de ultrafiltración/diafiltración seguida de una cromatografía de intercambio de aniones cuando los tampones utilizados durante esta cromatografía comprenden un poliol.

Los inventores proponen igualmente la inversión del orden de las etapas de cromatografía de intercambio de aniones y de ultrafiltración/diafiltración, principalmente la filtración de flujo tangencial (TFF), utilizadas durante la purificación. La aplicación de una ultrafiltración/diafiltración, principalmente de una TFF, antes de una cromatografía de intercambio de aniones permite una mejora sustancial del rendimiento de la purificación de un vector envuelto. La invención se refiere por tanto igualmente a un procedimiento de purificación de un retrovirus que comprende, en este orden, una etapa de ultrafiltración/diafiltración, principalmente una etapa de TFF, seguida de una etapa de cromatografía de intercambio de aniones.

La invención se refiere además a un procedimiento de purificación de retrovirus, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de ultrafiltración/diafiltración, principalmente una etapa de TFF, realizándose dicha etapa utilizando tampones que contienen un poliol.

La invención se adapta más particularmente a la purificación de virus pseudotipados con una glicoproteína derivada de GaLV. Hasta la puesta a disposición de la presente invención, los virus pseudotipados con este tipo de glicoproteínas se consideraban "no purificables". Los diferentes estudios realizados sobre estos vectores virales utilizaron preparaciones en bruto de vectores no purificados debido a la fragilidad de los vectores pseudotipados GaLV. Inesperadamente, los inventores han podido mostrar una mejora significativa del rendimiento de purificación gracias al procedimiento de la invención. Igualmente han podido demostrar que este procedimiento permite también

la mejora del rendimiento de la purificación de virus pseudotipados por medio de otras glicoproteínas de envoltente, principalmente por medio de las glicoproteínas VSV-G y MV.

Descripción detallada de la invención

Producción de virus y vectores envueltos

5 La producción de virus o vectores envueltos es bien conocida en el estado de la técnica. El experto puede referirse a su conocimiento general en este campo, principalmente representados por Ansorge et al., 2010; Schweizer and Merten 2010; Rodrigues et al., 2011.

10 El virus producido es principalmente un vector viral derivado de un retrovirus, en particular un lentivirus. Los vectores retrovirales producidos se derivan principalmente de alfa-retrovirus (tal como VLA o ALV en inglés por *Avian Leukosis Virus*), beta-retrovirus (tal como VTMM o MMTV en inglés por *Mouse Mammary Tumor Virus*), gamma-retrovirus (tal como los diferentes tipos de VLM o MLV en inglés por *Murine Leukemia Virus*), delta-retrovirus (tal como diferentes tipos de VLTH o HTLV en inglés por *Human T-Lymphotropic Virus*), épsilon-retrovirus (tal como VSDW o WDSV en inglés por *Walleye Dermal Sarcoma Virus*), espumavirus (tal como VFH o HFV por *Human Foamy Virus* y VFS o SFV en inglés por *Simian Foamy Virus*), lentivirus de primates tales como los diferentes tipos de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH o HIV en inglés por *Human Immunodeficiency Virus*), los diferentes tipos de virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS o SIV en inglés por *Simian Immunodeficiency Virus*) o lentivirus de mamíferos no primates tales como virus de la anemia infecciosa equina (VAIE o EIAV en inglés por *Equine Infectious Anemia Virus*), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF o FIV en inglés por *Feline Immunodeficiency Virus*), virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC o CAEV en inglés por *Caprine Arthritis-Encephalitis Virus*) o el virus ovino Visna-maëdi (VVM o VMV en inglés por *Visna Maedi Virus*).

15 Según un modo particular de realización, el vector retroviral, en particular lentiviral, está pseudotipado, es decir, que comprende una glicoproteína de envoltente derivada de un virus diferente del virus del que se deriva la partícula retroviral, una glicoproteína de envoltente modificada o una glicoproteína de envoltente quimérica. Según un modo particular de realización, el vector retroviral está pseudotipado con una glicoproteína de envoltente derivada del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), del virus del sarampión (MV por *Measles Virus* en inglés) o MV modificado (principalmente modificado con un anticuerpo anti-CMHII), del virus endógeno de babuino (BaEV por *Baboon Endogenous Virus* en inglés) o del virus de leucemógeno de gibbon (GALV en inglés por *Gibbon Ape Leukemia Virus*), aunque un experto en la técnica podría considerar la utilización de otras glicoproteínas de envoltente viral (Frecha et al., 2008). Según un modo particular de realización, el vector retroviral, más particularmente lentiviral, está pseudotipado con una glicoproteína de envoltente modificada, tal como GALVTR (glicoproteína de envoltente GALV cuyo extremo C-terminal intravirión ha sido reemplazado por el extremo C-terminal de la glicoproteína de envoltente del virus leucemógeno humano anfótropo A-MLV, permitiendo así una incorporación de la glicoproteína de envoltente muy eficaz en la partícula lentiviral) (Christodouloupoulos and Cannon 2001). Según un modo particular de realización, el vector retroviral, más particularmente lentiviral, está pseudotipado con una glicoproteína de envoltente quimérica, tal como la glicoproteína de envoltente del virus del sarampión en la que ha sido insertada una proteína de fusión que codifica la región variable de las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina (scFv en inglés por *Single Chain Variable Fragment*) o una proteína con dominios de anquirina repetidos (DARPs en inglés por *Designed Ankyrin Repeat Proteins*) para permitir la focalización específica de un receptor dado en la superficie de las células diana (Anliker et al., 2010; Münch et al., 2011). Según un modo particular de realización, el vector lentiviral está pseudotipado con una envoltente derivada del virus GALV, del virus de la estomatitis vesicular (por ejemplo, la proteína de envoltente VSV-G) o del virus del sarampión, aunque el experto en la técnica puede considerar la utilización de otras proteínas de envoltente.

25 El virus envuelto puede contener además un transgén de interés introducido en su genoma. Por supuesto, el transgén de interés dependerá de la utilización específica para la que está destinado el vector viral envuelto. De modo ilustrativo, se cita un transgén de interés que codifica un ARN terapéutico (por ejemplo, un transgén de interés que codifica un ARN antisentido complementario de una secuencia diana de ARN o ADN), un transgén de terapia génica que codifica una proteína deficiente o ausente en un sujeto afectado de una patología, o un transgén utilizado para una vacunación por ADN, es decir, un transgén que codifica una proteína cuya expresión inducirá una vacunación del organismo receptor contra dicha proteína. Según un modo particular de realización, se produce un vector viral envuelto utilizable en terapia génica y luego se purifica. El procedimiento de producción utilizado es ventajosamente compatible con las buenas prácticas de laboratorio y permite considerar una producción a gran escala de vectores retrovirales, principalmente vectores lentivirales, en particular vectores lentivirales pseudotipados (en particular con las proteínas de envoltente GALV para un retrovirus o GALVTR para un lentivirus, VSV-G o MV).

30 Según un modo preferido de realización para la producción de un vector lentiviral, se introducen los cuatro elementos siguientes en la célula hospedante: un casete de expresión que comprende un gen *gagpol* lentiviral, un casete de expresión que comprende un gen *rev* lentiviral, un casete de expresión de un transgén de interés, comprendido entre un LTR-5' y un LTR-3' lentiviral, y un casete de expresión de glicoproteína(s) de envoltente.

En un modo particular de realización, se produce el vector retroviral, más particularmente un vector lentiviral, a partir de una línea estable que expresa uno o varios elementos necesarios para la producción de un virus envuelto (Miller 2001; Rodrigues et al., 2011), como por ejemplo la línea de producción humana GPRG-EF1 α -hy_cOPT que produce constitutivamente un vector lentiviral derivado del VIH-1 pseudotipado con la glicoproteína de envoltorio VSV-G (Greene et al., 2012) o por ejemplo la línea productora de múridos PG13-MFG-GFP que produce constitutivamente el vector gamma-retroviral MLV pseudotipado con la glicoproteína de envoltorio GaLV (Miller et al., 1991). En un modo particular de realización, el virus envuelto se produce a partir de una célula hospedante de mamífero transfectada de modo transitorio con uno o varios plásmidos que codifican los elementos necesarios para la producción del virus. Según una variante que permite la producción de un vector lentiviral, dichos elementos se introducen en la célula por medio de 4 plásmidos: un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *gagpol* lentiviral, un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *rev* lentiviral, un plásmido de transferencia que comprende un casete de expresión de un transgén de interés, comprendido entre un LTR-5' y un LTR-3' lentiviral, y un plásmido que lleva un casete de expresión de glicoproteína(s) de envoltorio.

La célula hospedante se puede seleccionar entre cualquier célula que permita la producción de un virus envuelto. Según un modo particular de realización, dicha célula se elige entre una célula humana (HEK293, HEK293T, HEK293FT, Te671, HT1080, CEM), una célula de múridos (NIH-3T3), una célula de mustélidos (Mpf), una célula de cánidos (D17) (Miller and Chen 1996; Miller 2001; Merten 2004; Rodrigues et al., 2011; Stacey and Merten 2011).

Las células se cultivan en un medio adecuado para el cultivo de células de mamíferos y la producción de un virus envuelto. El medio se puede además complementar con aditivos bien conocidos en la técnica, tales como antibióticos, suero (principalmente suero fetal de ternera, etc.) añadidos en concentraciones apropiadas. El medio utilizado puede comprender principalmente suero o estar desprovisto de él. Los medios de cultivo de células de mamífero son bien conocidos en la técnica. Se pueden mencionar en este sentido el medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), el RPMI1640 o una mezcla de diferentes medios de cultivo, que incluyen, por ejemplo, DMEM/F12, o un medio sin suero como optiMEM®, optiPRO®, optiPRO-SFM®, CD293®, Freestyle F17® (Life Technologies) o Ex-Cell® 293 (Sigma-Aldrich).

En los procedimientos que emplean células transfectadas de manera transitoria, se puede utilizar cualquier agente que permita la transfección de plásmidos. Se puede emplear principalmente fosfato de calcio o polietilenimina, aunque los expertos en la técnica pueden considerar otros agentes (Ansorge et al., 2010). Las condiciones (principalmente la cantidad de plásmido(s), la relación entre los plásmidos, la relación entre el(los) plásmido(s) y el agente de transfección, el tipo de medio, etc.) y la duración de transfección podrán ser adaptados por los expertos en la técnica dependiendo de las características del virus producido y/o del transgén introducido en el plásmido de transferencia.

El virus envuelto se recoge luego del líquido sobrenadante de cultivo según métodos bien conocidos en la técnica.

Según un modo particular de realización, el medio de cultivo usado presenta un pH neutro (por ejemplo, comprendido entre 7 y 7,4, principalmente 7, 7,1, 7,2, 7,3 o 7,4) utilizado convencionalmente en el estado de la técnica para el cultivo de células y la producción de virus. Según un modo particular de realización, el procedimiento de producción utilizado comprende el cultivo de células productoras en un medio moderadamente ácido. Si bien el estado de la técnica presenta la neutralidad de los medios de cultivo como una condición necesaria para el cultivo óptimo de las células y la producción óptima de los virus y vectores envueltos, se ha descubierto que condiciones moderadamente ácidas permitan por el contrario mejorar significativamente la producción de un virus envuelto, principalmente un lentivirus, en particular un lentivirus pseudotipado (por ejemplo, con la proteína GaLV (o GaLVTR), VSV-G o proteínas de envoltorio del virus del sarampión).

Según una variante, la producción de vectores envueltos se realiza en condiciones moderadamente ácidas. La expresión "condición moderadamente ácida" se refiere al pH de una solución acuosa comprendido entre 5 y 6,8, en particular entre 5,5 y 6,5, más particularmente entre 5,8 y 6,2. Según un modo particular de realización, el pH del medio de cultivo es aproximadamente 6. El pH elegido dependerá igualmente de la capacidad del poder tampón del medio de cultivo utilizado, que el experto en la técnica podrá determinar fácilmente dado sus conocimientos generales. El experto en la técnica podrá modificar el pH de una solución, principalmente el pH de un medio de cultivo celular. Principalmente, puede introducir en dicha solución una solución de un ácido, principalmente un ácido fuerte tal como ácido clorhídrico. Si es necesario, se puede usar una solución de una base, principalmente una base fuerte, tal como hidróxido de sodio, para reajustar el pH al alza para alcanzar el valor deseado.

Según un modo particular de realización, la producción del virus envuelto comprende las etapas siguientes:

- la transfección transitoria de células HEK293T por medio de uno o varios plásmidos que codifican los elementos necesarios para la producción de dicho vector envuelto o la utilización de células productoras estables que producen los vectores constitutivamente o después de la inducción;
- el cultivo de dichas células en un medio adecuado, cuyo pH es aproximadamente 6 o aproximadamente 7;
- la recogida del virus envuelto en el líquido sobrenadante de cultivo.

Según una variante de este modo de realización, el virus envuelto producido es un lentivirus producido después de transfección de las células por medio de cuatro plásmidos: un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *gagpol* lentiviral, un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *rev* lentiviral, un plásmido de transferencia que comprende un casete de expresión de un transgén de interés, comprendido entre un LTR-5' y un LTR-3' lentiviral, y un plásmido que lleva un casete de expresión de glicoproteína(s) de envoltorio. Según una variante, la proteína de envoltorio se deriva del virus GaLV (en particular la glicoproteína modificada GaLVTR para los vectores lentivirales), del virus VSV (en particular la envoltorio VSV-G) o del virus del sarampión (MV).

Purificación de virus y vectores envueltos

10 Como se muestra en los ejemplos de esta solicitud, el rendimiento de purificación de virus envueltos producidos se puede mejorar notablemente adaptando las condiciones de pH de los tampones utilizados durante dicha purificación.

