

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 880**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

B01D 15/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2013 E 17178956 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3246400**

54 Título: **Purificación del virus del herpes**

30 Prioridad:

09.01.2012 US 201261584461 P
21.05.2012 US 201261649625 P

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

11.06.2020

73 Titular/es:

SANOPI PASTEUR BIOLOGICS, LLC (100.0%)
38 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

MUNDLE, SOPHIA;
ANDERSON, STEPHEN y
DELAGRAVE, SIMON

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 765 880 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Purificación del virus del herpes

5 **Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere a métodos para purificar partículas víricas y composiciones que las comprenden.

10 **Antecedentes de la divulgación**

10 El VHS-2 es la causa principal de enfermedad genital ulcerosa infecciosa en todo el mundo, y el VHS-1 se está
convirtiendo en una causa cada vez más importante de infección con herpes genital. Se estima que en todo el
mundo hay 23 millones de nuevas infecciones por VHS-2 cada año. Se han analizado en la clínica varios enfoques
de vacunas para VHS-2 (revisado por Johnston C, *et al.*, J Clin Invest 2011, 121:4600-4609), con diversos grados de
15 éxito. Para abordar la falta de una vacuna eficaz, se ha construido un virus HSV-2 de cepa vacunal con replicación
defectuosa (dl5-29, que desde entonces se ha reobtenido y renombrado como ACAM529 (Delagrave S, *et al.* PLoS
ONE, 2012 7(10): e46714), también conocida como HSV529) delecionando los genes UL5 and UL29 del virus de tipo
silvestre (Da Costa X, *et al.*, J Virol 2000, 74:7963-7971). El virus de cepa vacunal dl5-29 induce una respuesta
inmunitaria protectora *in vivo* en ratones y cobayas, sin replicación ni establecimiento de latencia (Da Costa XJ, *et*
20 *al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 1999, 96:6994-6998; Hoshino Y, *et al.*, J Virol 2005, 79:410-418; Hoshino Y, *et al.*, J
Infect Dis 2009, 200:1088-1095). Adicionalmente, se demostró que dl5-29 es eficaz en la prevención de la infección
latente en cobayas, independientemente del estado serológico para el VHS-1 (Hoshino Y, *et al.*, J Infect Dis 2009,
200:1088-1095). Sin embargo, estos estudios se llevaron a cabo con una vacuna purificada utilizando métodos
basados en centrifugación que no se aumentan de escala fácilmente para la producción comercial. De hecho, varios
25 grupos han definido procedimientos a escala de laboratorio para la purificación de virus del herpes basados en
centrifugación (Arens M, *et al.*, Diagn Microbiol Infect Dis 1988, 11:137-143; Lotfian P, *et al.*, Biotechnol Prog 2003,
19:209-215); gradientes (Goins WF, *et al.*, Methods Mol Biol 2008, 433:97-113; Sathananthan B, *et al.*, APMIS 1997,
105:238-246; Sia KC, *et al.*, J Virol Methods 2007, 139:166-174; Szilagyi JF, *et al.*, J Gen Virol 1991, 72 (Pt 3):661-
668); filtración (Knop DR, *et al.*, Biotechnol Prog 2007, 23:715-721); y cromatografía de afinidad (Jiang C, *et al.*,
30 Biotechnol Bioeng 2006,95:48-57; Jiang C, *et al.*, J Virol 2004, 78:8994-9006; documento WO9945104).

Al igual que con los métodos basados en centrifugación, estos otros procedimientos tradicionales de purificación a
escala de laboratorio para virus de cepas vacunales implican procedimientos laboriosos, a los que no se les puede
cambiar la escala para la producción comercial de composiciones víricas preparadas en conformidad con las
35 directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para uso humano, dando como resultado bajos
rendimientos o una pureza insuficiente (por ejemplo, niveles excesivamente altos de ADN residual de la célula
hospedadora). La Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona un límite superior de 10 ng de ADN de la
célula hospedadora por dosis para el ser humano, por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar preparaciones de
virus con menos de 10 ng de ADN de célula hospedadora por dosis para el ser humano.

40 **Sumario de la divulgación**

La invención es como se define en las reivindicaciones.

45 La presente divulgación proporciona un método para preparar preparaciones de partículas víricas con envoltura
purificadas, incluidas preparaciones de partículas de VHS, empleando cromatografía de intercambio iónico y
filtración de flujo tangencial. Estos métodos de purificación pueden usarse para preparar preparaciones víricas de
alto rendimiento, incluidas las preparaciones de VHS (por ejemplo, VHS529), en conformidad con las directrices de
la OMS para uso humano, incluyendo la alta pureza (por ejemplo, menos de 10 ng de ADN de célula hospedadora
50 por dosis para el ser humano ejemplar (por ejemplo, 1×10^7 UFP)).

La preparación del virus de la cepa vacunal VHS529 por métodos virológicos a escala de laboratorio (incluida la
ultracentrifugación con colchón de sacarosa) da como resultado un material en bruto con más de 2 μ g de ADN
residual de la célula hospedadora por 1×10^7 UFP de VHS529 (el límite de la Organización Mundial de la Salud es de
55 10 ng de ADN por dosis para el ser humano). La presente divulgación proporciona un método para purificar VHS529,
en el que la cantidad de ADN residual de Vero es inferior a 10 ng por 1×10^7 UFP de VHS529.

Un aspecto de la presente divulgación está dirigido a un método para la purificación de partículas del virus del
herpes simple (VHS) a partir de un cultivo de células hospedadoras de mamífero, que comprende las etapas de:

- 60
- a) tratar el cultivo de células hospedadoras de mamífero con un agente de liberación de virus, tal como el sulfato de dextrano, para liberar las partículas de VHS de las células hospedadoras;
 - b) tratar el material de la etapa (a) con una endonucleasa, tal como Benzonase®;
 - c) filtrar el material de la etapa (b) para eliminar las células intactas o los restos celulares;
 - 65 d) aplicar la solución obtenida en la etapa (c) a una resina de cromatografía de intercambio aniónico;
 - e) eluir las partículas de VHS de la columna de intercambio aniónico;

- f) someter el eluyente de la etapa (e) a filtración de flujo tangencial; y
- g) recuperar las partículas de VHS purificadas.

5 En algunas realizaciones, las partículas de VHS purificadas contienen más de 1×10^7 o 2×10^7 UFP/ml. De acuerdo con la invención, las partículas de VHS purificadas contienen menos de 10 ng de ADN de la célula hospedadora por 1×10^7 unidades formadoras de placas (UFP). En una realización, el VHS es un VHS con replicación defectuosa, tal como VHS529.

10 En otro aspecto más de la divulgación, la filtración de flujo tangencial es un sistema de fibra hueca. En un aspecto, el sistema de fibra hueca tiene un límite de peso molecular de 100 kDa. En otro aspecto, la cromatografía de intercambio aniónico comprende una resina de cromatografía basada en membrana, tal como la resina Mustang® Q (Pall Life Sciences).

15 Otro aspecto de la divulgación está dirigido a una composición farmacéutica que comprende virus del herpes simple (VHS) producido en un cultivo de células de mamífero, aislándose dicho VHS mediante el método que comprende las etapas de:

- a) tratar el cultivo de células hospedadoras con un agente de liberación de virus, tal como el sulfato de dextrano, para liberar partículas de VHS de las células hospedadoras;
- 20 b) tratar el producto de la etapa (a) con una endonucleasa, tal como Benzonase®, para reducir el ADN residual de la célula hospedadora;
- c) filtrar el producto de la etapa (b) para eliminar las células intactas o los restos celulares;
- d) aplicar el filtrado de la etapa (c) a una resina de cromatografía de intercambio aniónico;
- e) eluir las partículas de VHS de la columna de intercambio aniónico;
- 25 f) someter el eluyente de la etapa (e) a filtración de flujo tangencial;
- g) recuperar las partículas de VHS purificadas; y
- h) suspender las partículas de VHS purificadas en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 De acuerdo con la invención, la cantidad de ADN de la célula hospedadora en dicha composición es de menos de 10 ng de ADN de la célula hospedadora por 1×10^7 unidades formadoras de placas (UFP). En otra realización, el VHS es un VHS con replicación defectuosa, tal como VHS529. En otras realizaciones, la composición contiene más de 1×10^7 UFP/ml, preferentemente entre aproximadamente 1×10^7 y 2×10^7 UFP/ml.

35 La invención está dirigida a una composición que comprende partículas de virus del herpes simple (VHS) en un tampón de estabilización líquido, en donde el tampón de estabilización líquido comprende glutamato, histidina, una sal y un azúcar, y en donde el ADN residual de la célula hospedadora de dicha composición es de menos de 10 ng de ADN de la célula hospedadora por 1×10^7 unidades formadoras de placas (UFP).

40 En una realización, el tampón de estabilización líquido comprende glutamato de potasio 20-75 mM, histidina 1-20 mM, sal 50-250 mM y azúcar al 5-20 %. En otra realización, el tampón de estabilización líquido comprende glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, sal 160 mM y azúcar al 10 %. En una realización, el azúcar es sacarosa. En otra realización, el pH del tampón de estabilización líquido es de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 o 7,8.

45 En una realización, el VHS es un VHS con replicación defectuosa, tal como VHS529. En otras realizaciones, la composición contiene más de 1×10^7 UFP/ml, preferentemente entre aproximadamente 1×10^7 y 2×10^7 UFP/ml.

Breve descripción de las figuras

50 La **Figura 1** proporciona una representación esquemática de una realización de la presente divulgación para la preparación de material que comprende un virus del herpes recombinante deficiente para la replicación, conocido como VHS529, producido en líneas celulares de complementación productoras.

55 La Figura 2 muestra los resultados de la elución química de VHS529 a partir de la superficie de células de complementación AV529-19 infectadas. El medio de cultivo de células se decantó a partir de células AV529-19 confluentes infectadas cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos, y se reemplazó por tampón de estabilidad que contenía sacarosa al 10 % y sulfato de dextrano (SD) 25-500 µg/ml. A las 3 h (●), 5 h (■), 8 h (▲) y 24 h (▼) después del comienzo de la elución con sulfato de dextrano, las muestras se procesaron por centrifugación a 1000 x g y se congelaron a -80 °C antes de la titulación por ensayo de placas. Los resultados representan el título (UFP/ml) del sobrenadante de la liberación con SD, las barras de error representan la desviación típica de la media.

60 La Figura 3 muestra el perfil cromatográfico durante la purificación de unión y elución a pequeña escala (moneda Q Mustang® de 0,35 ml) de VHS529 por intercambio aniónico basado en membrana. La línea continua representa el perfil de elución para la absorbancia a 280 nm, mientras que la línea de puntos representa la concentración de sal como porcentaje del tampón con alto contenido de sal (tampón B, NaCl 2 M). Durante la

fase de carga de la muestra (0-50 ml) VHS529 se unió al soporte sólido, mientras que las impurezas no unidas pasaron a través de la columna y se recogieron como la fracción de flujo continuo. La preelución de las impurezas proteicas no víricas y no unidas se consiguió aplicando una etapa de NaCl 700 mM (30 % de B) sobre 30 volúmenes de columna (50-60 ml). El VHS529 unido se eluyó de la columna aumentando gradualmente la concentración de sal a NaCl 2 M (tampón B al 100 %) sobre 30 VC (60-70 ml).

La Figura 4 muestra los resultados de la optimización de las condiciones de purificación para conseguir un rendimiento de ~ 400 dosis para ser humano mediante NUNC cell factory (fábrica de células NUNC). Cada uno de los puntos en la curva representa el rendimiento de una purificación completa, comenzando con material que se había liberado con sulfato de dextrano a partir de una única NCF de cultivo de células infectadas. Las purificaciones A-G de VHS529 se realizaron de forma secuencial, con optimización de las etapas de purificación para mejorar el rendimiento y la pureza. El rendimiento global (eje y; dosis por NCF) aumentó con el tiempo a medida que se optimizaban las condiciones de purificación. La FFT de lámina plana se probó originalmente como una opción para la concentración y formulación de virus vacunal parcialmente purificado (preparaciones A-D de VHS529). El bajo rendimiento de las etapas para la FFT de lámina plana (~ 20-40 %) condujo a la prueba de la FFT de fibra hueca como alternativa (preparaciones E-G), con una mejora notable (~ 70-100 % de rendimiento de las etapas) de la recuperación de virus infeccioso. Adicionalmente, se probó el intercambiador de aniones fuertes de alta capacidad Fractogel TMAE HiCap (LECHO, Preparación G) como una alternativa a Q Mustang® (MEMBRANA, preparaciones A-F) como etapa de cromatografía de unión y elución.

