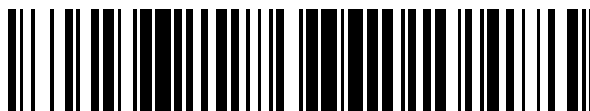


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 999**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2016 PCT/EP2016/001066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16206807**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2016 E 16736792 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3313987**

54 Título: **Método para la producción y purificación a gran escala de parvovirus**

30 Prioridad:

23.06.2015 EP 15173385

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

11.06.2020

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**LEUCHS, BARBARA;
ROSCHER, MANDY;
MÜLLER, MARCUS y
ROMMELAERE, JEAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 765 999 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

Método para la producción y purificación a gran escala de parvovirus

5 La presente invención proporciona un proceso reproducible, eficaz y modificable a escala para la producción de parvovirus, preferentemente para la producción de H-1PV, así como un proceso para la purificación de partículas (infecciosas) de parvovirus.

10 H-1PV pertenece al género *Protoparvovirus* dentro de la subfamilia *Parvovirinae* de *Parvoviridae* (Cotmore et al., 2014). Consiste en una cápside icosaédrica no envuelta de 25 nm de diámetro y contiene un genoma de ADN monocatenario de aproximadamente 5 kb de longitud, que codifica proteínas no estructurales, especialmente NS1 (83 kDa) y NS2 (25 kDa), y las proteínas de la cápside VP1 (81 kDa) y VP2 (65 kDa). Otra proteína de la cápside, VP3 (63 kDa), se genera mediante escisión postraduccional de VP2 (Faisst et al., 1995; Halder et al., 2012; Hanson y Rhode, 1991; Toolan et al., 1960). Los protoparvovirus se replican de forma dependiente de la fase S y experimentan un ciclo lítico después de la infección de las células permisivas (Burnett et al., 2006). Aunque el hospedador natural de H-1PV es la rata, este virus ha despertado recientemente un gran interés porque se replica preferentemente en células transformadas, incluyendo una serie de células tumorales humanas. Por tanto, el virus tiene propiedades oncolíticas y oncosupresoras que se han demostrado en diversos cultivos celulares y modelos animales (Nuesch et al., 2012; Rommelaere et al., 2010). En modelos de xenoinjerto, se ha demostrado que H-1PV suprime una serie de tumores humanos, incluyendo tumores del cuello del útero (Faisst et al., 1998; Li et al., 2013), tumores pancreáticos (Angelova et al., 2009b; Grekova et al., 2011), carcinomas mamarios (Dupressoir et al., 1989), gliomas (Geletneky et al., 2010; Kiprianova et al., 2011), carcinoma de colon (Bhat et al., 2013) y linfomas (Angelova et al., 2009a). Además, se ha demostrado que H-1PV elimina satisfactoriamente células madre cancerosas (documento EP 2 404 609 A1). Sobre la base de estas pruebas preclínicas de concepto, en 2011 se inició un primer ensayo clínico (fase I/IIa) de H-1PV, para pacientes con glioblastoma multiforme recurrente (Geletneky et al., 2012).

30 Para someter a ensayo y, en última instancia, aprovechar el potencial terapéutico de H-1PV, es necesario desarrollar un proceso de producción de virus eficiente, simple y reproducible, y ensayos fiables para la caracterización cuantitativa y cualitativa de lotes de virus finales. Se han publicado métodos para la producción a pequeña escala de H-1PV en células NB-324K y su purificación mediante centrifugación por gradiente de densidad de cloruro de cesio (Halder et al., 2012; Paradiso, 1981) o Iodixanol (Wrzesinski et al., 2003; Zolotukhin et al., 1999). La bibliografía también describe la titulación de viriones infecciosos mediante ensayo en placa (Tattersall y Bratton, 1983) de partículas físicas de H-1PV mediante microscopía electrónica (Halder et al., 2012) o ensayo de hemaglutinación (Kongsvik y Toolan, 1972) y de partículas que contienen genoma mediante PCR cuantitativa (Lacroix et al., 2010). Sin embargo, no se han realizado análisis comparativos sistemáticos para determinar y optimizar el rendimiento y la pureza del virus o la sensibilidad de los métodos analíticos para la cuantificación del virus y el control de la calidad.