En particular, los retrovirus se pueden purificar muy ventajosamente según un nuevo procedimiento que comprende la utilización de tampones ácidos durante la cromatografía de intercambio de aniones. Por tanto, la invención se refiere en particular a un procedimiento de purificación de un retrovirus, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de cromatografía de intercambio de aniones, estando comprendido el pH del tampón o tampones usados durante esta etapa de cromatografía de intercambio de aniones entre 5 y 5,9. El retrovirus se puede purificar principalmente del medio de cultivo de un cultivo celular de células productoras de dicho virus envuelto. En un modo particular de realización, el pH del o de los tampones utilizados durante la etapa de cromatografía de intercambio de aniones está comprendido entre 5 y 5,9, siendo el pH más particularmente igual a 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 o 5,9. En particular, estando comprendido el pH entre 5,5 y 5,9 (por ejemplo, igual a 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 o 5,9), siendo el pH más particularmente alrededor de 5,5 (por ejemplo, 5,4, 5,5 o 5,6) o 5,9, incluso más particularmente 5,5. La cromatografía de intercambio de aniones puede estar precedida o seguida, preferiblemente precedida, por una etapa de ultrafiltración, en particular de una ultrafiltración/diafiltración, principalmente una filtración de flujo tangencial. Según un modo de realización, la cromatografía de intercambio de aniones precede a la ultrafiltración. Según un modo alternativo, la ultrafiltración precede a la cromatografía de intercambio de aniones, prefiriéndose este último modo.

Los inventores han demostrado igualmente la ventaja de usar un poliol, principalmente sacarosa, en los tampones empleados durante una cromatografía de intercambio de aniones, cuando dichos tampones presentan un pH comprendido entre 6 y 8 (principalmente un pH igual a 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0). La invención se refiere por tanto igualmente a un procedimiento de purificación de un virus envuelto que comprende una etapa de ultrafiltración/diafiltración seguida de una etapa de cromatografía de intercambio de aniones, realizándose dicha cromatografía utilizando tampones de pH comprendido entre 6 y 8, más particularmente entre 7 y 8 (principalmente un pH igual a 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0), que contiene un poliol.

35 El o los tampones utilizados durante la etapa de ultrafiltración/diafiltración, más particularmente de TFF, pueden ser igualmente tampones ácidos, neutros o básicos.

El experto en la técnica puede modificar el pH de una solución, principalmente el pH de un tampón utilizado durante una etapa de purificación de virus envueltos. Principalmente, puede introducir en dicha solución una solución de un ácido, principalmente un ácido fuerte, tal como ácido clorhídrico, para disminuir el pH o ajustarlo. Si es necesario, se puede utilizar una solución de una base, principalmente una base fuerte, tal como hidróxido de sodio, para obtener un pH básico o reajustar el pH al alza para alcanzar un valor ácido deseado. Por supuesto, el experto en la técnica se encargará de utilizar la formulación adecuada para obtener una solución de poder tampón adaptada al pH deseado.

La solución cargada sobre o en el dispositivo de ultrafiltración/diafiltración o en la columna de cromatografía de intercambio de aniones puede corresponder al líquido sobrenadante de cultivo celular eventualmente pretratado con una benzonasa y/o una centrifugación a baja velocidad y/o una clarificación. Se entiende que este líquido sobrenadante de cultivo eventualmente pretratado no corresponde a un "tampón de purificación". Sin embargo, si es necesario su pH se puede ajustar igualmente antes de la carga. Si la producción se ha realizado a pH neutro o ácido, el líquido sobrenadante de cultivo eventualmente pretratado se puede cargar directamente, o su pH se puede disminuir o aumentar antes de la carga. Es igualmente posible considerar la adición de aditivos al líquido sobrenadante de cultivo eventualmente pretratado antes de la carga. Por ejemplo, es posible añadir en esta etapa un poliol, un antioxidante (principalmente L-histidina, L-metionina, L-cisteína, glutatión o vitamina C), una sal metálica, principalmente una sal de magnesio, tal como $MgCl_2$ o $MgSO_4$, o cualquier otro aditivo adecuado.

Según un modo particular de realización, el líquido sobrenadante de cultivo, eventualmente pretratado, se carga directamente sobre o en el dispositivo de ultrafiltración/diafiltración o en la columna de cromatografía, sin ajuste del pH y sin adición de aditivo. Preferiblemente se pueden usar previamente tampones de pH ácido, básico o neutro para equilibrar el dispositivo de ultrafiltración/diafiltración y/o para realizar la ultrafiltración/diafiltración o la cromatografía de intercambio de aniones como tal.

5 Según una variante, la etapa de ultrafiltración/diafiltración es una etapa de TFF. En esta variante, la diafiltración se realiza con un tampón cuyo pH se ajusta según las modalidades descritas anteriormente. Por tanto, el tampón utilizado puede ser un tampón ácido, principalmente un tampón de pH comprendido entre 5 y 5,9 (principalmente igual a 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 o 5,9), en particular un tampón de pH 5,5 a pH 5,9 (principalmente igual a 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 o 5,9), más particularmente un tampón de pH 5,5. En una variante, el tampón utilizado es un tampón de pH comprendido entre 6 y 8 (principalmente de pH igual a 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0), más particularmente entre 7 y 8 (principalmente de pH igual a 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0), que comprende un poliol.

10 Los tampones utilizados durante la etapa de ultrafiltración y durante la etapa de diafiltración pueden ser diferentes o idénticos. En un modo particular de realización, la etapa de ultrafiltración se realiza por medio de un tampón que tiene un pH de aproximadamente 7 (principalmente un pH comprendido entre 6,8 y 7,2 (por ejemplo igual a 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 o 7,2), más particularmente un tampón de pH 7) y la diafiltración se realiza por medio de un tampón que tiene un pH comprendido entre 5 y 5,9 (principalmente igual a 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 o 5,9), más particularmente un tampón de pH comprendido entre 5,5 y 5,9 (principalmente igual a 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 o 5,9), en particular un tampón de pH igual a 5,5.

15 En un modo de realización, el procedimiento de purificación comprende una etapa de cromatografía de intercambio de aniones seguida de una etapa de ultrafiltración/diafiltración. En otro modo de realización, el procedimiento de purificación comprende una etapa de ultrafiltración seguida de una etapa de cromatografía de intercambio de aniones.

20 En un modo particular de realización, el procedimiento de purificación comprende:

- (a) la clarificación del medio de cultivo celular;
- (b) una etapa de ultrafiltración/diafiltración;
- (c) una cromatografía de intercambio de aniones;
- (d) una cromatografía de exclusión;

25 pudiendo invertirse las etapas (b) y (c). Según un modo preferido de realización, la etapa (c) sigue a la etapa (b).

La figura 1 de esta solicitud resume las etapas de un modo preferido de realización del procedimiento de purificación de la invención.

30 Según un modo particular de realización, se realiza una primera etapa de clarificación por filtración del líquido sobrenadante de cultivo por un filtro cuyo umbral de retención está comprendido entre 0,2 y 0,8 μm , en particular un filtro de 0,45 μm , y la recuperación de los virus envueltos en el filtrado. Según un modo de realización, la clarificación se realiza por medio de una cascada de filtros de umbral de retención diferentes, por ejemplo con una sucesión de filtros de 0,8, 0,45 y 0,2 μm o incluso 0,65 y 0,2 μm . Esta etapa de clarificación puede estar precedida por una etapa de centrifugación del líquido sobrenadante de cultivo a baja velocidad. La velocidad de centrifugación en esta etapa puede estar comprendida principalmente entre 500 x g y 1000 x g.

35 Según un modo particular de realización, la etapa de ultrafiltración/diafiltración se realiza principalmente por filtración de flujo tangencial. Según este modo de realización, la filtración de flujo tangencial se puede realizar por medio de una membrana de fibras huecas o un casete de membrana plana o una membrana en espiral (o "spiral wound membrane", en inglés), cuyo tamaño de exclusión de poros está comprendido entre 300 y 800 kDa, en particular entre 500 y 750 kDa. Según otro modo de realización, el tamaño de exclusión de poros es al menos 300, 400, 500, 600 o 700 kDa, o es de 800 kDa. Según un modo preferido de realización, la membrana utilizada para la filtración de flujo tangencial se caracteriza por un tamaño de exclusión de poros de 750 kDa. Según un modo particular de realización, al final de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, los virus envueltos, principalmente los virus envueltos presentes en el filtrado de la etapa de clarificación, se concentran hasta el volumen mínimo posible, por ejemplo al menos 5X, al menos 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 35X, 40X, 45X, 50X, 55X o 60X. Por ejemplo, los virus envueltos se concentran 36,6X o 50X al final de la etapa de ultrafiltración/diafiltración. Según otro modo de realización, la etapa de ultrafiltración/diafiltración permite una reducción de la carga de contaminantes de más del 70%, 80%, 85%, 90% o más del 95%. Según un modo particular de realización, la etapa de ultrafiltración/diafiltración se realiza de la siguiente manera: se realiza una primera concentración, por ejemplo una concentración de 25X (principalmente, pasando de un volumen de 500 mL a un volumen de 20 mL), seguido de diafiltración con al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso al menos 10 volúmenes de un tampón ácido que contiene o no un poliol y/o uno o varios antioxidantes, por ejemplo, con 10 volúmenes de tampón, esta etapa va seguida de una segunda etapa de concentración, principalmente hasta el volumen mínimo posible, para alcanzar, por ejemplo, una concentración de 50 X.

55 Los soportes de cromatografía de intercambio de aniones son bien conocidos en la técnica. La invención pone en práctica más particularmente una cromatografía de intercambio de aniones en una columna o membrana, más particularmente en una columna. Un modo preferido de realización comprende la puesta en práctica de una

5 cromatografía de intercambio de aniones débil (principalmente, DEAE (D) - dietilaminoetilo, PI - polietilenimina). A este respecto, se puede mencionar la utilización de un soporte seleccionado entre una columna DEAE. A modo de ilustración, se pueden mencionar los soportes Monolithe CIM D (BIAseparation), Poros D50 (Life Technologies), Sartobind D (Sartorius), Toyopearl 650C DEAE (Tosoh), etc. En una variante preferida, el soporte de cromatografía de intercambio de aniones es un soporte no comprimible, tales como los soportes Monolithe CIM D y Poros D50, permitiendo la obtención de un mejor rendimiento que los soportes comprimibles. Cuando el pH de los tampones utilizados durante la cromatografía de intercambio de aniones es inferior a 6, dichos tampones contienen o no contienen un poliol. En particular, se ha observado que la utilización de tampones de pH 5,5 durante esta etapa permitió la obtención de un rendimiento de aproximadamente el 100% de los vectores lentivirales pseudotipados GALVTR sin necesidad de añadir un poliol. Este excelente nivel de rendimiento nunca se había alcanzado hasta ahora y permite considerar la utilización a gran escala de este tipo de vectores, particularmente ventajosos por las razones expuestas anteriormente. La adición de un poliol no ha mostrado ningún impacto positivo ni negativo sobre este rendimiento, pero su adición puede ser considerada sin embargo con fines de estabilización de los vectores eluidos. Cuando el pH de los tampones utilizados es superior o igual a 6, principalmente comprendido entre 6 y 8, la adición de un poliol mejora significativamente el rendimiento de la purificación. Por tanto, según la invención, cuando el pH de los tampones de cromatografía de intercambio de aniones está comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, dichos pH contienen un poliol.

20 En un modo de realización, la solución purificada y filtrada de la etapa de ultrafiltración, más particularmente de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, se deposita sobre el soporte de cromatografía, que ha sido primeramente equilibrado por medio de un tampón de equilibrado de pH inferior a 6 que contiene eventualmente un poliol. El tampón de equilibrado y el tampón de carga pueden contener principalmente una concentración de NaCl comprendida entre 0 y 250 mM. Estos tampones pueden principalmente estar compuestos para que correspondan a un tampón Bis-Tris 20 mM, pH 5 a 6 (por ejemplo, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0, especialmente pH 5,5), 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM o un tampón de equilibrado de pH superior o igual a 6, principalmente comprendido entre 6 y 8 (principalmente de pH igual a 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0), que contiene un poliol, por ejemplo, un tampón de PBS, pH 7, 5% de sacarosa o bis-tris-propano pH 8, 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM. El tampón se introduce a un caudal adecuado (por ejemplo, a 1 volumen de columna/min o 4 cm/min). Luego la columna se lava con el tampón de equilibrado y finalmente se eluye. Según un modo particular de realización, la elución de la columna de cromatografía de intercambio de aniones se realiza en dos etapas con un tampón que comprende o no un poliol, principalmente con un tampón de NaCl 0,3 M, Bis-Tris 20 mM (pH 5 a 6, principalmente igual a 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0, principalmente pH 5,5), 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM, y luego la elución de los vectores se realiza con un tampón de fuerza iónica superior que comprende un poliol, principalmente un tampón de NaCl 650 mM, Bis-Tris 20 mM (pH 6), 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM. El procedimiento según la invención permite por tanto ventajosamente disminuir la cantidad de sales necesarias para eluir los vectores de la columna en relación con la concentración de sales convencionalmente utilizadas. Según un modo particular de realización, la elución se realiza con un tampón que comprende una concentración de NaCl comprendida entre 450 mM y 1000 mM. Según una variante de este modo de realización, el tampón de elución contiene NaCl entre 450 a 800 mM, entre 2% y 8%, más particularmente 5%, de un poliol (en particular sacarosa), teniendo el tampón un pH comprendido entre 5,5 y 6 (principalmente un tampón Bis-Tris que contiene eventualmente MgCl₂ a 2 mM).

45 Según otro modo de realización, la elución del soporte de cromatografía de intercambio de aniones se realiza en dos etapas, correspondiendo una primera etapa a una pre-elución llevada a cabo con el fin de eliminar los contaminantes de la producción. El tampón de la primera elución puede comprender, por ejemplo, NaCl a una concentración comprendida entre 0 y 450 mM (principalmente entre 0 y 350 mM si el tampón tiene un pH inferior o igual a 6, principalmente comprendido entre 5 y 6, más particularmente un pH igual a 5,5 o 6,0; o entre 0 y 450 mM si el tampón tiene un pH superior o igual a 7). La segunda elución se realiza a continuación para recuperar el virus (por ejemplo, el vector viral) a partir del soporte cromatográfico. Cuando el pH del tampón de la segunda elución está comprendido entre 5 y 6, más particularmente a pH 5,5, por ejemplo, la concentración de sal podrá estar comprendida entre 450 y 800 mM. Cuando el pH del tampón de la segunda elución es superior o igual a 7, la concentración de sal podrá estar comprendida entre 600 y 1000 mM.