La **Figura 5** muestra la pureza de las preparaciones de virus VHS529. Las tablas proporcionan la superposición del rendimiento (●) (panel A) con los resultados de pureza (⊗) (paneles B-D) para las preparaciones A-G de VHS529. Los ejes y derechos en los paneles B-D representan los resultados de los ensayos de pureza: qPCR de ADN residual de Vero, LOQ (forma siglada de *limit of quantitation*, límite de cuantificación) ≤ 1 pg/μl (B), ELISA de SD, LOD (forma siglada de *limit of detection*, límite de detección) 3 ng/ml (C) y ELISA de HCP para Vero, LOD 2 ng/ml (D). En el panel C, para las preparaciones A-F, y el panel D, preparación D, en que no hay ningún punto de datos de pureza, la cantidad de impurezas en el material final fue inferior al LOD específico del ensayo. En todos los casos, la pureza de la preparación F superó la de la preparación G, ejemplificando por qué se decidieron las condiciones de la preparación F para su uso como esquema de purificación final.

La **Figura 6** demuestra que el VHS529 purificado por cromatografía es tan inmunogénico y protector como el VHS529 purificado por ultracentrifugación con colchón de sacarosa. El panel A es una representación esquemática del cronograma de estudio en animales, las flechas largas marcadas representan inoculaciones víricas (se realizaron inmunizaciones s.c. y el desafío fue intravaginal), las flechas cortas simbolizan las extracciones de muestras de sangre, inyección de hormona (DMPA = acetato de medroxiprogesterona de depósito o Depo-Provera) y el día final del estudio, como se indica. El panel B muestra los títulos de ELISA de punto final frente a un lisado vírico de VHS-2 purificado disponible en el mercado para los ratones inmunizados y el Panel C representa la supervivencia de los animales como un % del total (n=15 animales). Los ratones se inmunizaron con VHS529 purificado con Q Mustang® (●) o por colchón de sacarosa (▲), o con un placebo (◆) (PBS). Ambas preparaciones vacunales suscitaron títulos de ELISA anti-VHS-2 similares (Prueba de Kruskal-Wallis, P = 0,99) y niveles similares de protección contra la exposición severa a virus con VHS-2 cepa 333 de tipo silvestre (Prueba Mantel-Cox, P <0,0001).

Descripción detallada de la divulgación

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Para avanzar en el desarrollo de vacunas contra el virus del herpes simple (VHS) (por ejemplo, VHS529) más allá de los modelos animales y hacia estudios clínicos, se desarrolló un procedimiento al que se le puede cambiar la escala capaz de producir material vírico adecuado para uso humano. Se elaboró una versión funcional altamente purificada de HSV529 mediante el procesamiento de células Vero de complementación (AV529-19) infectadas, mediante una combinación de elución con sulfato de dextrano seguido de tratamiento con endonucleasa, filtración de profundidad, cromatografía de intercambio aniónico y UF/DF (a través de filtración de flujo tangencial). El rendimiento global para el procedimiento optimizado es del 10-20 % del título infeccioso en el material de partida, lo que equivale a 100-300 dosis por NUNC Cell Factory (NCF) (la variabilidad en el título de la vacuna en el material de partida explica la discrepancia entre el rendimiento y el número de dosis purificadas por NCF). Es importante destacar que, este esquema de purificación produce virus que es suficientemente puro con respecto al ADN genómico residual de Vero para el análisis en humanos (es decir, menos de 10 ng de ADN de la célula hospedadora residual por 1x10⁷ UFP).

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la purificación de una partícula vírica con envoltura, tal como una partícula del virus del herpes simple (VHS), a partir de un cultivo de células hospedadoras de mamífero, que comprende las etapas de:

a) tratar el cultivo de células hospedadoras de mamífero con un agente de liberación de virus (por ejemplo, sulfato de dextrano) para liberar las partículas víricas con envoltura de las células hospedadoras, sin lisis significativa de las células hospedadoras;

- b) aplicar la solución obtenida en la etapa (a) a una resina de cromatografía de intercambio aniónico;
- c) eluir las partículas víricas con envoltura de la columna de intercambio aniónico;
- d) someter el eluyente de la etapa (c) a filtración de flujo tangencial, y
- e) recuperar las partículas víricas con envoltura purificadas.

5 La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para la purificación de una partícula vírica con envoltura, tal como una partícula de VHS, a partir de un cultivo de células hospedadoras de mamífero, que comprende las etapas de:

- 10 a) tratar el cultivo de células hospedadoras de mamífero con un agente de liberación de virus (por ejemplo, sulfato de dextrano) para liberar las partículas víricas con envoltura de las células hospedadoras, sin lisis significativa de las células hospedadoras;
- b) someter la solución obtenida en la etapa (a) a filtración de flujo tangencial;
- 15 c) aplicar la fracción retenida de la etapa de filtración de flujo tangencial a una resina de cromatografía de intercambio aniónico;
- d) eluir las partículas víricas con envoltura de la columna de intercambio aniónico; y
- e) recuperar las partículas víricas con envoltura purificadas.

20 La divulgación proporciona adicionalmente un método como se proporciona en lo anterior, en donde antes de aplicar la solución obtenida en la etapa (a) a la resina de cromatografía de intercambio aniónico, la solución obtenida en la etapa (a) se trata con una endonucleasa (por ejemplo, Benzonase®) para degradar el ADN residual de la célula hospedadora.

25 La divulgación proporciona adicionalmente un método como se proporciona en lo anterior, que comprende adicionalmente la etapa de clarificar el material del producto mediante filtración de profundidad antes de la cromatografía de intercambio aniónico, para eliminar cualquier célula intacta y/o resto celular.

30 La divulgación proporciona adicionalmente un método para la purificación y la preparación de preparaciones purificadas de partículas de herpesvirus recombinante, en particular, partículas de virus herpes simple con replicación defectuosa, tales como partículas VHS529.

35 Las partículas víricas (por ejemplo, de VHS) purificadas de acuerdo con estos métodos se producen con un alto rendimiento, con suficiente pureza para que puedan administrarse a un ser humano, y contienen menos de 10 ng de ADN residual de la célula hospedadora por 1×10^7 UFP. En algunas realizaciones, las partículas víricas (por ejemplo, de VHS) purificadas contienen más de 1×10^7 o 2×10^7 UFP/ml. En otra realización, las partículas víricas purificadas (por ejemplo, de VHS, incluyendo, pero sin limitación, el VHS529) contienen aproximadamente el 10-20 % del título infeccioso de virus en la solución obtenida mediante el tratamiento del cultivo de células hospedadoras de mamífero con un agente de liberación de virus, tal como Benzonase®.

40 La endonucleasa es, preferentemente, una que tanto ADN como ARN. En un aspecto, la endonucleasa es una endonucleasa modificada genéticamente de *Serratia marcescens* (Eaves, G. N. *et al.* J. Bact. 1963, 85, 273-278; Nestle, M. *et al.* J. Biol. Chem. 1969, 244, 5219-5225) que se vende con el nombre de Benzonase® (EMD Millipore). La enzima se produce y purifica a partir de *E. coli* cepa W3110, un mutante de la cepa K12, que contiene el plásmido de producción pNUC1 (Patente de Estados Unidos N.º 5173418). Desde el punto de vista estructural, la proteína es un dímero de subunidades idénticas de 245 aminoácidos, de -30 kDa con dos enlaces disulfuro importantes.

45 Benzonase® degrada todas las formas de ADN y ARN (monocatenario, bicatenario, lineal y circular) y es eficaz en una amplia gama de condiciones de funcionamiento, digiriendo ácidos nucleicos a oligonucleótidos de 2-5 bases de longitud terminados en 5'-monofosfato. Benzonase® se produce con las prácticas correctas de fabricación actuales (cGMP, forma siglada de *current good manufacturing practices*) y, por lo tanto, puede usarse en procedimientos a escala industrial para la purificación de proteínas y/o de partículas víricas. Asimismo, se pueden usar en los métodos de purificación divulgados en la presente solicitud otras endonucleasas que se producen en condiciones de cGMP (forma siglada de *Good Manufacturing Practice*, prácticas correctas de fabricación).

50

55 De acuerdo con la invención, las preparaciones purificadas comprenden partículas de VHS, en un tampón de estabilización líquido que comprende glutamato, histidina, al menos una sal (por ejemplo, cloruro de sodio) y al menos un azúcar (por ejemplo, sacarosa, trehalosa y/o sorbitol), y el ADN residual de la célula hospedadora de dicha composición es de menos de 10 ng de ADN de la célula hospedadora por 1×10^7 UFP.

60 Un tampón de estabilidad líquida ejemplar puede comprender, por ejemplo, glutamato de potasio aproximadamente 20-75 mM (por ejemplo, glutamato de potasio 50 mM), histidina aproximadamente 1-20 mM (por ejemplo, histidina 10 mM), sal aproximadamente 50-250 mM (por ejemplo, cloruro de sodio 0,16 M) y azúcar aproximadamente al 5-20 % (por ejemplo, sacarosa, trehalosa y/o sorbitol al 10 %) a un pH apropiado (por ejemplo, aproximadamente cualquiera de: pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 o 7,8, especialmente aproximadamente pH 7,5). Por lo tanto, por ejemplo, un tampón de estabilidad líquida adecuado puede comprender o consistir en glutamato de potasio

65 50 mM, histidina 10 mM, cloruro de sodio 160 mM, sacarosa al 10 %, pH 7,5. En una realización, la partícula de VHS en el tampón de estabilización líquido es un VHS con replicación defectuosa, tal como VHS529.

La divulgación proporciona adicionalmente una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable de un vector vírico con envoltura, tal como vector de VHS, producido en un cultivo de células de mamífero, aislándose dicho vector vírico con envoltura mediante un método que comprende las etapas de:

- 5 a) tratar el cultivo de células hospedadoras con un agente de liberación de virus (por ejemplo, sulfato de dextrano) para liberar las partículas víricas con envoltura de las células hospedadoras, sin lisis significativa de las células hospedadoras,
- 10 b) tratar el producto del paso (a) con una endonucleasa (por ejemplo, Benzonase®) para reducir el ADN residual de la célula hospedadora;
- c) filtrar el producto de la etapa (b) para eliminar las células intactas o los restos celulares;
- d) aplicar el filtrado de la etapa (c) a una resina de cromatografía de intercambio aniónico;
- e) eluir las partículas víricas con envoltura de la columna de intercambio aniónico;
- 15 f) someter el eluyente de la etapa (e) a filtración de flujo tangencial;
- g) recuperar las partículas víricas con envoltura purificadas;
- h) concentrar las partículas víricas mediante diafiltración; y
- i) suspender las partículas víricas con envoltura purificadas en un vehículo farmacéuticamente aceptable en una concentración final de más de 1×10^7 UFP/ml.

20 En otro aspecto, la concentración final es al menos de 2×10^7 UFP/ml. La divulgación proporciona adicionalmente una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable de un vector vírico con envoltura producido en un cultivo de células de mamífero, en donde el ADN residual de célula hospedadora en dicha composición es inferior a 10 ng de ADN de célula hospedadora por 1×10^7 UFP. En un aspecto, el virus con envoltura es un VHS con replicación defectuosa, tal como VHS529, como se analiza con más detalle a continuación.

25 Las partículas víricas obtenidas mediante los métodos de purificación descritos en el presente documento conservan la infectividad después de la purificación, de modo que pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria protectora cuando se administran a un mamífero. Por lo tanto, las partículas de VHS529 purificadas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento inducen una respuesta inmunitaria protectora cuando se administran por vía subcutánea a ratones BALB/c, como se demuestra en el Ejemplo 10.

30 Los expertos en la materia conocen bien las células de mamífero hospedadoras típicas para virus con envoltura, y están fácilmente disponibles en depósitos públicos y privados. Las particularmente útiles para la producción de los virus ejemplificados en este caso para los fines de la presente divulgación incluyen el Vero, HEK293, MDK, A549, EB66, CHO y PERC.6.