40 Por tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención es normalizar y optimizar la producción, purificación y caracterización de parvovirus.

La solución de dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

45 La investigación del protoparvovirus oncolítico ha alcanzado la fase de traducción a la práctica clínica, con un primer estudio de fase I/IIa de H-1PV en pacientes con glioma maligno extirpable recurrente (Geletneky et al., 2012). Se espera que a este ensayo le sigan estudios clínicos adicionales con el objetivo de evaluar la eficacia y prolongar el enfoque a otros cánceres tales como el carcinoma pancreático o el neuroblastoma (Lacroix et al., 2010; Li et al., 2013). Estos desarrollos dependen de la disponibilidad de procedimientos robustos para la producción y caracterización de protoparvovirus. Por un lado, se necesitan procedimientos normalizados para generar datos preclínicos que puedan proporcionar la prueba de concepto. El uso de preparaciones de virus y métodos analíticos bien caracterizados es, de hecho, un requisito previo para obtener pruebas válidas y reproducibles de la eficacia terapéutica de los protoparvovirus oncolíticos en oncología. Por otro lado, también se requieren procedimientos operativos convencionales para la transferencia de tecnologías y criterios a las instalaciones certificadas encargadas de producir lotes clínicos y establecer sus especificaciones.

55 Durante los experimentos que dieron como resultado la presente invención, se introdujeron innovaciones importantes para la producción de virus a gran escala, con eliminación de contaminantes no deseados a través del aclaramiento de lotes de virus y la purificación de partículas infecciosas mejorados. Los inventores se centraron en desarrollar procedimientos normalizados de producción, purificación y caracterización como base para aprovechar H-1PV tanto preclínicamente como en ensayos clínicos para la viroterapia contra el cáncer. Se sometieron a ensayo dos estrategias de infección y dos estrategias de purificación de virus y las preparaciones de virus resultantes se compararon en cuanto a su pureza y su contenido de partículas completas, infecciosas y vacías. El proceso de producción adoptado, que implica cultivar e infectar células de riñón de recién nacido humano NB-324K transformadas con virus de simio 40 (SV40) (Tattersall y Bratton, 1983) en un sistema de recogida convencional (por ejemplo, cámaras CellSTACK® (CS) de 10 capas; rendimiento preferido: 1×10^3 unidades infecciosas por célula infectada), es simple, modificable a escala y reproducible. El procesamiento corriente abajo para eliminar el ADN y las proteínas contaminantes incluyen

tratamiento con ADNasa, filtración y dos centrifugaciones por gradiente de densidad de Iodixanol, siendo el primer gradiente un gradiente escalonado y el segundo, un gradiente escalonado (por ejemplo, título alcanzado: 1×10^{10} UFP/ml) o un gradiente continuo (por ejemplo, título alcanzado: 3×10^{11} UFP/ml). También se desarrolló un procedimiento para obtener preparaciones infecciosas sin partículas de viriones vacíos con fines de investigación:

5 centrifugación por gradiente de densidad de cloruro de cesio seguida de irradiación UV (por ejemplo, título alcanzado: 1×10^{14} partículas físicas/ml). Para la determinación rápida y sensible de partículas físicas (y, por tanto, relaciones de partículas con respecto a infectividad), se desarrolló un "Cápside-ELISA", basado en un nuevo anticuerpo monoclonal que se dirige específicamente a cápsides ensambladas.

10 La presente invención ilustra este esfuerzo de normalización. Describe métodos para respaldar la investigación preclínica. Se consiguieron mejoras en tres etapas de la preparación de la solución madre de H-1PV: (1) producción de virus reproducible, normalizada, a gran escala, (2) purificación y concentración de virus mediante procedimientos alternativos e (3) implementación de criterios de control de calidad.