Según un modo particular de realización, que comprende una única etapa de elución del soporte de cromatografía de intercambio de aniones, se realizan las etapas siguientes:

i) carga, sobre el soporte de cromatografía de intercambio de aniones, de la solución obtenida al final de la etapa de ultrafiltración, estando dicha solución principalmente:

55 - bien a un pH comprendido entre 5,5 y 6, y que tiene una concentración de NaCl comprendida entre 0 y 200 mM

- bien a pH 7, estando la concentración de NaCl comprendida entre 0 y 350 mM

ii) elución del virus, principalmente un vector viral, del soporte de cromatografía de intercambio de aniones con un tampón:

- bien a un pH comprendido entre 5,5 y 6, y que tiene una concentración de NaCl comprendida entre 450 y 800 mM

- bien a pH 7, estando la concentración de NaCl comprendida entre 600 y 1000 mM.

5 Según otro modo particular de realización, que comprende dos etapas de elución del soporte de cromatografía de intercambio de aniones, se realizan las etapas siguientes:

i) carga, sobre el soporte de cromatografía de intercambio de aniones, de la solución obtenida al final de la etapa de ultrafiltración, no comprendiendo la solución NaCl añadido;

ii) una primera elución del soporte de cromatografía de intercambio de aniones (con el fin de eliminar los contaminantes), estando el primer tampón de elución:

10 - bien a un pH comprendido entre 5,5 y 6, y que tiene una concentración de NaCl comprendida entre 0 y 350 mM

- bien a pH 7, estando comprendida la concentración de NaCl entre 0 y 450 mM

iii) una segunda elución del soporte de cromatografía de intercambio de aniones (con el fin de recuperar el virus, principalmente el vector viral), estando el segundo tampón de elución:

15 - bien a un pH comprendido entre 5,5 y 6, y que tiene una concentración de NaCl comprendida entre 450 y 800 mM

- bien a pH 7, estando la concentración de NaCl comprendida entre 600 y 1000 mM.

20 Para la evaluación de las fracciones y la selección de las que serán sometidas a continuación al procedimiento de purificación, la columna puede estar equipada a la salida de un cromatógrafo equipado con un lector de absorbancia de UV a 280 nm, un medidor de conductividad, un plóter y un colector de fracciones.

25 Una etapa de cromatografía de exclusión se realiza de modo preferido inmediatamente después de la etapa de cromatografía de intercambio de aniones. La resina de exclusión utilizada presenta un tamaño de exclusión comprendido entre 300 y 1000 kDa, principalmente entre 500 y 800 kDa. Según un modo particular de realización, la columna de cromatografía de exclusión utilizada se define por un tamaño de exclusión de 500, 700 u 800 kDa. Además, en un modo particular de realización, la columna utilizada para esta etapa comprende una resina multimodal, principalmente una resina con doble funcionalidad de gel de exclusión y de adsorción (por interacción hidrófoba, así como por una carga positiva del soporte). Se puede citar a este respecto la columna Capto Core700 (GE HealthCare). En un modo de realización, el gel de cromatografía es un soporte no comprimible. La muestra de virus o vectores envueltos obtenida de la cromatografía de intercambio de aniones se carga en la columna y luego se inyecta el tampón de formulación a un caudal adecuado, por ejemplo a un caudal de 0,5 mL/minuto. Las fracciones que se han de recoger se determinan a la salida de la columna por medio de un lector de absorbancia de UV a 280 nm.

35 Según un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de purificación de retrovirus que comprende una etapa de ultrafiltración/diafiltración, principalmente una TFF, realizándose dicha etapa por medio de tampones que contienen un poliol. Los inventores han podido demostrar que la adición de un poliol en un tampón de ultrafiltración/diafiltración permite un aumento significativo del rendimiento de purificación (Tabla 2 más adelante, en los ejemplos), lo que nunca había sido descrito. Los polioles utilizables durante esta etapa y su concentración se especifican más adelante. Los tampones utilizados durante la etapa de ultrafiltración y durante la etapa de diafiltración pueden ser diferentes o idénticos. En un modo particular de realización, la etapa de ultrafiltración se lleva a cabo por medio de un tampón que tiene un pH de aproximadamente 7 (principalmente un pH comprendido entre 6,8 y 7,2, por ejemplo igual a 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 o 7,2, más particularmente un tampón de pH 7) y la diafiltración se realiza por medio de un tampón que tiene un pH inferior a 6, o comprendido entre 4,5 y 6,2 (principalmente 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 o 6,2), principalmente un pH comprendido entre 5 y 6, más particularmente un tampón de pH comprendido entre 5,5 y 6 (principalmente igual a 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 45 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0), más particularmente un tampón de pH igual a 5,5 o 6, en particular un tampón de pH igual a 5,5. La filtración de flujo tangencial se puede realizar por medio de una membrana de fibras huecas o de un casete de membrana plana o una membrana en espiral (o "spiral wound membrane" en inglés), cuyo tamaño de exclusión de poros está comprendido entre 300 y 800 kDa, en particular entre 500 y 750 kDa. Según otro modo de realización, el tamaño de exclusión de poros es al menos 300, 400, 500, 600 o 700 kDa o es 800 kDa. Según un modo preferido, la membrana utilizada para la filtración de flujo tangencial se caracteriza por un tamaño de exclusión de poros de 750 kDa. Según un modo particular de realización, al final de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, los virus envueltos, principalmente los virus envueltos presentes en el filtrado de una etapa de clarificación, se concentran hasta el mínimo volumen posible, por ejemplo al menos 5X, al menos 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 35X, 40X, 45X, 50X, 55X o 60X. Por ejemplo, los virus envueltos se concentran a 36,6X o 50X al final de la etapa de ultrafiltración/diafiltración. Según otro modo de realización, la etapa de ultrafiltración/diafiltración permite una

reducción de la carga de contaminantes de más del 70%, 80%, 85%, 90% o más del 95%. Según un modo particular de realización, la etapa de ultrafiltración/diafiltración se realiza de la siguiente manera: se lleva a cabo una primera concentración, por ejemplo una concentración de 25X (principalmente, pasando de un volumen de 500 mL a un volumen de 20 mL), seguido de una diafiltración con al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso al menos 10 volúmenes de un tampón ácido que contiene o no un poliol y/o uno o varios antioxidantes, por ejemplo, con 10 volúmenes de tampón, esta etapa es seguida a continuación por una segunda etapa de concentración, principalmente hasta el volumen mínimo posible, para alcanzar, por ejemplo, una concentración de 50 X.

La etapa de ultrafiltración/diafiltración puede ir seguida o precedida de una etapa de cromatografía de intercambio de aniones, o seguida de una etapa de cromatografía de exclusión, según las modalidades descritas en detalle anteriormente.

Según un modo particular de realización, el procedimiento de purificación está destinado a una producción de virus envueltos de calidad de investigación. En este caso, se puede omitir la etapa de cromatografía de intercambio de iones (el procedimiento comprende, por ejemplo, las etapas (a), (b) y (d) descritas anteriormente). Según otro modo de realización, el procedimiento está destinado a la purificación de calidades clínicas de virus. En este último caso, se incluye preferiblemente la etapa de cromatografía de intercambio de aniones. Además, la etapa de cromatografía de exclusión puede ir seguida de una etapa de filtración esterilizante, principalmente por medio de una membrana filtrante, en particular una membrana de umbral de retención inferior o igual a 0,22 μm .

En el marco de la presente invención, el término "poliol" define una molécula carbonada lineal, cíclica o bicíclica que comprende entre 3 y 18 átomos de carbono, en particular entre 3 y 12 átomos de carbono, sustituida por al menos 3-6 grupos hidroxilo, en particular 8 grupos hidroxilo. El poliol puede ser, por ejemplo, un monosacárido aldosa o cetosa, principalmente una tetrosa, una pentosa o una hexosa. Se pueden mencionar principalmente los siguientes polioles monosacáridos: eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, fructosa, psicosa, sorbosa, tagatosa. El poliol se puede elegir igualmente entre los disacáridos o trisacáridos siguientes que constituyen una lista no limitante de otros polioles utilizables en la puesta en práctica de la invención: celobiosa, gentiobiosa, inulobiosa, isomaltosa, isomaltulosa, kojibiosa, lactosa, lactulosa, laminaribiosa, leucrosa, maltosa, maltulosa, melibiosa, nigerosa, robinosa, rutinosa, sacarosa, soforosa, trehalosa, trehalulosa, turanosa, erlosa, fucosil-lactosa, gentianosa, inulotriosa, 1-questosa, 6-questosa, maltotriosa, manotriosa, melecitosa, neoquestosa, panosa, rafinosa, ramniosa. En un modo particular de realización, el poliol se elige entre rafinosa, isomaltotriosa, sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, glucosa y glicerol. En un modo particular de realización, el poliol es sacarosa.

La concentración de poliol puede variar en gran medida y en particular puede ser diferente para cada uno de los diferentes tampones empleados durante esta etapa. La concentración de poliol puede estar comprendida principalmente entre 1% y 15% (p/v), principalmente entre 1,5% y 10%, en particular entre 2% y 8%, más particularmente entre 2% y 5%. En un modo particular de realización, la concentración en poliol de uno o varios de los tampones de la cromatografía de intercambio de aniones es 5% (p/v). En un modo particular de realización, todos los tampones usados durante el procedimiento de purificación comprenden un poliol, principalmente sacarosa, en particular 5% (p/v). Por tanto, según este modo de realización, el procedimiento puede comprender una etapa de TFF, una etapa de cromatografía de intercambio de aniones y una etapa de cromatografía de exclusión en la que todos los tampones utilizados comprenden un poliol. En otro modo de realización, los tampones de las etapas de TFF y de cromatografía de intercambio de aniones comprenden un poliol, mientras que los tampones utilizados para equilibrar y eluir la columna de cromatografía de exclusión no comprenden poliol, correspondiendo estos tampones al tampón de formulación cuya composición dependerá en gran medida del destino terapéutico y del modo de administración del producto acabado.

En otro modo de realización, uno o varios de los tampones utilizados en el procedimiento de la presente invención, principalmente los tampones utilizados durante la ultrafiltración/diafiltración y/o la cromatografía de intercambio de aniones, comprenden una sal de magnesio, principalmente cloruro de magnesio o sulfato de magnesio. La concentración de sal de magnesio, en particular cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, en cada uno de los tampones puede, independientemente para cada tampón, estar comprendida entre 0,1 mM y 5 mM, principalmente entre 1 y 3 mM, en particular 2 mM.

En otro modo de realización, uno o varios de los tampones utilizados en el procedimiento de la presente invención comprenden L-His, L-Met, L-Cys, glutatión o vitamina C, con el fin de inactivar radicales libres. La concentración de estos componentes en cada uno de los tampones puede, independientemente para cada tampón, estar comprendida entre 0,1 mM y 20 mM.

El procedimiento de purificación según la invención puede comprender igualmente una o varias etapas de tratamiento de la muestra o muestras con una nucleasa, principalmente una benzonasa. La nucleasa se puede utilizar antes o después de cada una de las etapas. En un modo de realización, la nucleasa, en particular la benzonasa, se utiliza en el medio de cultivo de las células productoras después de la etapa de transfección de los plásmidos.

Según un modo de realización, una o varias etapas de purificación se realizan a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, en particular a una temperatura comprendida entre 2 y 12°C, más particularmente entre 4 y 10°C. Según un modo particular de realización, uno, varias o todas las etapas de la purificación se realizan a aproximadamente 4°C.

- 5 Según un modo de realización, el retrovirus purificado según los métodos de la presente invención es un retrovirus recombinante. Preferiblemente, el retrovirus, más particularmente un lentivirus, es un retrovirus recombinante pseudotipado cuya proteína de envoltante se deriva del virus GaLV (en particular la glicoproteína modificada GaLVTR para los vectores lentivirales), del virus VSV (en particular la envoltante VSV-G) o del virus del sarampión (MV). En una variante particularmente preferida, el retrovirus purificado según el método de la presente invención es un retrovirus, más particularmente un lentivirus recombinante pseudotipado cuya proteína de envoltante se deriva del virus GaLV (en particular la glicoproteína modificada GaLVTR para los vectores lentivirales).

Leyendas de las figuras de los dibujos

- 15 **Fig. 1.** Dos procedimientos para la purificación de las partículas lentivirales LV-GaLV-TR: el procedimiento (A) es un procedimiento simplificado que emplea una sola etapa de cromatografía de exclusión (filtración en gel) después de la etapa de filtración de flujo tangencial; y el procedimiento (B) es un procedimiento más elaborado para obtener una mayor pureza que cuando se utiliza el procedimiento (A) - por ejemplo para la producción de vectores para utilización clínica.

- 20 **Fig. 2.** Comparación de membranas con un corte de 500 kDa y de 750 kDa en la eliminación de proteínas contaminantes (SDS-PAGE (arriba) y transferencia de Western anti-p24 (abajo)). La banda a 24/25 kDa (= p24) es claramente visible para todas las muestras de la transferencia de Western: 1) marcadores de tamaño; 2) diafiltración (a) (ensayo 1) a 750 kDa; 3) diafiltración (b) (ensayo 2) a 750 kDa; 4) ultracentrifugación a 68338 g durante 3 h (resuspensión en medio de cultivo X-vivo 20); 5) diafiltración (a) (ensayo 1) a 500 kDa; 6) diafiltración (b) (ensayo 2) a 500 kDa; 7) líquido sobrenadante de cultivo que contiene los vectores LV-GaLV-TR.

- 25 **Fig. 3.** Efecto del NaCl sobre la estabilidad de los vectores LV-GaLV-TR que codifican GFP conservados a temperatura ambiente. Los vectores se incuban durante 4 horas a pH 7,0 (PBS) a temperatura ambiente (TA). Para optimizar la etapa de cromatografía de intercambio de aniones, los inventores ensayaron la estabilidad de los vectores en un medio salino de NaCl. Para esto, los vectores se incubaron después de la etapa de UF/DF en tampones de PBS de pH 7,0 de diferentes concentraciones de NaCl durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego, los vectores se titularon en células HCT116. 48 horas después, las células se pasaron a FACS para medir el porcentaje de expresión de GFP.

- 30 **Fig. 4.** Efecto del pH y de la salinidad del tampón de elución sobre el rendimiento de purificación de vectores lentivirales infecciosos después de una etapa de cromatografía de intercambio de aniones. La preparación de vectores se produjo por transfección de células HEK293T, clarificó y concentró/diafiltró por TFF para ser utilizada en la evaluación de diferentes soportes de cromatografía de intercambio de aniones (débil). Se evaluaron diferentes soportes: Toyopearl 650C DEAE, CIM D (DEAE) y Poros D. El rendimiento del 100% es equivalente al título infeccioso después de la etapa anterior de TFF.