35 Los virus del herpes incluyen miembros del género *Herpesviridae* incluyendo, pero sin limitación, VHS-1, HSV-2, virus de la varicela zóster, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus. Los virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) y tipo 2 (VHS-2) son miembros de la subfamilia virus *alphaherpesvirus* que provocan infecciones genitales, dérmicas y oculares prevalentes de por vida, que dan como resultado un espectro de manifestaciones clínicas que incluyen herpes labial, úlceras genitales, ceguera corneal y encefalitis. La infección por el virus del herpes simple genital es una enfermedad recurrente, de por vida, sin cura y sin vacunas disponibles. Si bien el VHS-2 es la causa más común de úlceras genitales, el VHS-1 se está convirtiendo en una causa cada vez más importante de infección con herpes genital. El VHS es un virus de ADN bicatenario, con envoltura, cuyos únicos hospedadores conocidos son los seres humanos. El VHS-1 y el VHS-2 comparten una homología de secuencia del 83 % de sus regiones codificantes de proteínas y la estructura de sus genomas es similar. Se distinguen entre sí por diferencias antigénicas en las proteínas de envoltura respectivas.

40 Un ejemplo de un virus del herpes útil en la práctica de la presente divulgación es VHS529 (anteriormente conocido como dl5-29 y ACAM529), un virus del herpes defectuoso para la replicación (cepa parental 186 syn +-1) modificado genéticamente para contener 2 deleciones genéticas: U_L5 y U_L29 , como se describe más detalladamente en Da Costa, *et al* (2000) *J. Virology* 74:7963-7971 y el documento WO 9906069. La cepa dl5-29 se reobtuvo y renombró como ACAM529 (Delagrave S, *et al.* PLoS ONE, 2012 7(10): e46714), la que también se conoce como VHS529. Por lo tanto, los términos dl5-29, ACAM529 y VHS529 se usan indistintamente a lo largo de la presente solicitud. La deleción UL5 consiste en la eliminación del gen UL5 y parte del marco de lectura abierto (ORF) de UL4 no esencial del nucleótido 12.244 al 15.143. El gen UL5 es un componente esencial del complejo vírico helicasa-primasa y es necesario para la síntesis del ADN vírico. La deleción UL29 consiste en la eliminación del gen UL29 completo, del nucleótido 58.784 al 62.527. El gen UL29 codifica la proteína ICP8 (forma siglada de *infected cell protein 8*, proteína de la célula infectada 8) de unión a ADN monocatenario vírico, que es esencial para la síntesis del ADN vírico. En conjunto, esta doble mutación da como resultado un virus que solo crece en una línea celular de complementación, las células Vero AV529-19, que contienen los genes UL29 y UL5, y que no crece en las células Vero normales.

60 La estrategia de introducir dos mutaciones reduce el potencial para la generación de virus competentes para la replicación debido a la recombinación con el gen endógeno en la línea celular de propagación o la recombinación con VHS de tipo silvestre en el hospedador. La propagación de VHS529 a gran escala se logra mediante el cultivo del virus en condiciones sin suero en su línea celular de complementación recombinante AV529-19 (obtenida de las

células Vero CCL-81.2 (mono verde africano)). El VHS529 presenta un patrón similar de expresión de proteínas en células Vero AV529-19 en comparación con el virus de tipo silvestre en las células Vero, con la excepción de que ICP8 no se expresa, y las proteínas tardías ICP5, gB e ICP25, se expresan a niveles más bajos en comparación con el virus de tipo silvestre.

5 Hay un intervalo de tiempo después de la infección de las células hospedadoras en que se puede liberar de las células una máxima cantidad de virus. El momento de la liberación varía dependiendo de la temperatura, los medios de infección utilizados, el virus que se utilizó para infectar las células, el recipiente en el que se cultivaron e infectaron las células, y de las células mismas. La identificación de este tiempo de cosecha óptimo se determina
10 fácilmente mediante el muestreo regular del cultivo celular durante el período de incubación convencional para el virus con envoltura particular para el que se va a determinar el rendimiento óptimo. En las condiciones analizadas (células Vero y VHS529), el máximo virus se liberó de las células hospedadoras entre aproximadamente 24 y 72 horas después de la infección.

15 En lugar de cosechar todo el cultivo celular y lisar las células hospedadoras, y de intentar aislar las partículas víricas recién producidas a partir del medio celular complejo, se prefiere que las partículas víricas recién formadas se aislen de la superficie de las células hospedadoras intactas. Esto se puede lograr mediante la exposición de las células hospedadoras a un agente de liberación de virus. Dicho agente de liberación de virus es cualquier agente que sea capaz de alterar la interacción entre la partícula vírica y la superficie celular. En un aspecto, el agente de liberación
20 de virus es sulfato de dextrano. En la práctica de la presente divulgación, las partículas víricas se desalojan preferentemente de la superficie celular con soluciones que contienen sulfato de dextrano, medios sin suero o solución salina tamponada con fosfato. En una realización, el agente de liberación de virus es una solución de los siguientes componentes: glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, cloruro de sodio 0,16 M, sulfato de dextrano de PM de 6-8 kDa 100 µg/ml, sacarosa al 10 %, pH 7,5) (por ejemplo, un tampón de estabilidad líquida que incluye
25 adicionalmente sulfato de dextrano). Se determinó de forma experimental que la exposición del cultivo celular a este agente de liberación de virus durante 24 horas producía los rendimientos más altos. Basándose en la experimentación, es conveniente que el cultivo se exponga al agente de liberación durante al menos 3 horas, al menos 5 horas, al menos 8 horas, o entre 20 y 24 horas.

30 Al realizar un procedimiento de filtración de profundidad antes de la cromatografía de intercambio aniónico, el tratamiento de la preparación vírica con endonucleasa antes de la filtración de profundidad mejora la eficacia del procedimiento, al minimizar el ensuciamiento de la matriz de filtración de profundidad. Como alternativa, incluso en ausencia de una etapa de filtración de profundidad, la recuperación de virus de la etapa cromatográfica disminuyó cuando se aplicó virus no tratado con endonucleasa a este y otros soportes cromatográficos.

35 Como se entiende en la técnica, filtración de profundidad se refiere al uso de un medio de filtro poroso para clarificar soluciones que contienen cantidades significativas de partículas grandes (por ejemplo, células intactas o restos celulares), en comparación con la filtración por membrana, la que se obstruiría rápidamente en tales condiciones. Está disponible en el mercado una diversidad de medios de filtración de profundidad de diferentes tamaños de poro,
40 de una diversidad de fabricantes tales como Millipore, Pall, General Electric y Sartorius. En la práctica de la divulgación como se ejemplifica en el presente documento, se utilizaron filtros de profundidad SartoScale Sartopure PP2 desechables de 0,65 µm (Sartorius Stedim, Goettingen, Alemania). El uso de este sistema no dio como resultado una pérdida apreciable del título del virus.

45 Los principios de la cromatografía de intercambio aniónico son bien conocidos en la técnica, pero, brevemente, este método se basa en las interacciones carga-carga entre las partículas a aislar y la carga de la resina utilizada. Como la mayoría de los virus tienen carga negativa a intervalos de pH fisiológicos, la columna contiene fracciones inmovilizadas con carga positiva. Generalmente, estos son grupos amino cuaternarios (resinas Q) o grupos de dietilaminoetano (resina DEAE). En la purificación de partículas grandes, tales como virus, se ha demostrado que los
50 soportes monolíticos con tamaños de poro grandes (por ejemplo, >1 micrómetro) permiten la purificación de macromoléculas tales como los virus. Los ejemplos de resinas de intercambio aniónico disponibles en el mercado útiles en la práctica de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, las resinas Mustang® Q (Pall Life Sciences) y Fractogel TMAE (Merck).

55 Tradicionalmente, las resinas de intercambio aniónico se han ofrecido y utilizado en el formato de lecho, por ejemplo Q Sepharose™, disponible de GE Healthcare Bio-Sciences AB. Por lo tanto, en un aspecto, la cromatografía de intercambio aniónico comprende una resina de cromatografía basada en lecho. Sin embargo, las limitaciones de rendimiento de los sistemas basados en lechos hacen que se precise columnas de gran volumen para capturar de forma eficaz las impurezas. En la cromatografía basada en lechos, la mayor parte del área de superficie disponible
60 para la adsorción es interna al lecho. Por consiguiente, el procedimiento de separación es inherentemente lento ya que la velocidad de transporte de masa normalmente está controlada por difusión en los poros.

En otro aspecto, la cromatografía de intercambio aniónico comprende una resina de cromatografía basada en membrana, tal como la resina Mustang® Q. Los sistemas cromatográficos basados en membrana tienen los ligandos unidos directamente a los poros de la membrana convectiva, reduciendo de este modo los efectos de la difusión
65 interna a los poros en el transporte de masa.

La filtración de flujo tangencial (FFT) (también denominada de filtración tangencial FT) es bien conocida para los expertos en la materia, y los equipos y protocolos para su implementación en una amplia gama de situaciones están disponibles en el mercado en una diversidad de fabricantes, incluidos, pero limitación, Corporación Pall, Port Washington, Nueva York y Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA. En general, la FFT implica la recirculación de la fracción retenida a través de la superficie de la membrana. Esta alimentación de flujo tangencial suave minimiza el ensuciamiento de la membrana, mantiene una alta tasa de filtración y proporciona una alta recuperación del producto. En un aspecto, la etapa de FFT puede implementarse con un sistema de lámina plana, como se ilustra en el presente documento. Los sistemas de láminas planas se prefieren generalmente en la producción a gran escala, en que tales sistemas están provistos de un medio (por ejemplo, un canal de flujo abierto) para evitar fuerzas de cizalla excesivas sobre las partículas víricas con envoltura. Como alternativa, la etapa de FFT puede implementarse con un sistema de fibra hueca, como se ilustra en el presente documento. En un aspecto, el límite de peso molecular (MWCO, forma siglada de *Molecular Weight Cut Off*, límite de peso molecular) del sistema de FFT está entre 250-50 kDa, preferentemente de alrededor de 200 kDa o 100 kDa.

Un aspecto de la presente divulgación está dirigido a un método para preparar VHS529 de alto título. Después de la propagación de VHS529 en la línea celular de complementación, es necesario purificar el virus a partir del material celular y de los componentes de los medios de cultivo celular antes de su uso posterior. La **Figura 1** representa un diagrama de flujo detallado de una realización ejemplar del método. Brevemente, a las 72 horas posinfección (hpi), el medio de infección se decanta de una o más NUNC cell factories (las NCF). Se coloca un embudo desechable estéril en el puerto de entrada de la NCF, y se vierten 600 ml de tampón de elución de sulfato de dextrano precalentado (34 °C) en la NCF. Después, la NCF se voltea a la posición con las tapas hacia arriba y se coloca en un incubador humidificado, con CO₂ al 5 % a 34 °C durante 24 h. Después de 24 h de incubación, el tampón de elución se decanta de la NCF y se clarifica por centrifugación durante 20 min a 1.000xg en una centrífuga equipada con un rotor de cestillo oscilante. El sobrenadante que contiene VHS529 se decanta y se prepara para la posterior digestión con endonucleasa Benzonase®. Si se congela previamente, el material liberado con SD se descongela rápidamente colocándolo a 37 °C. La solución se ajusta a MgCl cinco mM₂ y se añaden noventa unidades de Benzonase® por ml de solución que contiene VHS529. La solución debe incubarse en un matraz de agitación a 25 °C, 80 rpm durante 4-6 h. Antes de realizar la cromatografía, la solución tratada con Benzonase® se clarifica aún más por filtración de profundidad, para eliminar cualquier resto celular restante o material agregado que pueda obstruir la membrana cromatográfica. La separación cromatográfica se realiza mediante cromatografía de intercambio aniónico de unión y elución, preferentemente utilizando la membrana Q Mustang® fabricada por Pall Life Sciences. Se utiliza cloruro de sodio para eluir el VHS529 unido del soporte cromatográfico. Para finalizar, se realiza la concentración y formulación de VHS529, preferentemente por filtración de flujo tangencial (TFF) de fibra hueca utilizando un módulo de fibra hueca de polisulfona (PS) de 100 kDa.

En el caso de las partículas del virus del herpes, el tamaño de la partícula vírica (200-250 nm) dificulta la filtración estéril del material debido a que el uso de un filtro de esterilización convencional (0,22 µm) produce una pérdida significativa de material. Por ejemplo, después de filtrar el virus del herpes VHS529 a través de un filtro de 0,8 µm, se recuperó el 57,5 % del virus infeccioso, en contraste con solo el 25,5 % del virus infeccioso que se recuperó después de filtrar a través de un filtro de 0,45 µm. Por lo tanto, en el caso de las partículas grandes, como las partículas del virus del herpes, el procedimiento puede realizarse en condiciones estériles.

El esfuerzo hidrodinámico de cizalla desempeñó un papel en la pérdida del título de virus infeccioso. En casi todos los casos, cuando los sistemas de alto cizallamiento (FFT de lámina plana de canal cerrado y soporte cromatográfico basado en lecho) se reemplazan por operaciones de unidades de bajo cizallamiento (FFT de fibra hueca de canal abierto y soporte cromatográfico basado en membrana), se recupera más virus infeccioso por etapa del proceso de purificación. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, parece que el flujo de líquido convectivo, como en el caso de los soportes cromatográficos de membrana (Q Mustang®) y monolíticos (CIM), minimiza el cizallamiento al eliminar los vórtices de flujo y los remolinos turbulentos, que se producen en el espacio vacío en columnas de lecho empaquetado tradicionales.

El cizallamiento no explica por completo la recuperación, como queda claro por la diferencia en el rendimiento de virus infeccioso con la membrana frente a los monolitos probados en este caso.

Además de la optimización de la cromatografía, el cambio de procedimiento más significativo fue de FFT de lámina plana y canal cerrado a FFT de fibra hueca. Esto dio como resultado un aumento de hasta 10 veces en el rendimiento sin comprometer la pureza. Los resultados del ensayo de placas muestran que la optimización de las etapas de purificación da como resultado aumentos adicionales en el rendimiento sin comprometer la pureza en el caso del intercambiador de aniones Q Mustang®. En contraste, el material purificado por Fractogel TMAE HiCap (un intercambiador de aniones fuertes a base de lecho) parece menos atractivo, ya que el material final contiene aproximadamente 2 veces más ADN residual y al menos 2 órdenes de magnitud más de sulfato de dextrano. No obstante, Fractogel TMAE HiCap aún podría considerarse como una resina de cromatografía candidata, debido a que las condiciones de elución de la cromatografía podrían optimizarse para mejorar la pureza.

Por lo tanto, los datos informados en la presente solicitud respaldan el uso de procedimientos de purificación

basados en cromatografía para la preparación de VHS529, así como otras vacunas víricas elaboradas con microbios vivos atenuados o con virus defectuosos para la replicación, adecuados para pruebas en seres humanos.

5 Las partículas del virus del herpes purificadas de acuerdo con la presente divulgación (por ejemplo, partículas víricas con envoltura contenidas dentro de un tampón de estabilidad en líquido) pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Las composiciones de la divulgación pueden formularse para la administración a un sujeto mamífero, preferentemente, un ser humano, usando técnicas conocidas en la técnica. En particular, los sistemas de suministro pueden formularse para dispositivos inyectables de tipo depósito intramusculares, intradérmicos, mucosos, subcutáneos, intravenosos o para administración tópica.

10 Cuando el sistema de suministro se formula como una solución o suspensión, el sistema de suministro está en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,8 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas, o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración.

15

Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

20

En particular, tales preparaciones farmacéuticas pueden administrarse a sujetos mamíferos para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto mamífero. La intensidad de tal respuesta inmunitaria puede modularse mediante la dosificación para que varíe desde una respuesta mínima para aplicaciones de diagnóstico (por ejemplo, pruebas cutáneas para alergias) hasta una respuesta inmunitaria protectora duradera (inmunización) frente a la exposición.

25

Para potenciar la respuesta inmunitaria frente a la partícula vírica, tales preparaciones farmacéuticas pueden incluir, opcionalmente, adyuvantes. Los ejemplos de adyuvantes incluyen sales de aluminio (por ejemplo, sulfato de aluminio y potasio, alumbre, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, hidróxido de aluminio), 3D-MPL, emulsiones de aceite en agua que incluyen, pero limitación, a AS03, AF03, AF04, MF-59 y QS21.

30

Ejemplos

Los siguientes ejemplos deben considerarse ilustrativos y no limitantes del alcance de la divulgación descrita anteriormente. La siguiente Tabla 1 proporciona un resumen de los reactivos y materiales utilizados en los siguientes ejemplos.

35

Tabla 1. Fuentes de reactivos/materiales			
Componente/Kit	Proveedor	N.º de catálogo	N.º de lote
Glutamato de potasio	Sigma	G1501	125K0170
Histidina	Sigma	H6034	056K0002
Cloruro de sodio	Sigma	H7653	098K0098
Sacarosa multicompendial	J.T. Baker	4005-06	E44627
Cloruro de magnesio 1 M	G Biosciences	R004	072702
Sulfato de dextrano	Polydex	N/D	DS8-018R
Endonucleasa Benzonase®	EMD/Merck	1.01697.0002	K38806697
Kit de ELISA para Benzonase®	EMD/Merck	1.01681.0002	K92932881
Kit de ELISA de HCP para Vero	Cygnus Tech.	F500	8098
Kit de ELISA de sulfato de dextrano	Lifespan Tech.	K-3800	6011
Aparato de filtro de 0.22 µm de 1 l	Nalgene	73520-986 (VWR)	nd
Botella de PETG de 2 l	Nalge/NUNC	16159-138 (VWR)	nd
Botella de PETG de 1 l	Nalge/NUNC	16159-136 (VWR)	nd
Botella de PETG de 500 ml	Nalge/NUNC	16159-134 (VWR)	nd
Botella de PETG de 250 ml	Nalge/NUNC	16159-132 (VWR)	nd
Botella de PETG de 125 ml	Nalge/NUNC	16159-130 (VWR)	nd
Tubos Eppendorf de 1,5 ml	VWR	20170-038	nd
Tubos Eppendorf de 250 ml	Corning	430776	nd
Tubo de silicona MasterFlex (24)	Cole-Parmer	96410-24	nd
Tubo de silicona MasterFlex (25)	Cole-Parmer	96410-25	nd
Moneda Mustang® Q de 0,35 ml	Pall Life Sciences	MSTG18Q16	nd
Cápsula Mustang® Q de 10 ml	Pall Life Sciences	CLM05MSTGQP1	IL6954
SartoScale, SartoPure PP2	Sartorius Stedim	5595305PS-FF	080620

(continuación)

Tabla 1. Fuentes de reactivos/materiales			
Componente/Kit	Proveedor	N.º de catálogo	N.º de lote
Módulo MidiKros (100 kDa, PS)	Spectrum Labs	X2AB-200-02P	3241559

Soluciones tamponadoras madre:

5 Tampón de elución de sulfato de dextrano (glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, cloruro de sodio 0,16 M, sulfato de dextrano de PM de 6-8 kDa 100 µg/ml, sacarosa al 10 %, pH 7,5)

10 Tampón de estabilidad/Tampón de equilibrado de columna (glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, cloruro de sodio 0,16 M, sacarosa al 10 %, pH 7,0)

Tampón de elución de cromatografía de la etapa 1 (glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, cloruro de sodio 0,7 M, sacarosa al 10 %, pH 7,0)

15 Tampón de elución de cromatografía de la etapa 2 (glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, cloruro de sodio 2 M, sacarosa al 10 %, pH 7,0)

cloruro de sodio 1 M

20 cloruro de magnesio 1 M

El siguiente procedimiento es ilustrativo de la práctica de la presente divulgación, en relación con la purificación del virus del herpes recombinante VHS529. El procedimiento se llevó a cabo en cinco etapas:

- 25 1. liberación de VHS529 de las células infectadas con sulfato de dextrano,
2. digestión del ADN residual con endonucleasa Benzonase®,
3. clarificado por filtración de profundidad (es decir, filtración para eliminar las células intactas o los restos celulares),
4. purificación de unión y elución por cromatografía de intercambio aniónico y
- 30 5. intercambio/concentración de tampón por ultrafiltración/diafiltración de flujo tangencial (UF/DF).

Cada una de estas etapas se describe con más detalle a continuación.

Ejemplo 1. Células, semilla de virus maestra y procedimiento aguas arriba

35 La producción de VHS529 se logró mediante la infección de una monocapa de células Vero de complementación (línea celular AV529-19). Las células de complementación se obtuvieron de la siguiente manera: la línea celular de la ATCC de mono verde africano (Vero) CCL-81.2 se transfectó de forma estable con los plásmidos pCId.UL5, pcDNA.UL29 y pSV2neo, que fueron proporcionados por el Dr. David Knipe (Harvard Medical School). Se exploraron las poblaciones de células y se seleccionó el clon AV529-19 por su capacidad para complementar mejor a dl5-29 (como se conocía previamente a ACAM529 en la bibliografía). La línea celular se cultivó y mantuvo en OptiPro (Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con glutamina 4 mM (Hyclone, Logan, UT) y SFB al 10 % (Life Technologies) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las condiciones de cultivo celular con el fin de infección y producción de ACAM529 se describirán a continuación. La semilla del virus premaestro (preMVS) utilizada para producir la semilla del virus maestro ACAM529 (MVS) se preparó en varias etapas a partir de una reserva original de dl5-29, de la siguiente manera: el virus dl5-29 se propagó usando células Vero de complementación, el ADN genómico vírico se extrajo del virus resultante y se proporcionó por el Dr. David Knipe (Harvard Medical School) para la transfección en células AV529-19, y el virus resultante se amplificó mediante un solo pasaje. El ADN genómico vírico se extrajo de este pasaje amplificado y se transfectó en células AV529-19 en condiciones de GLP. El virus resultante se cosechó, amplificó mediante un pasaje, se purificó por placas cuatro veces, se amplificó por pases y se almacenó como el pre-MVS. La semilla de virus maestro (MVS) de ACAM529 se preparó y se almacenó con GMP utilizando el pre-MVS y el AV529-19.

El desarrollo se llevó a cabo para determinar el crecimiento aguas arriba y las condiciones de infección. Los experimentos se realizaron primero a pequeña escala (placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos y matraz T125) y finalmente se aumentaron de escala hasta la producción en NUNC cell factories (NCF) con un volumen de trabajo de 2 l y 6.320 cm² de área de cultivo celular. Para una mayor claridad, las condiciones de cultivo aguas arriba se presentan a escala de NCF. Se sembró una única NCF con 3,8 x 10⁸ células AV529-19 sin suero en medio OptiPro complementado con GlutaMAX 4 mM (Life Technologies) y G418 500 µg/ml (Life Technologies). Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %, con un solo cambio de medio a las 48 h a 1,3 l de OptiPro diluido al 40 % en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y complementado con concentrado lipídico de colesterol 0,5x (Life Technologies) y sacarosa 50 mM. Las células se cultivaron hasta la confluencia por incubación durante 48 h adicionales como anteriormente. A las 96 h después de la siembra, el medio se decantó y se reemplazó por 1,3 l de medio de infección (OptiPro al 40 % en DPBS con colesterol 0,5x, sacarosa

50 mM) e inóculo de vacuna a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. La infección se permitió avanzar a 34 °C durante 72 h (+/-4 h). Se optimizaron tanto la MOI como el tiempo de cosecha para garantizar la producción máxima de VHS529.

5 **Ejemplo 2. Esquema de purificación basado en ultracentrifugación**

Antes del desarrollo de la purificación divulgada en el presente documento, el método convencional para purificar VHS implicaba ultracentrifugación. En el caso en el que se utilizó ruptura mecánica de la célula para liberar VHS529 a partir de la biomasa, las células infectadas se desprendieron del sustrato por ruptura manual de la monocapa a las 72 horas postinfección (hpi). Se vertieron células de la NCF y se preparó un sedimento celular por centrifugación a 1.000 x g. Se determinó que en este punto del procedimiento es posible congelar el sedimento celular que contiene VHS529 a -80 °C sin una pérdida apreciable en el título, para almacenamiento antes del procesamiento. El sedimento celular de una única NCF se llevó a 1 l con tampón de estabilización (glutamato de potasio 50 mM, L-Histidina 10 mM, NaCl 160 mM, sacarosa al 10 %, pH 7,0). La suspensión celular se procesó usando un microfluidificador (Microfluidics Corporation, Newton, MA) a 20,69 MPa (3.000 psi), en hielo, para romper mecánicamente las células y cortar el ADN genómico celular. La solución se ajustó a 5 mM y se añadieron 15.000 unidades de endonucleasa Benzonase® (EMD/Merck, Darmstadt, Alemania) a la solución que contenía VHS529. La reacción con Benzonase® se dejó proceder a 25 °C durante 4 h. Después, el lisado celular se aclaró por centrifugación a 5.000 x g durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, el lisado celular aclarado se concentró mediante FFT de lámina plana en un sistema de microfiltración Pellicon® XL50 (Millipore, Bedford, MA). Se montaron tres casetes Pellicon® XL50 (Biomax, 30 kDa, Polietersulfona, 50 cm²) en un Sistema FFT Labscale™ (Millipore) usando el accesorio de múltiples colectores. El volumen de la solución se redujo de ~ 1100 ml a ~ 50 ml. A lo largo de la filtración, la presión de entrada se mantuvo a 0,207 MPa (30 psi), mientras que la presión retrógrada se aumentó de 6,895 a 55,158 KPa (1 a 8 psi) según fuera necesario para lograr un flujo práctico. Para finalizar, la fracción retenida de la FFT se sometió a ultracentrifugación durante 4 h a 50.000 x g y 4 °C sobre un colchón de sacarosa al 25 %, preparado en DPBS con CaCl₂ y MgCl₂. El sedimento que contenía el VHS529 finalmente se resuspendió en tampón de estabilización con sacarosa al 20 % antes de alicuotarlo, congelarlo instantáneamente en hielo seco/etanol y almacenarlo a -80 °C. El VHS529 preparado por este método convencional basado en centrifugación da como resultado material en bruto con más de 2 µg de ADN residual de célula hospedadora por 1x10⁷ UFP de VHS529.