- 35 **Fig. 5.** Purificación de una preparación de vectores lentivirales GaLV-TR por cromatografía de exclusión (Capto Core 700). Se concentraron/diafiltraron 3 mL de una preparación lentiviral y luego se pasaron a través de una columna de Capto Core 700 (4,5 mL). Se utilizó un tampón de PBS (pH 7,0), 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM durante esta etapa para el equilibrado de la columna y la formulación. Se recogieron fracciones de 1 mL y se analizaron para la concentración del vector (TU): a) Cromatograma que muestra el título (TU) por fracción, la cantidad acumulada de vector para las fracciones 4-9 y la recuperación (%) acumulativa para las fracciones 4-9; b) transferencia de Western de todas las fracciones; c) SDS-PAGE de todas las fracciones.

- 40 **Fig. 6.** Transducción de células CD34+ SC (sangre del cordón umbilical) con un vector HIV-GaLV-TR de MOI 20
45 En bruto: porcentaje de células que expresan la GFP determinado por citometría de flujo de células CD34+ transducidas con el producto en bruto HIV-GaLV-TR,

DF/UF: porcentaje de células que expresan la GFP determinado por citometría de flujo de células CD34+ transducidas con la preparación de vectores HIV-GaLV-TR obtenidos después de purificación y concentración por TFF del producto en bruto.

50

Ejemplos

Los trabajos descritos en la presente solicitud se beneficiaron de una financiación por medio del 7º Programa Marco de la Comunidad Europea (F7/2007-2013), con el número 222878.

Material y métodos

5

Células: Las líneas celulares HEK293T y HCT116 (células de cáncer colorrectal CCL-247, origen: ATCC) se cultivan a 37°C, CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) (DMEM + Glutamax) suplementado con 2 a 10% suero fetal de ternera (SFT) (Life Technologies). Medio de cultivo: DMEM/SFT tamponado a pH 6,0 por adición de ácido clorhídrico (HCl al 37%, Sigma-Aldrich), filtrado luego por medio de un filtro Corning® de 1000 mL (de 0,22 µm de PES (polietersulfona)).

10

Producción de vectores virales:

Los vectores virales derivados del HIV-1 pseudotipados con diferentes glicoproteínas se producen por cuantificación transitoria con fosfato de calcio en células 293T, por 4 plásmidos como ha sido descrito por Merten et al., (2011). 2x10⁸ células 293T se siembran en un Hyperflask de 1760 cm² (Corning) en 550 mL de DMEM/STF al 10% (Kutner et al., 2009). 24 horas después, el medio de cultivo se reemplaza por el medio de transfección, combinándolo dentro del complejo de ADN/CaCl₂/HBS. Los 4 plásmidos: *gagpol* (pKLGagpol) 136 µg, *rev* (pKrev) 52,25 µg, plásmido transgénico (pCCL-eGFP) 206,8 µg, plásmido de envoltente adecuado para cada pseudotipo: GaLV-TR: pBA.GALV-TR/Ampho-Kana (*Gibbon ape Leukemia Virus*) 223 µg para generar LV-GaLV-TR; VSV-GpMDG (*Vesicular Stomatitis Virus g*) 68,13 µg para generar LV-VSV-g; pFΔ30 y pHCMH2 (proteínas de envoltente modificadas del virus del sarampión) 40 µg y 14 µg para generar los LV-MV; cantidad suficiente para 18 mL de H₂O y 8,9 mL de TE0,1X, mezclar con 3 mL de CaCl₂ (2,5M) añadir luego 30 mL de HBS2X, esperar la formación del complejo durante 4 minutos y añadir la mezcla al medio de cultivo. Después de 16 horas, el líquido sobrenadante se reemplaza por medio de nueva aportación SFT al 2% 15 U de Benzonase (Merck) y MgCl₂ 2 mM (Sigma-Aldrich). La recogida se llevó a cabo después de 48 horas de la transfección y el líquido sobrenadante se filtró por un filtro de 0,45 µm de acetato de celulosa (CA) 1L (Corning).

15

20

25

Los vectores retrovirales MLV-GaLV son producidos por células PG13. Estas son células que producen los vectores MLV-GaLV (Miller et al., 1991), las células se mantienen en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) (DMEM + Glutamax) suplementado con 2 a 10% de SFT a 37°C, CO₂ al 5%. La recogida de los vectores se realiza después de 24 horas de cambio de medio de cultivo. Luego, el líquido sobrenadante de producción se clarifica en un filtro de 0,45 µm de acetato de celulosa (Corning).

30

35 Concentración de vectores virales por filtración de flujo tangencial (TFF):

Esta etapa consiste en concentrar el líquido sobrenadante de producción y luego reemplazar el medio de cultivo por un tampón apropiado para la continuación del procedimiento.

40 La ultrafiltración (UF) se realiza después de la preparación del casete de UF y la determinación de la permeabilidad normalizada en agua NWP a 0,5 bar a 20°C. La membrana se equilibra a continuación con un tampón Bis-Tris pH 6,0, 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM o con otros tampones con el fin de efectuar esta concentración/diafiltración a otros valores de pH (por ejemplo: PBS, pH 7,0, 5%M de sacarosa, MgCl₂ 2 mM.). Todo el procedimiento se lleva a cabo a aproximadamente 4°C y el recipiente del producto que se ha de concentrar se coloca en un cubo con hielo.

45

Principio: Se realiza una primera concentración hasta un volumen de 20 mL seguida por una diafiltración con 10 volúmenes de tampón de carga de cromatografía de intercambio de iones (en este caso: 10 x 20 mL). Estas etapas van seguidas por una segunda concentración hasta el mínimo volumen posible (10 mL en este caso).

ES 2 753 300 T3

Membrana 750 kDa, 410 cm²: "Hollow fiber cartridge" (GE Healthcare, Ref: UFP750-E3MA) utilizando el sistema *Kros-Flow research II TFF* (Spectrum).

5 Después de la validación de la integridad de la membrana, la concentración de los vectores comienza con un volumen inicial de 500 mL de líquido sobrenadante en bruto y es concentrado por la membrana desde 500 mL hasta 20 mL.

10 El producto concentrado se diafiltra contra 200 mL de tampón A (para diafiltrar 10 veces 20 mL de concentrado). Esto representa un factor de concentración de 25X. El volumen final del diafiltrado es 10 mL. En este caso, el factor de concentración es 50X.

Cromatografía de intercambio de aniones:

15 En un primer protocolo, la etapa de cromatografía de intercambio de aniones se realiza aguas abajo de la TFF. Se analizan varios soportes de cromatografía: columna Monolithe CIMD DEAE, CIMD Q (BIAseparation, Villach, Austria), volumen de la columna: 1 mL; Sartobind D 75MA, volumen: 2,1 mL (Sartorius Stedim Biotech); Poros PI, volumen de la columna: 4 mL; Poros D 50, volumen de la columna: 4 mL, Poros HQ, volumen de la columna: 4 mL (LifeTechnologies), Toyopearl 650C DEAE, volumen de la columna: 2 mL (Tosoh).

20 La columna que se ha de analizar se conecta a un cromatógrafo Biologic-LP (Biorad) equipado con un lector de absorbancia de UV 280, un medidor de conductividad, un plóter (*Chart Recorder* 1327, Bio-Rad) y un colector de fracciones (Modelo 2110, Bio-Rad).

25 La columna se equilibra con 5 volúmenes de columna (5 CV) de tampón A a 2 mL/min. Después de la carga de la muestra en la columna, la columna se lava con 5 CV de tampón de equilibrado apropiado según el pH deseado, de acuerdo con la Tabla A). Luego se lleva a cabo una elución en dos etapas: NaCl 0,3 M, Bis-Tris 20 mM, 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM (pH 6,0) luego NaCl 650 mM, Bis-Tris 20 mM, 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM (pH 6,0) para eluir los vectores. Se analizan otros tres pH 5,5, 7,0 y 8,0 usando los tampones apropiados (que incluyen tampones tales como Bis-propano, PBS, L-His); en presencia (5%) y ausencia de 5% de sacarosa y de MgCl₂ (2 mM).

30 Finalmente, la fracción se carga inmediatamente en la columna de filtración en gel (cromatografía de exclusión) para eliminar las sales y las proteínas contaminantes eluidas con los vectores a NaCl 650 mM.

35 En un segundo protocolo, el líquido sobrenadante de producción clarificado se carga en una columna de cromatografía de intercambio de aniones Poros D, sin una etapa previa de ultrafiltración/diafiltración para evaluar el rendimiento de la cromatografía en estas condiciones. El tampón de equilibrado utilizado tiene un pH de 5,5 y contiene 5% de sacarosa y MgCl₂ 2 mM.

Cromatografía de exclusión:

40 Esta es la etapa final antes de la filtración esterilizante para los procedimientos A y B (Figura 1). Esta etapa consiste en eliminar los contaminantes que tengan un tamaño inferior al del gel utilizado (por ejemplo: 750 kDa o 500 kDa). Para esta etapa se utilizó la columna Capto Core700. Se trata de un gel con doble funcionalidad: cromatografía de exclusión y gel de cromatografía de adsorción.

45 Antes de comenzar la carga, la columna se desinfecta con NaOH 1 M y se equilibra con el tampón de formulación. El producto de UF/DF (Procedimiento A), o las fracciones correspondientes al pico de cromatografía de intercambio de

aniones (AXC) (procedimiento B) se cargan en la columna. Se cargan 8 mL (UF/DF o fracción AXC) con un caudal de 0,5 mL/min. Luego se inyecta el tampón de formulación a 0,5 mL/min (5 CV de tampón de formulación). La fracción correspondiente al pico UV se recoge (aproximadamente 16 mL) y luego se filtra en un filtro de 0,22 µm (filtración esterilizante). Las muestras se conservan a -80°C.

5

Titulación de vectores virales:

El título viral en unidades de transducción (TU) de los vectores que tienen el gen informador eGFP se analiza por transducción de células HCT116. 72 horas después de la transducción, las células se pasaron por FACS para determinar el título en TU/mL como se ha descrito previamente (Pfeifer et al., 2009). Para el análisis físico de las partículas virales se usó el KIT ELISA p24 (Perkin Elmer) para la cuantificación de la proteína de la cápsida del lentivirus p24 según las instrucciones del proveedor.

10

Transducción de células de la sangre del cordón umbilical CD34+:

15

Se aíslan células CD34+ de sangre del cordón umbilical mediante selección inmunomagnética (Miltenyi Biotec). El cultivo y la transducción de células CD34+ se realizan como ha sido descrito (Charrier et al., 2011): primeramente las células se pre-estimulan durante la noche en un medio X-Vivo 20 (Lonza) y se suplementan con citoquinas. Las células preactivadas se siembran en una placa de 48 pocillos (5x10⁴ células/100 L). La transducción se realiza por adición de 100 µL de vectores (1x10⁶ TU) purificado en presencia de 8 µg/mL de vectofusina-1 (Fenard et al., 2013). Después de 6 horas de incubación, se añade 1 mL de medio de diferenciación (X-VIVO-20 complementado con 10% de suero y en presencia de citoquinas (hSCF, h-IL-3 h-Flt3 h-IL-6) como ha sido descrito (Charrier et al., 2011)) en cada pocillo, y después de 5 días se evalúa la eficacia de transducción midiendo la expresión de GFP por FACS (FC500, BD Biosciences).

20

25

SDS-PAGE y transferencia de Western:

Las muestras de cultivo que contienen los vectores lentivirales o las muestras purificadas se analizan por SDS-PAGE y por transferencia Western para detectar la presencia de proteínas p24 de la cápsida. El revelado de las proteínas p24 se efectúa según el método desarrollado por LI-COR, con el dispositivo Odyssey y el programa informático Odyssey 2.1. El anticuerpo primario utilizado es un anti-p24 (Santa Cruz N° SC-57823) para la detección de proteínas p24 de la cápsida del VIH. El anticuerpo se utiliza con una dilución de 1/200 en PBS1X-Tween 0,1% + bloqueador Odyssey (1:1). El anticuerpo secundario de cabra utilizado acoplado al fluorocromo "Dey 800" de LI-COR se dirige contra los anticuerpos primarios.

30

35

Cuantificación de proteínas residuales y ADN residual específico:

Las proteínas totales se cuantifican por el método de Bradford (Bio-Rad) con albúmina sérica como patrón. El ensayo se realiza según con las instrucciones del proveedor.

40

ADN residual: La cuantificación del ADN residual de origen plasmídico y/o procedente de la célula hospedante se realiza por PCR cuantitativa. Las muestras se tratan con proteinasa K (Roche) y luego el ADN se extrae utilizando el sistema de kit de pequeño volumen MagNA Pure ADN y viral NA (MagNA Pure 96 Roche). Luego se realiza una PCR cuantitativa en tiempo real, con cebadores específicos para el gen de kanamicina con el fin de detectar el ADN residual de origen plasmídico. Para detectar el ADN residual de la célula hospedante, se utilizan cebadores que se dirigen al gen E1A. La cuantificación absoluta se realiza con respecto a un plásmido de referencia que contiene las regiones amplificadas por PCR cuantitativa y cuyo número de copias es conocido.