Ejemplo 3. Sulfato de dextrano

Cuando se usó la ruptura celular mecánica (tratamiento con ultrasonidos) antes de la separación cromatográfica, el virus resultante tenía un alto contenido de ADNbc, 0,33 o 2,0 µg/ml por ensayo de ADNbc, para muestras que fueron o no tratadas con Benzonase®, respectivamente), y la recuperación del virus fue mala (12 % de recuperación para las muestras tratadas con Benzonase® y 39 % para las que no habían sido tratadas con Benzonase®) (véase la Tabla 2 a continuación). Basándose en estos resultados, se probó un medio no mecánico para cosechar el virus a partir de las células de producción. En última instancia, se seleccionó el sulfato de dextrano como la mejor opción para cosechar virus de las células de producción. Las pruebas con sulfato de dextrano se realizaron primero a pequeña escala, en placas de 12 pocillos, seguido de un aumento de escala hasta NUNC Cell Factories (NFC).

Placas de 12 pocillos

En las pruebas a pequeña escala, cuando las células presentaron ~ 100 % de efecto citopático (ECP), caracterizado por el redondeo de las células, pero permanecían unido (72 hpi), se cosechó el VHS529 mediante tratamiento con sulfato de dextrano. El desarrollo inicial del procedimiento de cosecha de virus VHS529 (elución con sulfato de dextrano (SD)) se realizó en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos. Los parámetros que se probaron y/u optimizaron incluyen: tampón (medio de cultivo acondicionado, citrato y glutamato+histidina), pH (6,5-7,5), Concentración de SD (0-500 µg/ml), peso molecular del sulfato de dextrano (5-5.000 kDa), grado de sulfatación (sulfato de dextrano frente a heparina) (34 y 37 °C), osmolaridad (sacarosa al 0-30%), agitación (+/-), tiempo (3, 5, 8 y 24 h) y tiempo (2-3 días postinfección (dpi)) de liberación.

Para fines de exploración, el medio de infección se decantó de las células AV529-19 en placas de 12 pocillos en el día 2 o el día 3 después de la infección. El medio se reemplazó por 600 µl de tampón de elución de sulfato de dextrano: tampón de estabilización a pH 7,5 que contenía sulfato de dextrano 0, 25, 50, 100, 200 o 500 µg/ml (MW ~ 5 kDa) (Polydex Pharmaceuticals, Toronto, Canadá). Las placas se incubaron a 34 °C durante 3, 5, 8 o 24 h antes de la cosecha. El VHS529 liberado con sulfato de dextrano se preparó para pruebas de potencia mediante centrifugación a 1.000 x g para eliminar células y restos celulares.

La Figura 2 muestra el resultado de un único experimento de exploración representativo para abordar si VHS529 podría eluirse de la superficie de las células AV529-19 utilizando sulfato de dextrano (SD). De hecho, cuando las células a los 3 dpi se incubaron con SD, cuando se usó ≥ 25 µg/ml de SD se pudo detectar material infeccioso en el sobrenadante después de 24 h de incubación (**Figura 2B**). Para estudios adicionales se seleccionó una concentración de SD 100 µg/ml.

NUNC Cell Factories

En las pruebas a mayor escala, a las 72 horas posinfección (hpi), el medio de infección se decantó de una NCF en un recipiente (botella de PETG de 2 l) para la desinfección y eliminación, y se conservó una pequeña alícuota para la prueba de potencia. Se colocó un embudo desechable estéril en el puerto de entrada de la NCF y se vertieron 600 ml de tampón de elución de sulfato de dextrano (glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, cloruro de sodio 0,16 M, sulfato de dextrano 100 µg/ml PM 6-8 kDa, sacarosa al 10 %, pH 7,5) precalentado (34 °C) en la NCF. La NCF se colocó de lado por un corto tiempo, para que el tampón de elución se distribuya uniformemente entre las capas. La NCF se volteó a la posición hacia arriba y se coloca en un incubador humidificado, con CO₂ al 5 % a 34 °C durante 24 h. Después de 24 h de incubación, el tampón de elución se decantó de la NCF en una botella PETG de 1 l. Después, el líquido se distribuyó de forma uniforme en tubos de centrifuga de fondo cónico de 250 ml y se realizó la centrifugación durante 20 min a 1.000xg en una centrifuga equipada con un rotor de cestillo oscilante. El sobrenadante se decantó y se colocó en una nueva botella de PETL de 1 l para la posterior digestión con endonucleasa Benzonase®. En este punto del procedimiento, es posible congelar rápidamente (en nitrógeno líquido) el material para almacenarlo a -80 °C hasta su procesamiento futuro. La congelación se realizó sin agitación.

El procedimiento optimizado para la liberación a gran escala (NCF) de VHS529 a partir de células AV529-19 fue el siguiente: a los 3 dpi, el medio de infección se decantó; se colocó un embudo desechable estéril en el puerto de entrada de la NCF y se vertieron 600 ml de tampón de elución de sulfato de dextrano (tampón de estabilización a pH 7,5 que contenía, SD 100 µg/ml con PM de ~ 5 kDa) recalentado (34 °C) en la NCF. La NCF se incubó 24 h en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% de a 34 °C sin agitación. Después de 24 h de incubación, el tampón de elución se decantó de la NCF y se clarificó mediante centrifugación durante 20 min a 1000 x g. Se determinó que en este punto del procedimiento es posible congelar líquido de cosecha que contiene VHS529 a -80 °C sin una pérdida de título.

25 **Ejemplo 4. Digestión con endonucleasa**

Si se congela previamente, el material liberado con sulfato de dextrano (SD) procedente de un NCF se retiró del congelador a -80 °C y se descongeló rápidamente colocándolo en un baño de agua a 37 °C. Se realizó una agitación suave por inversión a intervalos de ~10 min para asegurar que la muestra no se sobrecalentara mientras se fundía. Se midió el volumen del material y la solución se ajustó a 5 mM usando una solución madre 1 M. Se añadieron noventa unidades de Benzonase® por ml de solución que contenía VHS529. La solución se mezcló suavemente por inversión y se colocó en la incubadora a 25 C, 80 rpm, durante 4-6 h.

El tratamiento del VHS529 con endonucleasa Benzonase® aumenta sustancialmente la pureza del virus infeccioso después de la cromatografía con Q Mustang®, como se observó mediante electroforesis en gel de agarosa de virus purificado con o sin tratamiento con Benzonase® (datos no mostrados). La conveniencia de una etapa de digestión con endonucleasa Benzonase® se confirmó a pequeña escala (aproximadamente 20 ml). Nueve (9) matraces T225 de células AV529-19 infectadas se liberaron por incubación con sulfato de dextrano 100 µg/ml (1926:04). El material liberado se clarificó por centrifugación a 2.000xg y el sobrenadante de 193 ml se dividió en alícuotas de 2x 96,5 ml. Se filtraron inmediatamente 1x 96,5 ml usando unidades con filtro de jeringa de 25 mm con membrana Supor de baja unión a proteínas (se usaron un total de siete filtros debido al ensuciamiento frecuente de la membrana). Después, la muestra no tratada de 87,5 ml se aplicó a una membrana cromatográfica de Mustang® (moneda) de pequeña escala de 0,35 ml y se eluyó con un gradiente de NaCl 160 mM-2 M en tampón de estabilidad, con etapas de retención manual para permitir la elución del material que contenía las proteínas. La otra alícuota se llevó a 5 mM y 90 U/ml de Benzonase®. La solución se incubó durante 4 h a temperatura ambiente (no controlada, sobre la poyata) y después se mantuvo durante la noche a 4 °C. Justo antes de la cromatografía con Q Mustang®, la muestra tratada con benzonase se filtró como anteriormente, se aplicaron 93,5 ml de muestra a la moneda de Q Mustang® y la elución se realizó como se describió anteriormente (1926: 5-7). Las fracciones de elución individuales se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5 %), SDS-PAGE (Tris-Glicina al 4-20 %) y ensayo de placas.

A pequeña escala, la filtración por punto muerto de material que no se había tratado con Benzonase® dio como resultado una recuperación de ~ 50 % del título infeccioso, mientras que la filtración de material después del tratamiento con Benzonase® dio como resultado un rendimiento por etapas mucho mejor (~ 100 %). En contraste, se recuperó más material no tratado con Benzonase® por cromatografía de Q Mustang® que tratado con Benzonase®; ~ 95 % en comparación con ~ 75 %, como se muestra a continuación en la Tabla 2. El rendimiento general para cada procedimiento fue similar, pero se mantuvieron las pérdidas en distintos puntos a lo largo de la serie de purificación aguas abajo. Sobre la base de estas observaciones, la clarificación del grueso del material liberado con sulfato de dextrano por filtración de profundidad o por punto muerto debe realizarse *después* del tratamiento con endonucleasa, para evitar el ensuciamiento del filtro y la pérdida de título. Adicionalmente, el tratamiento con Benzonase® debe realizarse para garantizar que el material purificado final tenga un bajo nivel de ADN contaminante.

65 **Ejemplo 5. Filtración de profundidad**

Antes de realizar la cromatografía, la solución tratada con Benzonase® se clarifica adicionalmente para eliminar cualquier célula intacta o resto celular restante, u otro material agregado que pueda obstruir la membrana

5 cromatográfica. El colector de la filtración de profundidad se ensambló como se esquematiza a continuación, utilizando accesorios de brida estériles de ¼" ("tri-clover" a racor de manguera) (con las juntas y abrazaderas "tri-clover" necesarias), así como tubos de silicona MasterFlex de tamaño 24. Se autoclavó el colector completo, excluyendo bomba, durante 25 min a 121 °C en seco, según lo recomendado por el fabricante. La muestra tratada con Benzonase® se pasó a través del filtro de profundidad autoclavado a 50 ml/min, sin pretratamiento o preequilibrado de la membrana. La membrana se ventiló hasta que se observó líquido saliendo de la abertura. El material filtrado en profundidad se recogió en una botella de PETG estéril de 1 l y se reservó a 4 °C durante una noche antes de la separación cromatográfica de los contaminantes.

10 **Ejemplo 6. Cromatografía de intercambio aniónico**

15 A escala de la NCF, la ruta de flujo de la cromatografía se ensambló con un tubo MasterFlex de silicona de tamaño 25 (Cole Parmer) y accesorios de brida estériles de 1 ½" ("tri-clover" a racor de manguera) con juntas y abrazaderas "tri-clover" asociadas. La ruta de flujo, incluyendo la membrana cromatográfica, se preparó y se esterilizó químicamente según las instrucciones del fabricante. Brevemente, la membrana (cápsula de Q Mustang® de 10 ml, Pall Corporation, Port Washington, NY) se humedeció con agua desionizada por ósmosis inversa (RODI, forma siglada de *reverse osmosis deionized*) esterilizada por filtro mientras se ventilaba. Posteriormente, la membrana se esterilizó y preacondicionó a 100-200 ml/min con 500 ml de NaOH 0,5 M y 500 ml de NaCl 1 M, respectivamente. El tampón de corrida de la cromatografía se compuso de tampón de estabilización a pH 7,0 con la concentración de cloruro de sodio descrita para cada etapa. La membrana se equilibró con tampón de equilibrado de columna con bajo contenido de sal (NaCl 0,16 M), hasta que el pH y la conductividad de la corriente de salida coincidan con los del tampón original (~ 1,5 l de tampón). Todas las etapas de cromatografía posteriores se realizaron a 60 ml/min. Inicialmente, la muestra que contenía el VHS529 se cargó en la membrana y se recogió una fracción de flujo continuo, después se lavó la membrana con tampón de equilibrado hasta que el trazado de UV (280 nm) volvió a la línea basal y se realizó una elución salina en dos etapas. La preelución de impurezas se realizó con tampón que contenía NaCl 0,7 M. La fracción pura, infecciosa, que contenía el VHS529 se eluyó de la membrana con un tampón que contenía NaCl 2 M. Originalmente, el virus infeccioso se eluyó de la membrana en dos etapas (NaCl 1,4 y 2 M). El análisis posterior reveló que las dos etapas tenían una pureza comparable, y se eligió la concentración de sal más alta (NaCl 2 M) para eluir VHS529 en una sola etapa de título más alto. Todas las fracciones se recogieron de forma manual mientras se observaba la absorbancia a 280 nm en un registrador gráfico. Se utilizó un monitor de presión digital en línea para asegurar que la presión permaneciera por debajo de 0,648 MPa (94 psig) (presión máxima de operación).

35 La determinación del soporte cromatográfico óptimo para la cromatografía de unión y elución se realizó en una serie de experimentos de exploración a pequeña escala, con la intención principal de lograr el máximo rendimiento de virus infecciosos en la fracción eluida. La Tabla 2 muestra a continuación un listado no exhaustivo de rendimientos de tales experimentos de exploración.

TABLA 2

40 *Rendimiento de virus de la etapa (UFP) a partir de la exploración a pequeña escala de las condiciones de purificación de intercambio aniónico (método de cosecha, resinas de cromatografía, etc.)*

Cosecha	Resina	Benzonase®	Rendimiento de la etapa
Microfluidificación	DEAE CIM®	-	5 %
	Q CIM®	-	2 %
Tratamiento con ultrasonidos	Q Capto™	-	31 %
	Q Capto™	+	12 %
	HiTrap™ DEAE FF	-	10 %
	Q Mustang®	-	39 %
	Q Mustang®	+	12 %
Sulfato de dextrano	Q Mustang®	-	95 %
	Q Mustang®	+	75 %
	Fractoge®1 DEAE	+	61 %
	TMAE Fractogel®	+	59 %
	Fractogel® TMAE HiCap	+	67 %
	DEAE CIM®	+	15 %
	Q CIM®	+	6 %
	EDA CIM®	+	6 %
	Q UNOsphere™	+	22 %
	Q Capto™	+	65 %
Q GigaCap®	+	44 %	

45 Los rendimientos globales (presentado como el número de dosis para ser humano (1×10^7 UFP) por NCF) para purificaciones de VHS529 a partir de experimentos de optimización (preparaciones marcadas A-G) se presentan en la Figura 4. El rendimiento global aumentó a medida que se optimizó la cromatografía y otras condiciones de

purificación. El reemplazo del intercambiador aniónico basado en membrana Q Mustang® por una resina en tentáculos basada en lecho (Fractogel TMAE HiCap, EMD Merck) dio como resultado un aumento no significativo del rendimiento y una pureza más baja (compárense las preparaciones de VHS529 F y G en la **Figura 5B-D**).

- 5 Las modificaciones adicionales probadas en los estudios a pequeña escala presentados en el presente documento incluyen el uso de filtración por punto muerto (0,8 µm, 25 mm, membrana supor, filtro de jeringa (Pall Corporation)) como sustituto de la filtración de profundidad y diálisis en casetes slide-a-lyzer® (Thermo-Fisher Scientific (Pierce Protein Research Products), Rockford, IL) MWCO 10-20 kDa para intercambio del tampón en lugar de la FFT.
- 10 Si bien se intentó una amplia diversidad de enfoques alternativos, finalmente se utilizó para la purificación la liberación por sulfato de dextrano, Q Mustang® y FFT por fibra hueca TFF. Los ejemplos de productos químicos y de resinas de cromatografía que se consideraron inadecuadas por razones de rendimiento o pureza después de la evaluación a pequeña escala (20-50 ml) son los siguientes: Heparina HP HiTrap™ (GE Healthcare), Sulfato de Cellufine® (CHISSO Corporation, Tokio, Japón), Q HiTrap™ Capto™ (GE Healthcare), Q GigaCap® (TOSOH, Yamaguchi, Japón), Q UNOsphere™ (Bio-Rad, Hercules, CA), Fractogel® [DEAE, TMAE y TMAE HiCap] (EMD/Merck), CIM® [Q, DEAE, EDA y SO₃] (BIASeparaciones, Villach, Austria), etc.

20 Dado que el rendimiento máximo se obtuvo con la membrana de Q Mustang®, se eligió esta para aumentar la escala hasta la purificación de material a partir de una sola NCF. La **figura 3** muestra el perfil cromatográfico para la elución de VHS529 (cosechado con SD, tratado con Benzonase® y filtrado por punto muerto) antes de cargarlo en la moneda Q Mustang® (0,35 ml) en un ÄKTA Explorer (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El caudal fue de 3 ml/min y la elución por etapas se realizó automáticamente en 30 volúmenes de columna (VC). La fracción que contiene VHS529 se eluye del soporte a B al 100 % o NaCl 2 M, según se marca.

25 **Ejemplo 7. Concentración y filtración**

Como se indica anteriormente, La Figura 4 muestra los resultados de una serie de experimentos de optimización a pequeña escala en los que se modificaron diversos parámetros de purificación para observar el efecto sobre el rendimiento de VHS529. Los cambios importantes que impactaron de forma positiva en el rendimiento se destacan mediante recuadros e incluyen el cambio de un sistema de FFT de lámina plana a un sistema de FFT de fibra hueca. El rendimiento se duplicó de forma eficaz cambiando de FFT de lámina plana por el sistema Pellicon XL a FFT de fibra hueca con el sistema Kros-Flo (**Figura 4**, recuadros horizontales). Se cree que el aumento del rendimiento se debe a una menor fuerza de cizalla generada por el flujo de canal abierto en comparación con el sistema de lámina plana, en que actúa una pantalla generadora de turbulencia en la ruta del flujo para maximizar el flujo al minimizar la formación de una capa de gel. El módulo de FFT de fibra hueca que se utilizó en los experimentos presentados en este caso tenía un MWCO de 100 kDa, también se probó un casete de MWCO de 500 kDa pero el rendimiento fue consistentemente más bajo que lo que se describe en este caso (datos no mostrados). En la escala de NCF, la fracción de elución de NaCl 2 M se concentró (5-10 veces en volumen) y se intercambió el tampón a la formulación final por diafiltración contra 3-5x el volumen del tampón de estabilización que contenía sacarosa al 20 %. Esto se realizó mediante filtración de flujo tangencial de fibra hueca (MWCO de 100 kDa, 85 cm²,

módulo de FFT de fibra hueca de polisulfona, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) en un sistema Kros-Flo® Research II, aunque en los experimentos de optimización iniciales (preparaciones marcadas A-D para los fines de este informe) se realizó FFT de lámina plana como se describe anteriormente. Para minimizar el cizallamiento, se utilizó el caudal más bajo sugerido (130 ml/min, lo que equivale a una velocidad de cizalla de 4.000 s⁻¹). La presión transmembrana (PTM) se mantuvo por debajo de 27,58 KPa (4 psi) durante todo el procedimiento de diafiltración para minimizar la formación de una capa de gel, lo que podría impedir el flujo de los fluidos. Como anteriormente, el material final que contenía el VHS529 se alicuotó, se congeló instantáneamente en hielo seco/etanol y almacenó a -80 °C. Debido al gran tamaño de la partícula del virus VHS-2 (180-200 nm), no es posible la filtración estéril del material final. Por este motivo, todas las manipulaciones deben realizarse en condiciones asépticas.

50 **Ejemplo 8. Titulación del VHS529**

La infectividad del VHS529 se evaluó mediante la titulación de muestras en la línea celular de complementación. Un día antes de la inoculación se sembraron placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos con 4 x 10⁵ células por pocillo. Las muestras se diluyeron en serie, se sembraron en placas y se incubaron 1 h, a 37 °C, en CO₂ al 5 %, con balanceo suave cada 15 min. Se añadió un ml de medio de recubrimiento de metilcelulosa (en DMEM complementado con L-glutamina, SFB inactivado por calor y antibióticos) a cada pocillo y las placas se incubaron 48 h. Las placas se visualizaron mediante tinción con cristal violeta al 1 % en metanol al 70 %. Después del recuento manual de las placas, los títulos se representaron como unidades formadoras de placa (UFP)/ml.

65 **Ejemplo 9. Ensayos de pureza de VHS529 (ELISA, qPCR y ADNbc por PicoGreen)**

Se utilizó un ELISA disponible en el mercado para determinar la pureza de los retenidos del procedimiento, así como del VHS529 purificado. Se utilizó ELISA frente a Benzonase® (EMD/Merck), a proteínas de célula hospedadora para Vero (HCP, forma siglada de *Vero Host Cell Protein*) (Cygnus Technologies, Southport, NC) y a sulfato de dextrano

(Lifespan Technologies, Salt Lake City, UT). Los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante, excepto que se usaron los siguientes diluyentes en la preparación de la muestra cuando no se especificaba el diluyente: ELISA de HCP para Vero (Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, seroalbúmina bovina 8 mg/ml, pH 7,0) y ELISA para SD (solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS), pH 7,4). Los límites de detección (LOD) específicos del ensayo son 0,1 ng/ml (Benzonase®), 2 ng/ml (HCP Vero) y 0,003 µg/ml (SD).

La prueba de ADN residual de Vero de las muestras de VHS529 se contrataron a WuXI AppTec, Inc. (Filadelfia, PA), muestra por muestra. Brevemente, el ensayo es un ensayo con GLP (forma siglada de *Good Laboratory Practice*, prácticas correctas de laboratorio)/GMP basado en PCR cuantitativa (qPCR) que utiliza la tecnología ABI Fast 7500 Taqman®. Los resultados se proporcionaron en forma de un informe final, que indicaba la cantidad de ADN residual de Vero para tres amplicones anidados de ARN ribosómico de 102, 401 y 765 pares de bases (pb). Para los fines del estudio, el ensayo se realizó a nivel de investigación (no GMP). Los datos que representan el amplicón de 102 pb se presentan en la sección de resultados de este informe. El límite de cuantificación (LOQ) para este ensayo es ≤ 1 pg/µl. Se analizaron algunas muestras en cuanto al contenido de ADNbc utilizando el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT™ PicoGreen (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

El material purificado con Q Mustang® (VHS529 preparación F) contenía menos ADN residual de Vero (**Figura 5B**), sulfato de dextrano (**Figura 5C**) y las HCP de Vero (**Figura 5D**) que el material purificado por Fractogel TMAE HiCap (VHS529 preparación G). Para ver más específicamente los beneficios del uso de cada paso en la serie de purificación, las Tablas 3 y 4 a continuación destacan los resultados de rendimiento y pureza para cada etapa de la purificación de la preparación A de VHS529.

TABLA 3

Retenido	Rendimiento (%)	ADN (ng/dosis)	HCP para (µg/ml)	Benzonase® (ng/ml)	SD (µg/ml)
Inicio	45	a	75	< LOD	28
Benzonase®	85	a	127	52	27
Filtro de profundidad	108	nd	104	51	11,25
Q Mustang® FP	0	nd	91	47	< LOD
Q Mustang® lavado	0	nd	7	4	< LOD
Q Mustang® Etapa	0,1	nd	9	< LOD	< LOD
Mustang® Q Etapa 2	31	< 10	6	< LOD	< LOD
Mustang® Q Etapa 3	29	< 10	3	< LOD	< LOD
Permeado de FFT	0	nd	0	< LOD	< LOD
fracción retenida de FFT	38	9,74	30	< LOD	< LOD

^a Los inventores no pudieron determinar la cantidad de ADN de Vero en el material de partida, dado que incluso a altas diluciones hubo una interferencia del 100 % de la señal de qPCR por la muestra (sulfato de dextrano y/o Benzonase®).