45

Tabla A: Tampones usados durante el procedimiento

	Tampones	pH	Sacarosa (Sigma-Aldrich)	MgCl ₂ (Sigma-Aldrich)
Tampón A	L-histidina 20 mM (Sigma-Aldrich)	5,0	5% P/V	2 mM
Tampón B	Bis-Tris 20 mM (Sigma-Aldrich)	5,5		
Tampón C	Bis-Tris 20 mM (Sigma-Aldrich)	6		
Tampón D	PBS (GIBCO®)	7,2		
Tampón E	Bis-Propano 20 mM (Sigma-Aldrich)	8		

Resultados

Esta invención se refiere al desarrollo y al establecimiento de un nuevo protocolo para la purificación de vectores lentivirales derivados del HIV-1 u otros retrovirus producidos por transfección transitoria o con células productoras estables y pseudotipadas con diferentes glicoproteínas de envoltorio, tales como GaLV-TR, VSV-G, virus del sarampión y vectores γ -retrovirales GaLV producidos a partir de células estables, tales como PG13, asegurando un buen rendimiento y una buena calidad de partículas virales purificadas. Este desarrollo se basa esencialmente, pero no exclusivamente, en tres técnicas de purificación: TFF (filtración de flujo tangencial), cromatografía de intercambio de aniones y cromatografía de exclusión. Las diferentes combinaciones se ilustran en la Figura 1

10 Cultivo de células y clarificación:

Estas etapas consisten en producir vectores retrovirales y lentivirales utilizando células estables, tales como PG13 caracterizadas por una producción estable y en continuo de vectores retrovirales en cultivo continuo con un cambio de medio regular o células, tales como HEK293 o HEK293T que deben ser transfectadas por 3 o 4 plásmidos (que proporcionan las funciones "auxiliares" del lentivirus y la secuencia del vector recombinante) con el fin de inducir la producción de vectores lentivirales. La producción transitoria está limitada en el tiempo y permite una o varias recolecciones algunos días después de la transfección. Los títulos en general dependen de la construcción (secuencia) del vector, pero también de la proteína de la envoltorio. Los títulos siguientes se pueden obtener con estos sistemas de producción (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de vectores obtenidas con los diferentes sistemas de producción:

Célula de producción, vector-pseudotipo	Concentración del vector (TU/mL, gi/mL)	Referencias
PG13, MLV-GaLV-TR	5x10 ⁶ TU/mL	Miller et al., 1991
HEK293T, LV (HIV-1) - GaLV-TR	5x10 ⁵ TU/mL	Sakuma et al, 2010
HEK293T, LV (HIV-1) -VSVg	1-5x10 ⁷ TU/mL	Merten et al. 2011

Antes de cualquier tratamiento posterior, es posible eliminar los restos celulares y los agregados presentes en el líquido sobrenadante de la producción. Convencionalmente, se usa un filtro de 0,45 μ m (acetato de celulosa). El rendimiento de esta etapa es 80 \pm 5%. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden utilizar otras membranas o cascadas de membranas, caracterizadas por un comportamiento y rendimiento similares.

25 Filtración de flujo tangencial:

La filtración de flujo tangencial comprende dos etapas sucesivas de ultrafiltración y de diafiltración (UF/DF). Estas dos etapas permiten eliminar una gran parte de los contaminantes cuyo tamaño sea inferior al tamaño de exclusión de los poros de la membrana utilizada. Esta etapa de UF/DF permite también concentrar las partículas virales y reducir el volumen del producto que se ha de purificar. Se utilizó una membrana de 110 cm² con un tamaño de exclusión de poros de 750 kDa (GE HealthCare). Antes de comenzar la UF, se añaden al producto clarificado diferentes concentraciones de sacarosa (principalmente 5% de sacarosa (peso/volumen)) y diferentes concentraciones de MgCl₂ (principalmente MgCl₂ 2 mM (concentración final)). Luego, la etapa de concentración por UF se realiza a un caudal de 80 mL/min, 0,49 kg/cm² manométricos (7 psig). El depósito de la TFF se coloca en un cubo de hielo para asegurar una temperatura baja durante la UF/DF. La etapa de diafiltración comienza después de haber reducido el volumen desde 500 mL hasta 20 mL durante la UF. Para la DF, se utilizan 200 mL (10 volúmenes del producto concentrado) del tampón de diafiltración: PBS, 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM. Al final de esta etapa, se

recuperan 20 mL de producto de la UF/DF en un tubo Corning de 50 mL. La elección del tampón depende de la utilización de la preparación o de las condiciones óptimas de la etapa que sigue a la concentración/diafiltración (por ejemplo: en este caso se pueden utilizar otros tampones como Bis-Tris (pH 6,0), 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM) – véase la Tabla A. Las muestras se titulan en células HCT116 como ha sido descrito por Fenard et al., (2013).

5 Estudios de optimización de las condiciones de concentración/diafiltración:

1. Las partículas lentivirales tienen un diámetro que varía de 80 a 120 nm, lo que significa que el tamaño de poros de las membranas utilizables para la concentración/diafiltración puede llegar al máximo hasta aproximadamente 50 nm (o 750 kDa). En el marco de esta invención, se han evaluado tamaños de corte de 500 kDa y 750 kDa. Los rendimientos (en TU) fueron los siguientes: 64% para la membrana de 750 kDa frente a 34% de rendimiento de TU para la membrana de 500k Da.

15 La Figura 2 muestra los geles de electroforesis (SDS-PAGE y transferencia de Western) para las preparaciones de vectores después de filtración tangencial utilizando membranas con un corte de 500 kDa y 750 kDa. Además de los rendimientos más elevados obtenidos con la utilización de membranas de 750 kDa, está claro que un corte de 750 kDa tuvo un efecto positivo (Fig. 2, columnas 2, 3) en comparación con la utilización de la membrana de 500 kDa al nivel de eliminación de proteínas contaminantes (Fig. 2, columnas 5, 6). Además, el concentrado generado con la membrana de 750 kDa contiene bandas de proteínas mucho menos intensas que las observadas para el líquido sobrenadante en bruto.

2. Dado que la etapa de filtración tangencial se caracteriza por la generación de campos de cizallamiento que conducen a la inactivación de las partículas retrovirales/lentivirales, fue necesario optimizar esta etapa para mantener la funcionalidad de estos vectores. Se evaluó la adición de un poliol a diferentes concentraciones con el fin de proteger el vector lentiviral de las condiciones adversas de la filtración tangencial.

Tabla 2. Rendimiento de concentración/diafiltración de LV-GaLV-TR utilizando diferentes concentraciones de sacarosa.

	Rendimiento% (TU)
0% de sacarosa	50,83
2% de sacarosa	80,31
5% de sacarosa	80,40
10% de sacarosa	52,37
15% de sacarosa	68,49

25 Nota: 190 mL de líquido sobrenadante en bruto se concentraron hasta 17 mL y se diafiltraron varias veces con PBS (pH 7) + diferentes % de sacarosa y MgCl₂ 2 mM.

Estos resultados muestran claramente el interés de llevar a cabo la concentración/diafiltración del líquido sobrenadante que contiene los vectores LV-GaLV-TR en presencia de sacarosa y MgCl₂. Los mejores rendimientos se obtienen a concentraciones de sacarosa del 2% al 5% (Tabla 2).

30 Además, la utilización de una concentración moderada de sacarosa tiene la ventaja de que la muestra que se ha de concentrar es menos viscosa porque las elevadas concentraciones de sacarosa (10% - 15%) conducen a un aumento de la viscosidad.

3. Evaluación del pH y su efecto sobre la filtración tangencia y el rendimiento del vector funcional:

35 En la solicitud patente FR 13 58909 depositada por la presente firma solicitante, se ha demostrado que la producción de vectores envueltos pseudotipados con diferentes proteínas de envoltente aumenta cuando se utiliza un pH 6,0 (hasta 2 X). Se decidió evaluar el impacto de la elección del pH del líquido sobrenadante que contiene los vectores lentivirales sobre la eficacia de la filtración tangencial. En este contexto, se evaluaron dos valores de pH diferentes (pH 6 y pH 7) durante la concentración/diafiltración de los vectores lentivirales pseudotipados GaLV-TR (Tabla 3). La reducción del pH de 7,0 a 6,0 condujo a una reducción en el rendimiento de aproximadamente 10% (de 73,6% a 64%). Sin embargo, este rendimiento sigue siendo aceptable y, por lo tanto, es posible prever una concentración/diafiltración a pH ácido.

Tabla 3. Impacto del pH del líquido sobrenadante que se ha de concentrar/tampón de diafiltración sobre los rendimientos de concentración/diafiltración de los vectores lentivirales pseudotipados GaLV-TR y VSV-g.

Condición de filtración tangencial	Vector LV	Rendimiento (% TU)
PBS, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 7,0	LV-GaLV-TR	73,64
BISTRIS 20 Mm, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2mM, pH 6,0	LV-GaLV-TR	63,99

4. Identificación de la mejor condición para la concentración/diafiltración de los vectores lentivirales GaLV-TR:

Con respecto a los lentivirus GaLV-TR, la mejor condición de concentración/diafiltración (filtración tangencial) fue la siguiente: los vectores LV-GaLV-TR (1L) se clarifican a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm, en presencia de 5% de sacarosa y MgCl₂ 2 mM, seguido de la etapa de TFF (cartucho de 750 kDa, 410 cm²) con reducción del volumen hasta alcanzar 20 mL (50X). Luego se realiza una etapa de diafiltración frente a un volumen de 200 mL de tampón apropiado (por ejemplo: Bis-Tris 20 mM, pH 6,0, 5% de sacarosa y MgCl₂ 2 mM o PBS, pH 7,0, 5% de sacarosa y MgCl₂ 2 mM).

El rendimiento de esta etapa para los vectores LV-GaLV-TR es 86%±5%, para un volumen inicial de 550 mL del producto en bruto. El volumen del producto concentrado es 15 mL con un factor de concentración de 36,6X y la eliminación de contaminantes alcanza más del 90%.

5. Evaluación de las condiciones de filtración tangencial establecidas para la concentración/diafiltración de otros vectores retrovirales y lentivirales pseudotipados con diferentes proteínas de envoltente:

En las publicaciones científicas se han evaluado diferentes proteínas de envoltente para estudiar y mejorar el tropismo de los vectores retrovirales y lentivirales. En este contexto, las condiciones establecidas para la concentración/diafiltración de los vectores lentivirales GaLV-TR se evaluaron para la concentración/diafiltración de los vectores retrovirales y lentivirales pseudotipados con diferentes proteínas de envoltente (Tabla 4). Los resultados obtenidos con los vectores lentivirales pseudotipados GaLV-TR se indican como referencia.

Tabla 4. Concentración/diafiltración de vectores retrovirales pseudotipados con diferentes proteínas de envoltente:

Condición de filtración tangencial	Vector retroviral	Rendimiento % (TU)
BISTRIS, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 6,0	MLV-GaLV (PG13)	94,2
PBS, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 7,0	LV-GaLV-TR	73,64
BISTRIS, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 6,0	LV-GaLV-TR	63,99
Bis-tris, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 6,0	LV-MV-CMHII	61,22
PBS, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 7,0	LV-MV-CMHII	65,67
PBS, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 7,0	LV-VSV-g	107
Bis-Tris, 5% de sacarosa, MgCl ₂ 2 mM, pH 6,0	LV-VSV-g	104

Nota: MLV-GaLV: retrovirus de múrido pseudotipado GaLV; LV-GaLV-TR: lentivirus pseudotipado GaLV-TR; LV-MV: lentivirus pseudotipado con la envoltente del virus del sarampión (CMHII modificada); LV-VSV-g: lentivirus pseudotipado VSV-g

Los resultados presentados en la Tabla 4 muestran que todos los vectores retrovirales o lentivirales pseudotipados con diferentes proteínas de envoltente se pueden concentrar en presencia de sacarosa y MgCl₂ a un pH 7,0 lo que conduce a rendimientos que varían desde aproximadamente 74% para el LV-GaLV-TR hasta aproximadamente 100% para el VSV-g. Con respecto a la utilización de un pH de 6,0, no se observó ninguna diferencia para los vectores pseudotipados VSV-g.

En lo que respecta a los vectores lentivirales pseudotipados GaLV-TR, estos vectores se revelaron más estables a pH 7,0 durante la filtración tangencial. El rendimiento de concentración/diafiltración fue superior a 90%, mientras que el rendimiento fue de alrededor del 74% para los vectores lentivirales GaLV-TR.

Cromatografía de intercambio de aniones:

La etapa de concentración/diafiltración por filtración de flujo tangencial redujo significativamente la carga de proteínas y ADN (véase antes), lo que significa que está disminuida una parte importante de los contaminantes que podrían ser competidores de los vectores que se han de purificar para el acceso a los ligandos de la cromatografía. En principio, según la utilización posterior, se pueden imaginar dos maneras diferentes de considerar la purificación. Se muestran en la Fig. 1: un procedimiento simplificado que emplea una sola etapa de cromatografía de exclusión (A en la Fig. 1) y un procedimiento más elaborado que emplea una etapa adicional de cromatografía de intercambio de aniones para la preparación de vectores lentivirales para utilización clínica (B en la Fig. 1).

Las diferentes posibilidades de la cromatografía se desarrollan como sigue:

Justo después de la etapa de TFF UF/DF y con el fin de disminuir los contaminantes y separar las partículas virales se añade una etapa de cromatografía de intercambio de aniones. Esta técnica permite separar las biomoléculas según sus puntos isoeléctricos en función del pH y la concentración de sales. Por lo tanto, a un valor de pH dado, se requiere una cierta concentración de sales (a menudo NaCl) con el fin de eliminar las biomoléculas retenidas y esta concentración se debe elegir según la fuerza de interacción entre las biomoléculas y los ligandos: cuanto más elevada es esta interacción más elevada debe ser la concentración de sales (salinidad). Además, cuanto mayor sea el pH del tampón de cromatografía cerca del punto isoeléctrico de la especie de biomoléculas que se ha de purificar, es necesaria menos sal para desunir las biomoléculas de los ligandos cromatográficos. Sin embargo, se sabe que los vectores retrovirales y lentivirales pierden rápidamente su poder infeccioso en función de la concentración de sal (revisado por Segura et al., 2006). Así, en un primer momento, se evaluó la estabilidad de los vectores lentivirales con diferentes concentraciones de NaCl.

1. Impacto de la salinidad sobre la estabilidad de los vectores lentivirales GaLV-TR:

Como se indicó anteriormente, la elución de las biomoléculas retenidas por una columna de cromatografía se realiza muy a menudo con gradientes de sal (tampones que contienen NaCl) o una etapa de aumento de la concentración de sal (NaCl). Por lo tanto, para evaluar el efecto de la concentración de NaCl, se llevaron a cabo ensayos de incubación de vectores lentivirales post-TFF en diferentes concentraciones de NaCl que varían de 50 mM a 1500 mM, a temperatura ambiente durante 4 horas. La Fig. 3 representa la infectividad de los vectores lentivirales a temperatura ambiente en función de la concentración de NaCl con respecto a las condiciones sin NaCl añadido o la misma preparación de vectores incubada a 4°C sin NaCl añadido. Este ensayo muestra claramente que una concentración de NaCl comprendida entre 50 mM y 1 M tiene un efecto moderadamente perjudicial sobre la estabilidad de los vectores lentivirales GaLV-TR con una pérdida de infectividad que varía de 29,52% (NaCl 50 mM) a 43,86% (NaCl 1 M) (porcentaje con respecto a la preparación conservada a 4°C). Por el contrario, la concentración de 1,5 M de NaCl conduce a una pérdida de infectividad del 63,8% cuando la preparación de vectores se conserva a temperatura ambiente durante 4 horas. Cabe señalar que la conservación a 20°C (temperatura ambiente) durante 4 horas sin NaCl añadido también conduce a una pérdida de infectividad de los vectores de aproximadamente 23% respecto a la conservación a 4°C.