25

TABLA 4

Retenido	HCP para HCP			Factor de purificación
	(µg/ml)	(mg totales)	(UFP/mg)	
Inicio	75	75	1,5 x 10 ⁵	1x
Benzonase®	127	75	1,2 x 10 ⁵	1x
Filtro de profundidad	104	60	1,7 x 10 ⁵	1x
Q Mustang® FP	91	53	0	-
Q Mustang® lavado	7	3	0	-
Mustang® Q Etapa 1	9	1	3,4 x 10 ⁴	-
Mustang® Q Etapa 2	6	1	9,2 x 10 ⁶	60x
Mustang® Q Etapa 3	3	0,3	3,1 x 10 ⁷	200x
Permeado de FFT	< LOD	-	-	-
fracción retenida de FFT	30	0,5	3,7 x 10 ⁷	250x

30

35

Como se menciona anteriormente, se realizaron mejoras en el rendimiento (Figura 4) cambiando de FFT de lámina plana a fibra hueca. La filtración de profundidad parece eliminar parcialmente el sulfato de dextrano de la corriente de alimentación, el resto se elimina durante la cromatografía (**Tabla 3**, columna 6). Además, como se esperaba, la Benzonase® se eliminó durante la cromatografía ya que no se une a los intercambiadores de aniones a pH neutro (**Tabla 3**, columna 5). Aunque los inventores no pudieron determinar la cantidad de ADN de Vero en el material de partida debido a una interferencia del 100 % de la señal qPCR por parte de la muestra (medida mediante un control de ADN añadido de *E. coli* interno), pudieron demostrar que después del tratamiento con Benzonase®, la filtración de profundidad y la cromatografía, la cantidad de ADN de Vero en la muestra era inferior al límite de la OMS por dosis de vacuna para ser humano (**Tabla 3**, columna 3). Para finalizar, la mayoría de las HCP de Vero se eliminó durante la cromatografía (flujo continuo, lavado y preelución; **Tabla 3**, columna 4). La inspección del factor de purificación (UFP por mg de HCP de Vero) para las fracciones que contienen VHS529 muestra una purificación de

VHS529 de 250 veces con respecto a las HCP de Vero (**Tabla 4**).

Ejemplo 10. VHS529 purificado por cromatografía es tan inmunogénico y protector como el VHS529 purificado por colchón de sacarosa *in vivo*

5 Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el IACUC. Se realizó una
 inmunización subcutánea (s.c.) en el cogote de ratones BALB/c hembra (Charles River, Wilmington, MA) de 6-7
 10 semanas, en los días 0 y 21 del estudio. El día 0, se inyectaron los animales con 100 µl de PBS estéril (grupo 3) o
 con 1×10^6 UFP de VHS529, ya sea purificado por colchón de sacarosa (grupo 1) o purificado por cromatografía
 (grupo 2), diluido a 100 µl con PBS estéril. En el día 34 del estudio, se inyectaron los ratones s.c. con 2 mg de
 15 acetato de medroxiprogesterona de depósito (Depo-Provera, DMPA) (SICOR Pharmaceuticals Inc., Irvine, CA) en
 PBS. Siete días después, los ratones se expusieron por vía intravaginal a 50 DL₅₀ (8×10^4 UFP) de VHS-2 cepa 333
 en 20 µl, con una pipeta de desplazamiento positivo. El VHS-2 cepa 333 fue un regalo del Dr. Jeffrey Cohen (NIAID,
 Sección de Virología Médica). Los animales se observaron durante 14 días después de la exposición. Los ratones se
 20 sacrificaron tras la observación de lesiones genitales purulentas. Se tomaron muestras de sangre de los animales en
 los días 18, 35 y 41 del estudio.

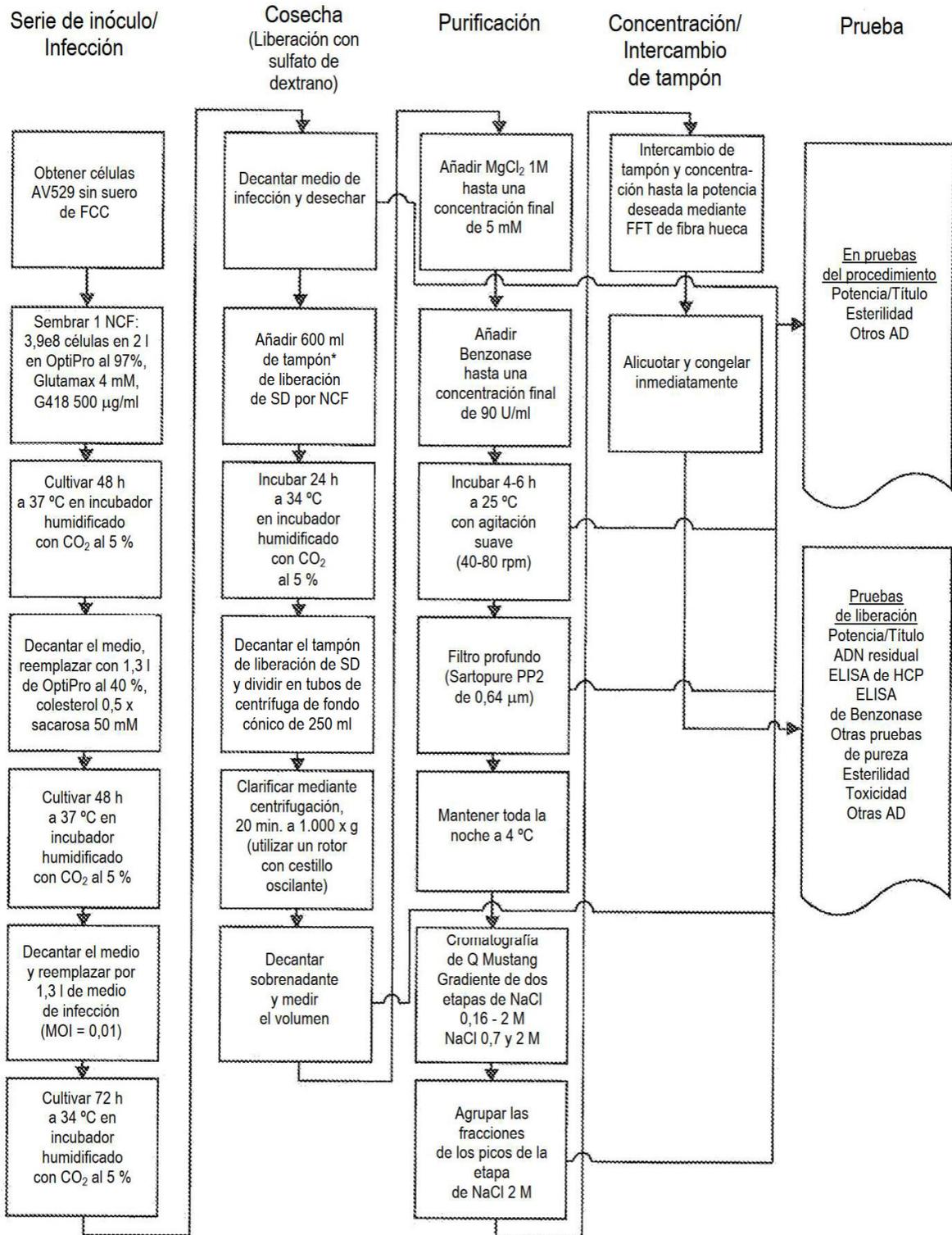
Se determinaron los títulos de ELISA por punto final frente a lisado de virus VHS-2 purificado (Advanced
 20 Biotechnologies, Colombia, MD) para el suero de las muestras del día 35. Se recubrieron placas (96 pocillos
 Maxisorp, Nalge NUNC International, Rochester, NY) con 100 µl/pocillo de lisado de virus VHS-2 a una
 concentración de 2 µg/ml. Se detectó las IgG en el suero con Fc de IgG de ratón-biotina 1:2.000 (Sigma-Aldrich,
 Saint Louis, MO) diluido en BSA al 1 %, Tween 0,05 % en PBS. La señal de fluorescencia resuelta en el tiempo
 (TRF, forma siglada de *time resolved fluorescence*) se midió usando un fluorómetro Victor II (Perkin Elmer, Waltham,
 MA) después de la adición de conjugado de europio-estreptavidina de inmunoensayo de fluorescencia de
 25 intensificado por disociación (DELFLIA) 0,1 µg/ml en tampón de ensayo DELFLIA.

Se inmunizaron ratones BALB-c hembra por vía subcutánea con dos dosis de VHS529 preparadas por
 ultracentrifugación con colchón de sacarosa o por cromatografía (preparación F). Se llevó a cabo un estudio de
 30 exposición letal como se esquematiza en la Figura 6A. Se analizó el suero de sangre tomada una semana después
 de la segunda y última dosis vacunal en cuanto a la respuesta de IgG frente a un lisado vírico disponible en el
 mercado. Después de dos inmunizaciones, ambas preparaciones suscitan una respuesta de IgG anti-VHS-2 similar
 (Figura 6B; $P=0,99$, ANOVA unidireccional, prueba de Kruskal-Wallis). Dos semanas después de la última
 inmunización, los animales se trataron con medroxiprogesterona y, siete días después, se les administró una
 35 exposición intravaginal de 50 x DL50 de VHS-2 de tipo silvestre cepa 333 (Figura 6C). La vacuna purificada por
 ultracentrifugación con colchón de sacarosa y la vacuna purificada por cromatografía proporcionaron una protección
 del 80% y 70% estadísticamente equivalente, respectivamente, mientras que la inmunización simulada dio como
 resultado una letalidad completa (0 % de supervivencia; $P < 0,0001$). Un estudio posterior con VHS529 purificado por
 cromatografía reveló que se logró una protección completa contra la exposición cuando la inmunización se realizó
 40 por vía intramuscular.

Además hay que señalar que, como se usa en la presente divulgación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas
 singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo
 contrario. Opcional u opcionalmente significa que el suceso o circunstancia descritos posteriormente se pueden
 45 producir o no, y que la descripción incluye casos en los que el suceso o circunstancia se produce y casos en los que
 no. Por ejemplo, la frase, opcionalmente, la composición puede comprender una combinación, significa que la
 composición puede comprender una combinación de distintas moléculas o puede no incluir una combinación de
 forma que la descripción incluya tanto la combinación como la ausencia de la combinación (es decir, miembros
 individuales de la combinación). En el presente documento los intervalos se pueden expresar como desde
 50 aproximadamente un valor particular y/o hasta aproximadamente otro valor particular. Cuando se expresa dicho
 intervalo, otro aspecto incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando
 los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente aproximadamente, se entenderá
 que el valor particular constituye otro aspecto. Se entenderá adicionalmente que los valores extremos de cada uno
 de los intervalos son significativos en relación con el otro valor extremo, e independientemente del otro valor
 55 extremo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende partículas purificadas del virus del herpes simple (VHS) en un tampón de estabilización líquido, en donde el tampón de estabilización líquido comprende glutamato, histidina, una sal y un azúcar, y en donde el ADN residual de la célula hospedadora de dicha composición es de menos de 10 ng de ADN de la célula hospedadora por 1×10^7 UFP.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde: el virus del herpes simple es VHS529 con replicación defectuosa.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho glutamato es glutamato de potasio.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde el tampón de estabilización líquido comprende glutamato de potasio 20-75 mM, histidina 1-20 mM, sal 50-250 mM y azúcar al 5-20 %.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde el tampón de estabilización líquido comprende glutamato de potasio 50 mM, histidina 10 mM, sal 160 mM y azúcar al 10 %.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicha sal es cloruro de sodio.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el azúcar es sacarosa o trehalosa.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde el pH del tampón de estabilización líquido es de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 o 7,8.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde el VHS es un VHS con replicación defectuosa.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde el VHS con replicación defectuosa es VHS529.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde la composición contiene más de 1×10^7 UFP/ml.
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en donde la composición contiene entre aproximadamente 1×10^7 y 2×10^7 UFP/ml.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde la composición es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. La composición de la reivindicación 13, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es un vehículo acuoso.
15. La composición de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde la composición es una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable.
16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15, que comprende adicionalmente un adyuvante.
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 16, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto mamífero.



*Composición del tampón de liberación de sulfato de dextrano: Glutamato de potasio 50 mM, Histidina 10 mM, Cloruro de sodio 150 mM, Sacarosa al 10 %, Sulfato de dextrano 100 µg/ml, pH 7,5

**Composición del tampón de formulación actual: Glutamato de potasio 50 mM, Histidina 10 mM, Cloruro de sodio 150 mM, Sacarosa al 10 %, pH 7,0

FIG. 1

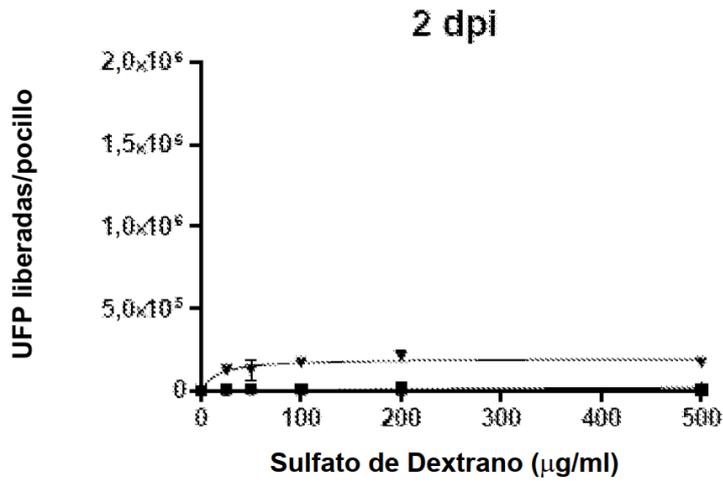


FIG. 2A

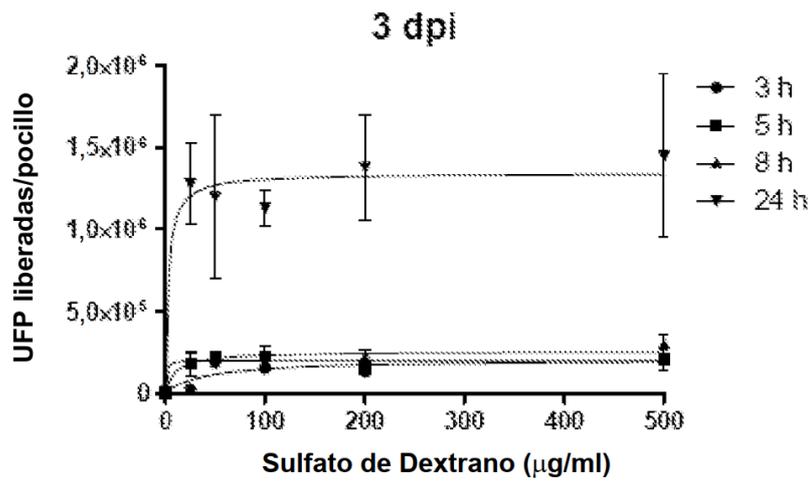


FIG. 2B

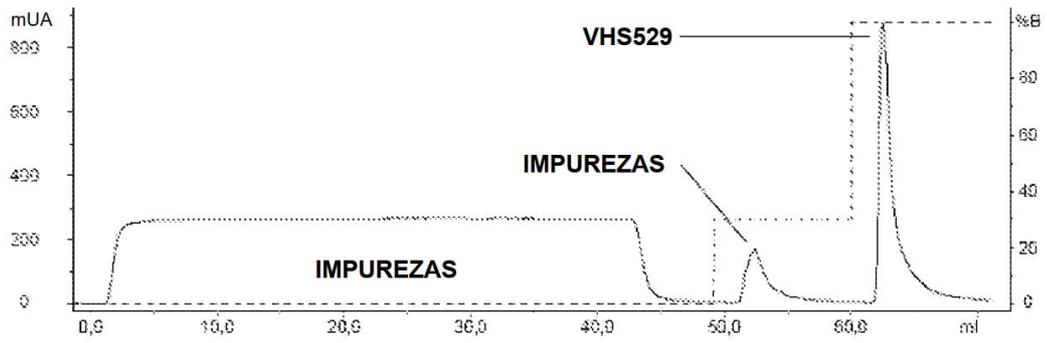


FIG. 3

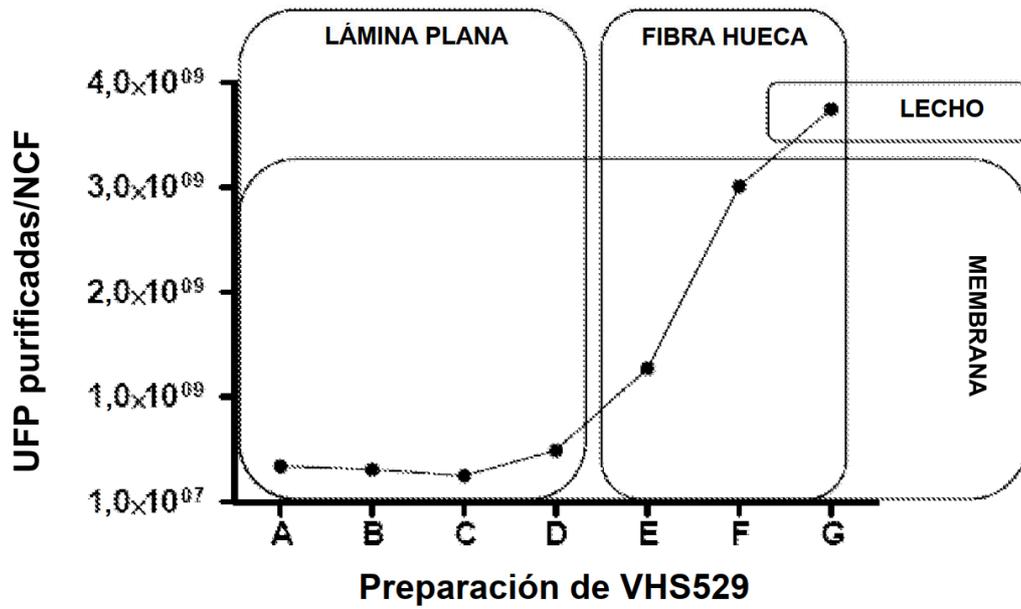


FIG. 4

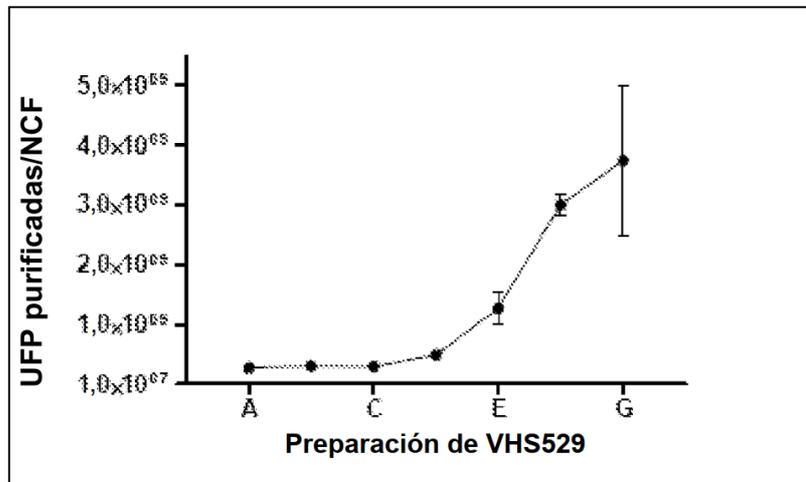


FIG. 5A

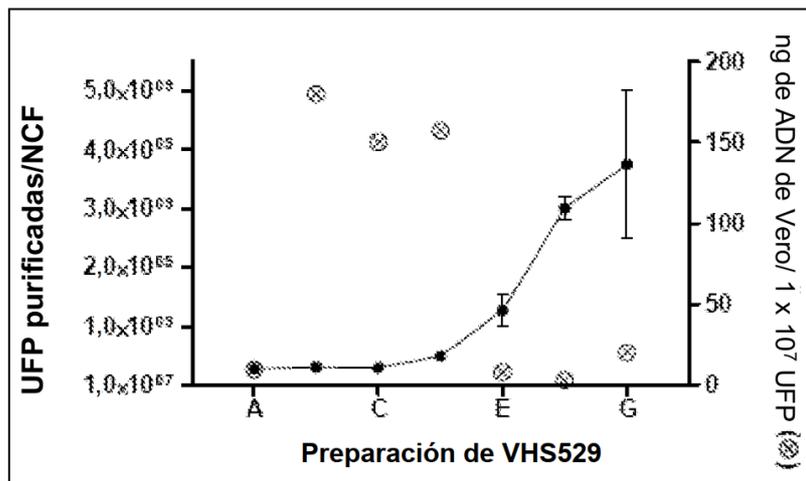


FIG. 5B

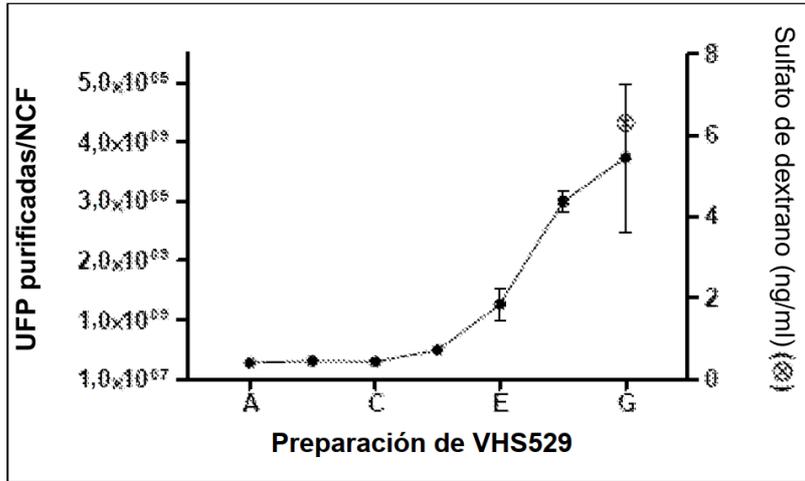


FIG. 5C

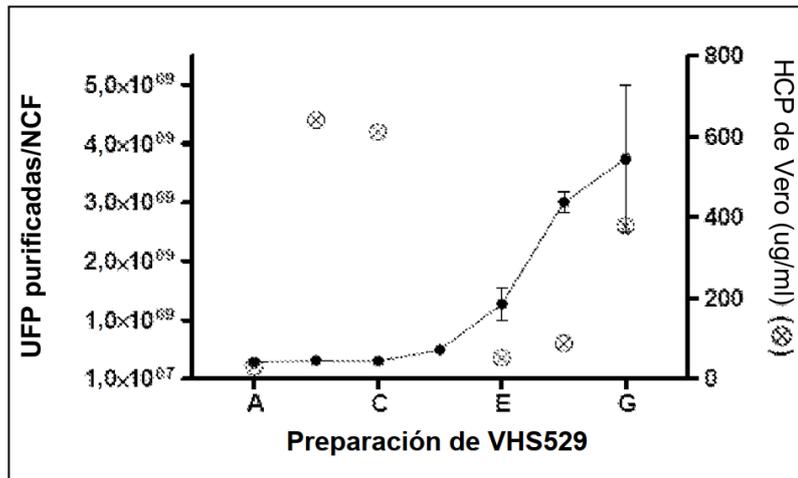


FIG. 5D

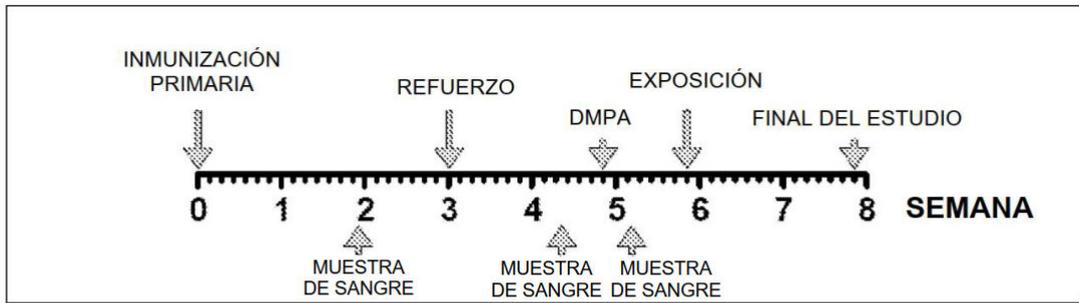


FIG. 6A

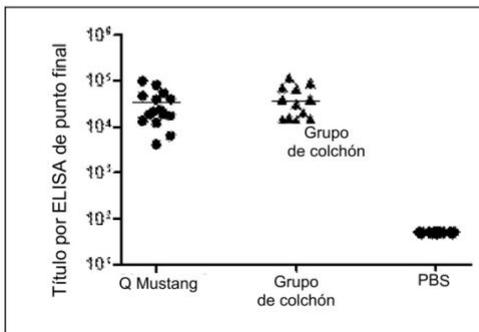


FIG. 6B

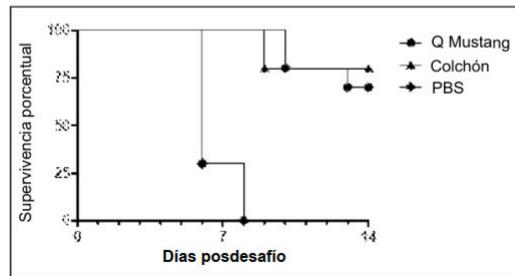


FIG. 6C