Estos resultados significan que es indispensable eluir los vectores lentivirales GaLV-TR de los soportes cromatográficos con una salinidad lo más baja posible, por lo que idealmente por debajo 1 M de NaCl para mantener la infectividad al máximo. Además, también es preferible realizar toda la purificación (todas las etapas) a una temperatura reducida (idealmente entre 4°C y 10°C).

2. Evaluación de diferentes soportes de cromatografía de intercambio de aniones (AEX):

Los inventores utilizamos soportes de cromatografía de intercambio de aniones débiles (DEAE (D)) para determinar si era posible limitar la inactivación de los vectores con este tipo de soporte, particularmente intentando disminuir la concentración de sal necesaria para desunir dichos vectores de la columna de cromatografía. En ensayos preliminares que utilizan un líquido sobrenadante concentrado que procede de cultivos de células PG13 (MLV-GaLV), fue posible mostrar que la utilización de un soporte cromatográfico basado en DEAE (Tosh TSK gel DEAE 5PW) conduce a un rendimiento de vector infeccioso de aproximadamente 71%, rendimiento más elevado que cuando se utiliza un intercambiador fuerte (Q Sepharose FF GE HealthCare) cuyo rendimiento fue solo 16%, debido a una interacción demasiado fuerte que conduce a una inactivación durante la elución. En este ejemplo, la concentración de sal requerida para desunir los vectores retrovirales fue 655 mM y 915 mM, respectivamente.

En base a estos resultados, se eligieron intercambiadores de aniones débiles para la continuación del desarrollo: se evaluaron varios soportes de cromatografía: Monolith CIM D (DEAE), Poros D50 (Life Technologies), Sartobind D (Sartorius) (Bandeira et al., 2012), Toyopearl 650C DEAE (Merten et al., 2011).

Como ensayos preliminares, se evaluaron tres soportes para la purificación de los vectores lentivirales GaLV-TR a un pH 5,5 o 6,0 y 7,0. Para todos los soportes analizados a un pH 5,5 o 6,0 y 7,0, la elección de pH bajo (5,5 o 6,0) fue beneficiosa al nivel de rendimiento del vector infeccioso: en lo que se refiere al soporte CIM D DEAE el rendimiento aumentó de 23% (pH 7,0) a 64% (pH 6,0) con la reducción del pH de los tampones utilizados para la cromatografía de 7,0 a 6,0 (Fig. 4). Se observaron resultados similares para los soportes Sartobind 75D (aumento del rendimiento del 5,8% al 15,6%) y Poros D (aumento del rendimiento del 32% (pH 7,0) al 80,2% (pH 6,0 y

aproximadamente 100% (pH 5,5)), y para el gel Toyopearl 650C (aumento del rendimiento del 23% (pH 7,0) al 89% (pH 5,5)) (Fig. 4). Además, para desunir los vectores de los soportes, la salinidad del tampón de elución podría ser pequeña durante la cromatografía a pH 6,0 (por lo tanto, más suave para los vectores lentivirales). En cuanto al soporte Poros D utilizado a pH 6,0, la elución de los vectores se hizo a NaCl 650 mM (véase más adelante). En términos de eficacia general, los soportes 'modernos' (desarrollados más recientemente, que generan fuerzas de cizallamiento reducidas (principalmente debido a una mayor porosidad que para otros sustratos) durante la cromatografía y caracterizados por la incompresibilidad del soporte durante la modificación del caudal del tampón, como el Monolith D DEAE o Poros D) han mostrado rendimientos superiores a los rendimientos de los soportes con membrana (Sartobind 75D) o soportes a base de gel comprimible (Toyopearl 650C).

Finalmente, la elección recayó en los soportes recientes porque su eficacia de separación y recuperación en vectores fue superior en comparación con los soportes más convencionales. Por lo tanto, estos dos soportes se han evaluado más ampliamente y su utilización se ha optimizado para la purificación de vectores lentivirales. Los dos soportes, CIM D DEAE y Poros D, tienen un rendimiento interesante superior al 60%. La elución se hace a NaCl 650 mM, Bis-Tris, 5% de sacarosa, MgCl₂ 2mM pH 6,0. Un aumento del pH del tampón de elución a 7,0 (PBS) da como resultado una caída en el rendimiento a un valor inferior al 7%, pero la adición de 5% de sacarosa al PBS da como resultado un aumento significativo de aproximadamente 7% a 40%. Sin embargo, en este caso es necesario utilizar una concentración de NaCl superior a 1M. De hecho, se ha comprobado que a pH 7,0 para la elución de los vectores (tampón sin sacarosa añadida) será necesario aproximadamente NaCl 1,5 M en PBS, lo que probablemente sea la explicación del bajo rendimiento. Se conoce el efecto negativo de la concentración de sales sobre la estabilidad de las partículas virales (Segura et al., 2005).

3. Evaluación de diferentes valores de pH sobre la eficacia de la cromatografía utilizando el soporte Poros D:

El pH se varió en el intervalo de 5,5 a 8,0 en presencia y ausencia de 5% de sacarosa. La presencia de 5% de sacarosa tiene un efecto positivo a nivel del rendimiento durante la etapa de la cromatografía de intercambio de aniones cuando el pH es superior a 5,5 (por ejemplo, Poros D) (Tabla 5). El efecto positivo de la presencia de sacarosa sobre el rendimiento ya no se observa a pH 5,5. Por el contrario, la presencia de sacarosa es indispensable a un pH 8,0 para recuperar aproximadamente 58% de los vectores infecciosos. Mientras se usa un pH que varía de 6,0 a 7,0, el rendimiento está entre 52 y 65%, el mejor rendimiento (aproximadamente 100%) se obtiene a un pH de 5.5.

En general, la presencia de 5% de sacarosa conduce a una reducción de la salinidad necesaria para iniciar la elución del vector lentiviral con una disminución en la concentración de NaCl necesaria de aproximadamente 25 mM.

Tabla 5. Comparación de los rendimientos de LV-GaLV-TR por cromatografía sobre Poros D utilizando tampones de diferentes valores de pH (5,5 – 8,0) en presencia o ausencia de sacarosa.

	Con/sin sacarosa	Rendimiento en TU, %
pH 5,5 (Bis-Tris)	5% de sacarosa	105,98
	0% de sacarosa	101,33
pH 6,0 (Bis-Tris)	5% de sacarosa	52,32
	0% de sacarosa	29,29
pH 7,0 (PBS)	5% de sacarosa	65,52
	0% de sacarosa	10
pH 8,0 (Bis-Tris-propano)	5% de sacarosa	57,76
	0% de sacarosa	0

4. Evaluación de un protocolo alternativo que comprende una cromatografía de intercambio de aniones como primera etapa:

Los inventores evaluamos el rendimiento obtenido durante la aplicación de una etapa de cromatografía de intercambio de aniones inmediatamente después de la etapa de clarificación. En estas condiciones, el rendimiento

observado es menor que cuando se lleva a cabo una etapa de ultrafiltración/diafiltración entre la clarificación y la cromatografía de intercambio de aniones. Por lo tanto, se seleccionó este último protocolo para la continuación de la purificación.

Cromatografía de exclusión:

- 5 La cromatografía de exclusión es un método de elección para la separación de biomoléculas por su tamaño molecular, permitiendo de este modo separar las partículas de los contaminantes.

Se utilizó el gel de filtración Cpto Core 700 (GE HealthCare), pero se pueden considerar otros soportes. Esta etapa nos permite a los inventores reemplazar el tampón de la etapa precedente por el tampón de formulación deseado, eliminar las moléculas contaminantes de tamaño inferior a 750 kDa y evitar la dilución de la muestra que se ha de cargar. Esta etapa de cromatografía se puede utilizar directamente después de la filtración de flujo tangencial (concentración/diafiltración - procedimiento A) o después de una etapa de cromatografía de intercambio de iones - procedimiento B (Fig. 1). La muestra resultante de la filtración de flujo tangencial o la muestra resultante de las fracciones de la cromatografía de intercambio de aniones que contiene los vectores lentivirales se carga en la columna de cromatografía de exclusión. En ambos casos, el rendimiento de esta etapa es 86%±4, dependiendo de las fracciones retenidas para su utilización posterior.

La Fig. 5 muestra la purificación de vectores lentivirales (concentrados y diafiltrados por filtración de flujo tangencial) por filtración en gel (Cpto Core 700). El pico de elución del vector se encuentra en el frente de paso del tampón y sale de la columna en las fracciones 4-9, recuperando aproximadamente el 70% de la cantidad de vectores inicialmente cargados en la columna (Fig. 5a). La Fig. 5B y 5C representan el análisis de cada fracción por electroforesis (Transferencia de Western, SDS-PAGE) indicando claramente la ausencia de bandas contaminantes (Fig. 5c) y la presencia de la banda de 24-25 kDa correspondiente a la proteína p24 de la cápsida del vector lentiviral.

Rendimientos y purezas:

25 Los parámetros más importantes se refieren al rendimiento global, así como a la pureza de la preparación de vectores lentivirales al nivel de la reducción de carga de proteínas contaminantes y ADN contaminante.

En lo que se refiere al protocolo B (que comprende una TFF, una cromatografía de intercambio de aniones (AEX) y una cromatografía de exclusión (SEC)) (Fig. 1) destinado a la purificación de vectores lentivirales para utilización clínica, el rendimiento es aproximadamente 50% y este protocolo permite la eliminación del 99,9% de proteínas contaminantes y el 99,9% del ADN contaminante.

30 El protocolo A (que comprende una TFF y una cromatografía de exclusión (SEC)) Fig. 1) destinado a la purificación de vectores lentivirales para utilización en investigación es más sencillo porque carece de la etapa de cromatografía de intercambio de iones. El rendimiento global es mayor debido a la reducción en el número de etapas de purificación y alcanza 60,2%, la eliminación de contaminantes de ADN residual de este protocolo simplificado es del orden de 96,17% y se observa una reducción de proteínas contaminantes de 99,63%.

35 Ejemplos prácticos de transducción de células diana:

Transducción de células CD34+:

Para determinar la calidad de los vectores purificados se transducen células CD34+ de sangre de cordón. Las células se descongelan después de 18 horas de pre-estimulación por citoquinas. La transducción se hace durante 6 horas. Luego, las células se colocan en un medio de diferenciación durante 5 días. Luego, las células se pasaron por FACS FC500 (BD Biosciences) para medir el porcentaje de expresión de la GFP. Se obtienen los resultados siguientes (Fig. 6): la purificación por concentración/diafiltración de los vectores lentivirales (GaLV-TR) conduce a un aumento de la eficacia de transducción de las células CD34+ (expresado como un porcentaje de células que expresan GFP) que va desde el 9% cuando se utiliza un líquido sobrenadante en bruto al 70% para la utilización de una preparación de vectores LV concentrado/diafiltrado.

45 Purificación de un vector lentiviral pseudotipado por medio de una envoltente modificada del virus del sarampión

Se describe un procedimiento de purificación un vector lentiviral pseudotipado usando la glicoproteína modificada de la envoltente del virus del sarampión (pseudotipaje MV). Los vectores lentivirales LV-MV-CMHII (CMHII = anti-CMHII) producidos de acuerdo con el procedimiento indicado anteriormente se purifican según las siguientes etapas:

1) Concentración/diafiltración usando una etapa de TFF

- 50 - membrana utilizada: GE #UFP-750-E-3MA 110 cm², para la purificación de un litro de producto
- tampón de diafiltración: PBS ((pH 7,0), MgCl₂ 2 mM, 5% de sacarosa)

- reducción de volumen: de 500 mL/1000 mL a 20 mL, siendo reemplazado el tampón por el tampón de diafiltración

- rendimiento de vectores infecciosos: 64-70%

2) Cromatografía de exclusión (filtración en gel):

- 5 - columna utilizada: Capto Core 700 4,7mL
- tampón de formulación: PBS, 5% de sacarosa, MgCl₂ 2 mM o bien X-vivo o HANKS, que contiene 5% de sacarosa y MgCl₂ 2mM
- equilibrado de la columna con 10 CV de un tampón de formulación
- carga del concentrado de la TFF en la columna Capto Core 700 a un caudal de 0,5 mL/min
- 10 - lavado de la columna con 20 CV de tampón de formulación
- recogida de las muestras correspondientes al pico de DO (volumen 21 mL a 50X)
- rendimiento de vectores infecciosos:> 90% en TU

El rendimiento global de esta purificación es de 60 a 63% en vectores infecciosos, lo que representa un avance importante para la purificación y, por lo tanto, la explotación de los vectores lentivirales pseudotipados por medio de la glucoproteína MV modificada.

Referencias bibliográficas

- Anliker B, Abel T, Kneissl S, Hlavaty J, Caputi A, Brynza J, Schneider IC, Münch RC, Petznek H, Kontermann RE, Koehl U, Johnston IC, Keinänen K, Müller UC, Hohenadl C, Monyer H, Cichutek K, Buchholz CJ (2010) Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. *Nat. Methods* 7: 929-935.
- 20 - Ansorge S, Henry O, Kamen A (2010) Recent progress in lentiviral vector mass production. *Biochem. Eng. J.* 48: 362-377.
- Bandeira V, Peixoto C, Rodrigues AF, Cruz PE, Alves PM, Coroadinha AS, Carrondo MJT (2012) Downstream processing of lentiviral vectors: releasing bottlenecks. *Hum. Gene Ther. Methods.* 23: 255-263.
- 25 - Charrier S, Ferrand M, Zerbato M, Précigout G, Viorneri A, Bucher-Laurent S, Benkhelifa-Ziyyat S, Merten O-W, Perea J, Galy A (2011) Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther.* 18: 479-487.
- Christodoulopoulos I, Cannon, PM (2001) Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J. Virol.* 75: 4129-4138.
- 30 - Greene MR, Lockey T, Mehta PK, Kim YS, Eldridge PW, Gray JT, Sorrentino BP (2011) Transduction of human CD34+ repopulating cells with a self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 produced at clinical scale by a stable cell line. *Hum. Gene Ther. Methods* 23: 297-308.
- Fenard D, Ingrao D, Seye A, Buisset J, Genries S, Martin S, Kichler A, Galy A (2013) Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2: e90
- 35 - Frecha C, Szecsi J, Cosset FL, Verhoeyen E (2008) Strategies for targeting lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 8: 449-460.
- Hasslacher M, Mayer C, Mitterer A (2009) Method of concentrating shear-sensitive biopolymers using hollow fibre membranes. WO patent 2010/025278A1Kutner RH, Puthli S, Marino MP, Reiser J (2009) Simplified production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors using HYPERFlask vessels and anion exchange membrane chromatography. *BMC Biotechnol.* 9: 10.
- 40 - Merten, O-W (2004) State of art of the production of retroviral vectors. *J. Gene Med.* 6: S105-S124.
- Merten O-W, Charrier S, Laroudie N, Fauchille S, Dugué C, Jenny C, Audit M, Zanta-Boussif MA, Chautard H, Radrizzani M, Vallanti G, Naldini L, Nogueiez-Hellin P, Galy A (2011) Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Hum. Gene Ther.* 22: 343-356.
- 45 - Miller AD (2001) Production of retroviral vectors. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Chapter 12: Unit 12.5.

- Miller AD, Chen F. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J. Virol.* 70: 5564-5571.
- Miller, AD, Garcia, JV, Von, SN, Lynch, CH, Wilson, C, Eiden, MV (1991) Construction and properties of retrovirus packaging cells based on the gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 65: 2220-2224.
- 5 - Münch RC, Mühlebach MD, Schaser T, Kneissl S, Jost C, Plückthun A, Cichutek K, Buchholz CJ (2011) DARPins: an efficient targeting domain for lentiviral vectors. *Mol. Ther.* 19: 686-693.
- Pfeifer A, Hofmann A (2009) Lentiviral transgenesis. *Methods Mol. Biol.* 530: 391-405.
- Rodrigues AF, Alves, PM, Coroadinha AS (2011). Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. *Viral Gene Therapy.* K. Xu, InTech. Chapter 2: 15-40.
- 10 - Sakuma T, De Ravin SS, Tonne JM, Thatava T, Ohmine S, Takeuchi Y, Malech HL, Ikeda Y (2010) Characterization of retroviral and lentiviral vectors pseudotyped with xenotropic murine leukemia virus-related virus envelope glycoprotein, *Hum. Gene Ther.* 21: 1665-1673.
- Schweizer M, Merten O-W (2010) Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 10: 474-486
- 15 - Segura MM, Kamen A, Garnier A (2006) Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnol. Adv.* 24: 321-337.
- Segura MM, Kamen A, Trudel P, Garnier A (2005) A novel purification strategy for retrovirus gene therapy vectors using heparin affinity chromatography. *Biotechnol. Bioeng.* 90: 391-404.
- 20 - Stacey GN, Merten O-W (2011) Chapter 3: Hosts cells and cell banking. In: Merten O-W, Al-Rubeai M (eds.): *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, in the series of: *Methods in Molecular Biology* 737, Humana Press, New York, NY, pp 45-88.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la purificación de un retrovirus, en particular un lentivirus, eventualmente pseudotipado con la glicoproteína de envoltente GaLV, GaLV-TR, VSV-g o MV, que comprende una etapa de cromatografía de intercambio de aniones, estando los tampones utilizados durante dicha cromatografía:
- a pH comprendido entre 5 y 5,9, o
 - a pH comprendido entre 6 y 8 y que comprende además un poliol.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, estando el pH, del (de los) tampón(es) de la cromatografía de intercambio de aniones, comprendido entre 5 y 5,9 y que comprende(n) igualmente un poliol.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, estando el pH de los tampones comprendido entre 5,5 y 6, siendo el pH más particularmente igual a 5,5 o 6.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando precedida la etapa de cromatografía de intercambio de aniones por una etapa de ultrafiltración/diafiltración, en particular una filtración de flujo tangencial.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 4, comprendiendo la etapa de ultrafiltración/diafiltración la utilización de uno o varios tampones de pH comprendido entre 5,5 y 7,5 que contiene eventualmente un poliol.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la purificación de un retrovirus a partir del medio de cultivo celular de células productores de dicho retrovirus, comprendiendo el procedimiento:
- 20 (a) la clarificación del medio de cultivo celular, principalmente por filtración del medio de cultivo en un filtro de retención cuyo umbral de retención está comprendido entre 0,2 y 0,45 μm ;
- (b) una etapa de ultrafiltración/diafiltración de los virus clarificados, principalmente por medio de filtración de flujo tangencial;
- (c) una cromatografía de intercambio de aniones;
- 25 (d) una cromatografía de exclusión; principalmente sobre una resina de exclusión que presenta un tamaño de exclusión comprendido entre 300 y 1000 kDa.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, siendo multimodal la resina utilizada para la cromatografía de exclusión, y presentando una doble funcionalidad de exclusión y de adsorción.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, eligiéndose el poliol entre sacarosa, manitol, sorbitol y trehalosa.
- 30 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, produciéndose los virus purificados en un medio neutro o en un medio moderadamente ácido, en particular a un pH comprendido entre pH 6 y pH 7.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando presente el poliol en el tampón a una concentración comprendida entre 1,5% y 15% en peso en el tampón, en particular entre 2% y 5%, más particularmente 5%.
- 35 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, estando presente el poliol en los tampones utilizados durante una filtración de flujo tangencial y una cromatografía de intercambio de aniones.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando presente el poliol en los tampones en todas las etapas del procedimiento de purificación.
- 40 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo también los tampones utilizados durante dicho procedimiento una sal de magnesio, principalmente cloruro de magnesio, principalmente a una concentración comprendida entre 0,1 mM y 5 mM, en particular entre 1 y 3 mM, más particularmente 2 mM.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía de intercambio de aniones es una cromatografía de intercambio de aniones débil y/o una cromatografía de intercambio de aniones en columna.

45

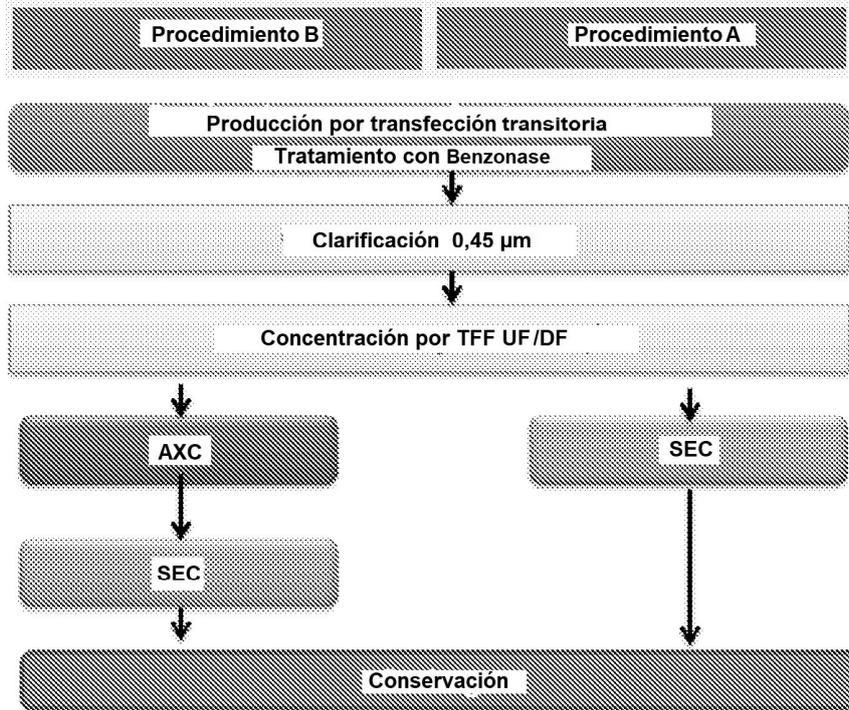


Figura 1

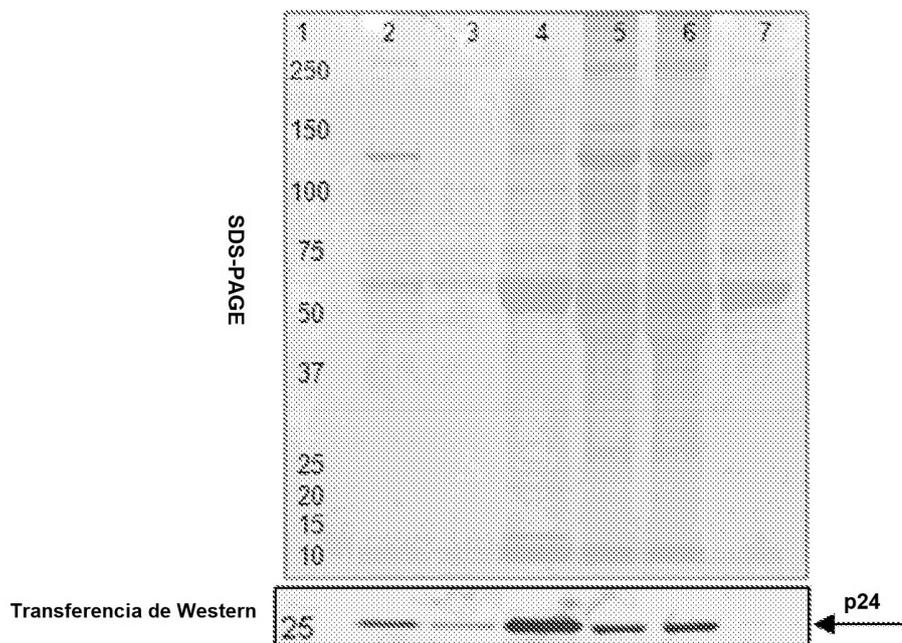


Figura 2

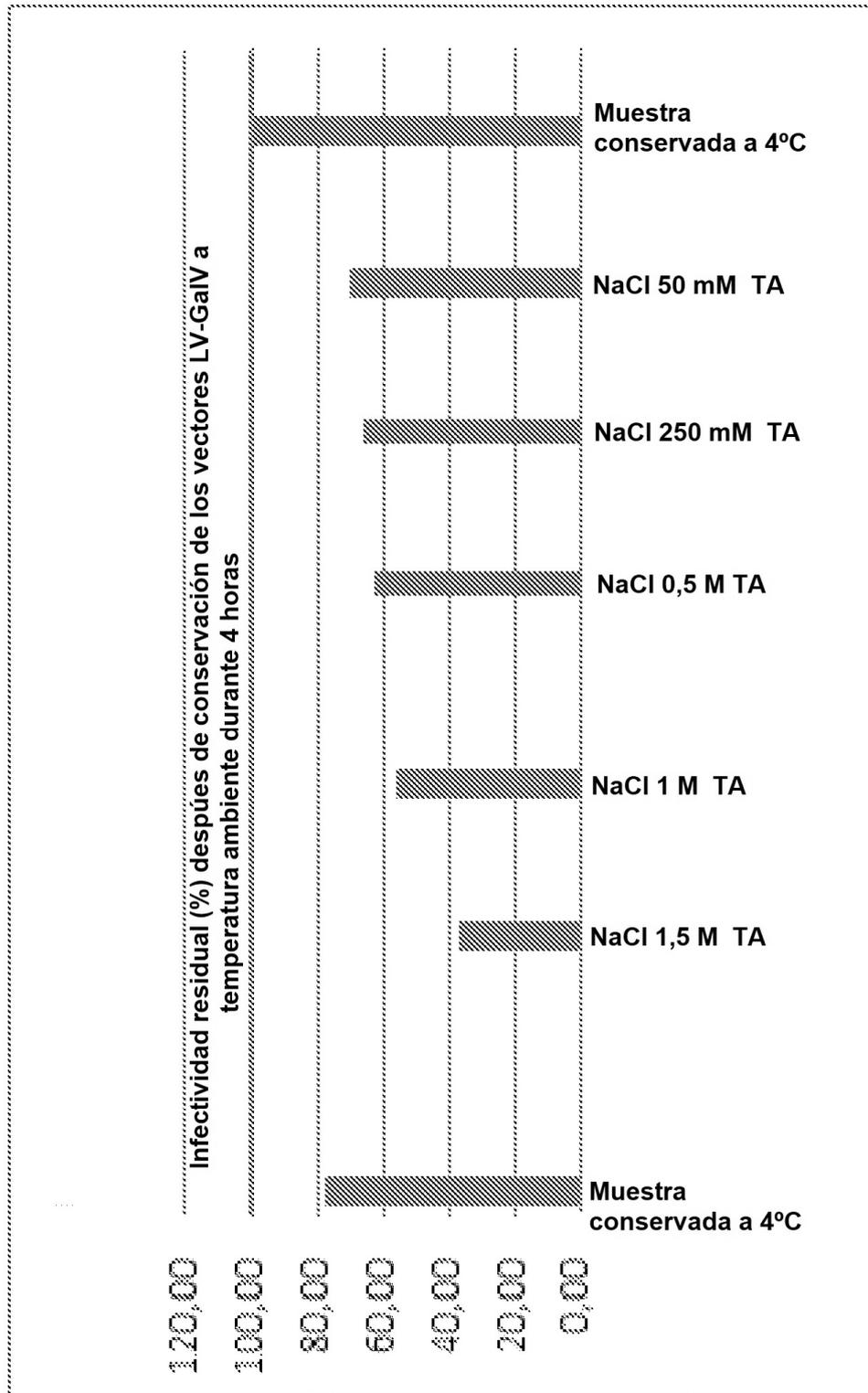
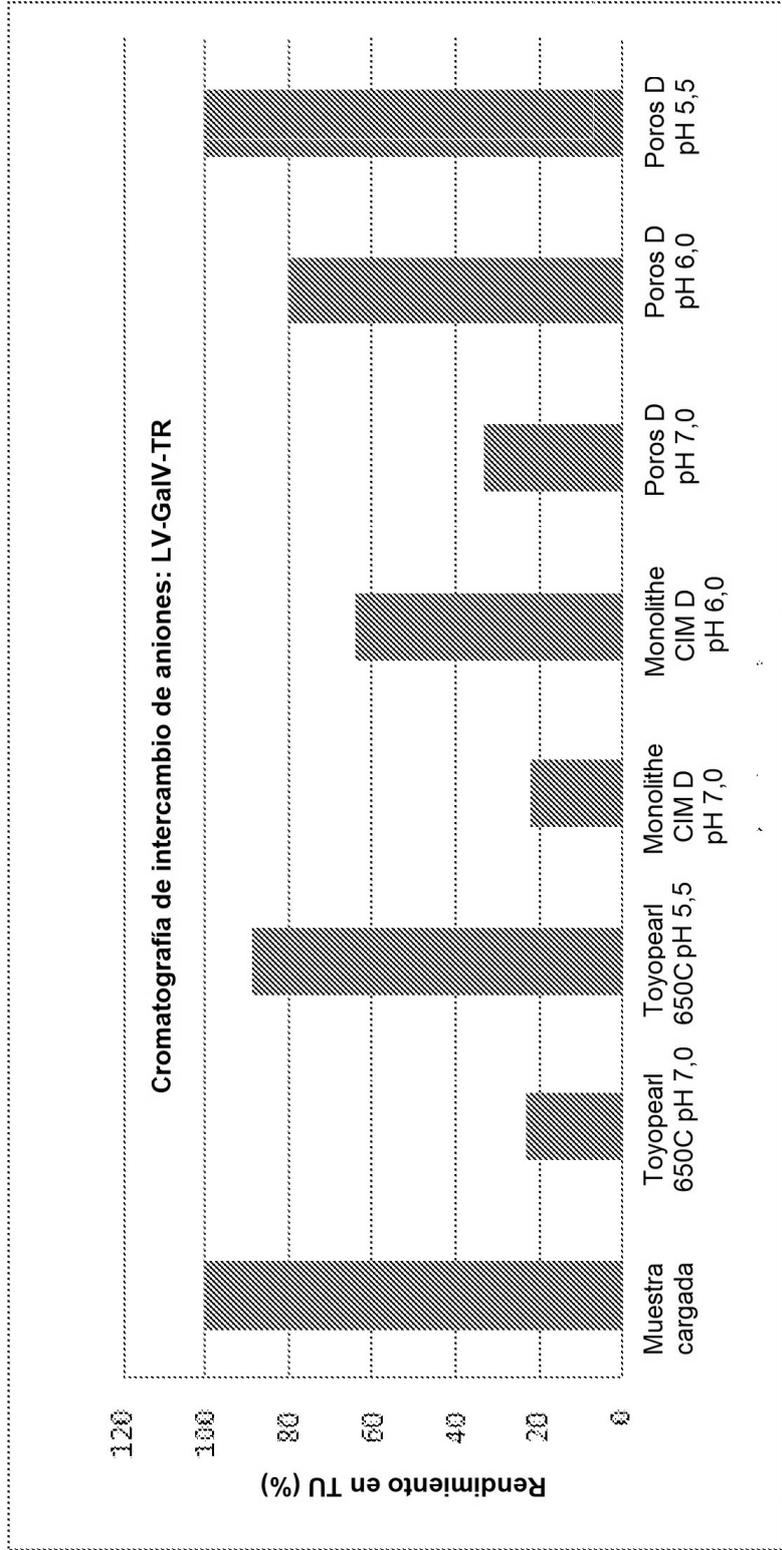


Figura 3



Ensayos de soportes, condiciones

Figura 4

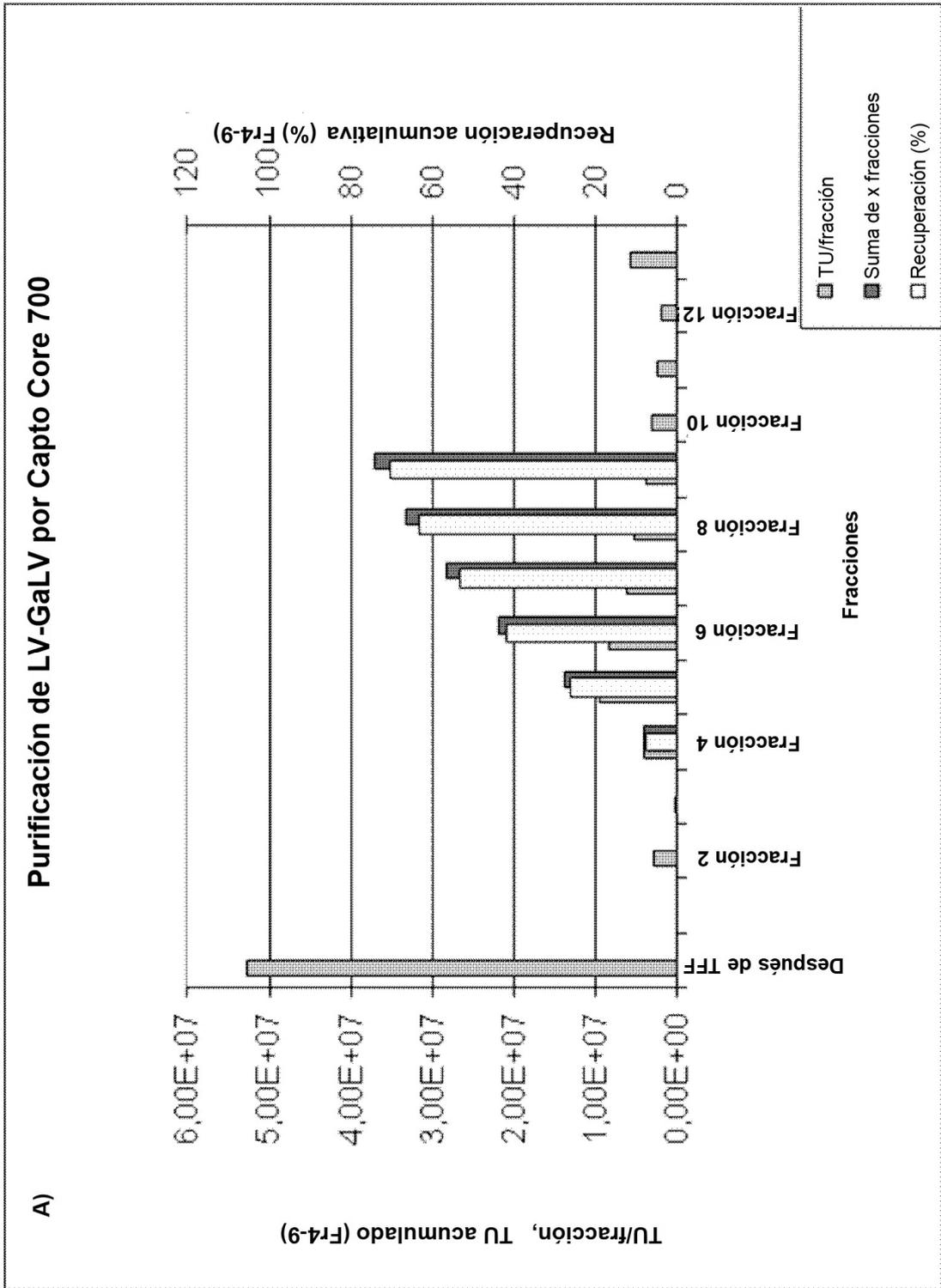


Figura 5

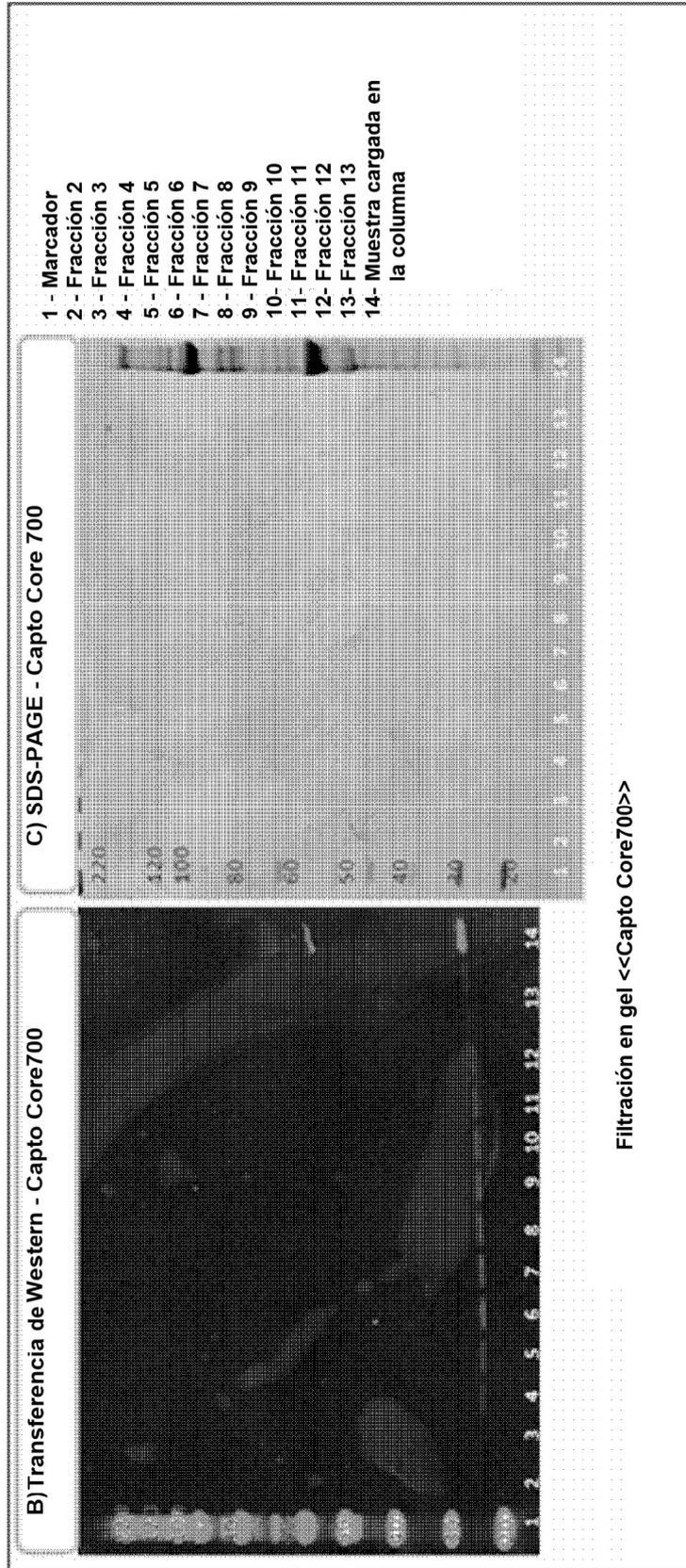


Figura 5 (continuación)

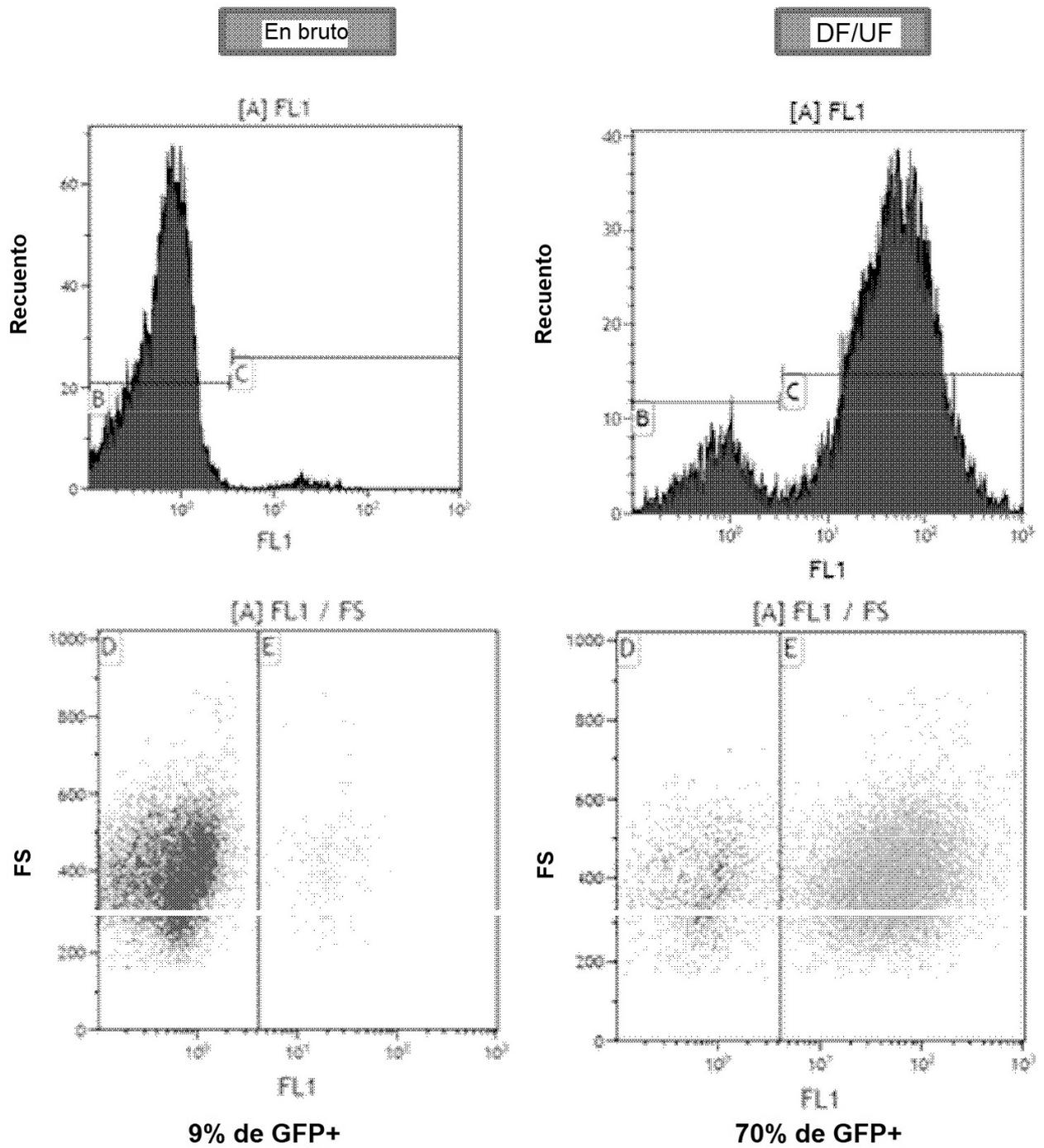


Figura 6