15 *(A) Producción de H-1PV reproducible, normalizada, a gran escala*

Se estableció un proceso de producción robusto y normalizado de H-1PV, como se ilustra a continuación para cinco lotes de virus individuales y como se resume en la Fig. 9.

20 Se consiguió un rendimiento de virus de 2×10^{11} UFP con una concentración de 1×10^{10} UFP/ml, compatible con el uso preclínico y clínico, con una única cámara CS de 10 capas. Este rendimiento corresponde a una productividad de aproximadamente 1×10^3 partículas infecciosas por célula infectada. El sistema de 10 capas proporciona aproximadamente la misma superficie de fijación que una placa de cultivo celular de 100×10 cm (Halder et al., 2012). La producción eficiente fue posible debido a las buenas condiciones de las células productoras (NB-324K), con una

25 viabilidad superior al 95 %, un número de pases inferior a 20, sin contaminación por micoplasma (Multiplexion, Alemania) y la calidad uniforme del FBS.

Los intentos iniciales de aumentar a escala la producción de H-1PV en un sistema de frascos rotativos fracasaron, incluso cuando se aplicó gaseado intermitente con CO_2 al 5 % y tampón Hepes/ NaHCO_3 (datos no mostrados). Los

30 inventores, sin embargo, consiguieron un medio intracelular óptimo para la producción de virus mediante gaseado con CO_2 .

Una manera simple y eficiente de conseguir un aumento de escala era usar cámaras CS, proporcionando recuperaciones de hasta 1×10^{12} UFP de cinco cámaras de 10 capas. Sería posible un aumento a escala adicional con cámaras de 40 capas, aunque su manipulación para la agitación y el gaseado es más laboriosa. Un aumento a

35 escala adicional con células adherentes implicaría el uso de vehículos, como se describe para la producción de vacunas (Rajendran et al., 2014). Una alternativa atractiva sería usar cultivos celulares en suspensión en reactores de onda, como se describe para la producción de vacunas de PV contra la enteritis de visón (Hundt et al., 2007). En el documento WO 2015/031686 A1 se describe un método relacionado con respecto a la producción de vectores AAV recombinantes de alto título en células adherentes y en suspensión.

40

(B) Purificación y concentración eficientes de preparaciones de H-1PV

Las recogidas de virus no procesadas contenían partículas completas, vacías y de densidad intermedia, y estaban contaminadas por proteínas y ADN tanto víricos como de células hospedadoras. En primer lugar se trataron con

45 ADNasa y después se aclararon a través de un filtro (por ejemplo, filtro de $0,2 \mu\text{m}$). Esto dio como resultado la eliminación del 37 % del ADN de la célula hospedadora y el ADN vírico no empaquetado y del 24 % de la proteína total. Los fragmentos residuales de ADN de la célula hospedadora demostraron ser más pequeños que 62 pb.

Se purificó H-1PV adicionalmente mediante centrifugación por gradiente de Iodixanol o CsCl. Estos métodos se compararon con respecto al título de H-1PV obtenido, la separación de partículas completas de vacías y la presencia de proteínas contaminantes, según se midió mediante microscopía electrónica y tinción con azul de Coomassie después de SDS-PAGE. En un informe reciente (Halder et al., 2012) se consiguió una purificación alta de partículas vacías frente a partículas completas a través de tres rondas de centrifugación de CsCl, como se evidencia en

50 micrográficas electrónicas. Sin embargo, debido a la toxicidad del CsCl, este procedimiento no se recomienda para la purificación de referencia de lotes de virus preclínicos y clínicos. Esto llevó a los inventores a desarrollar un procedimiento de purificación de dos etapas que implicaba sucesivas centrifugaciones por gradiente de densidad de IOD-PBS y VIS-Ringer.

55

La comparación de las fracciones de gradiente de CsCl y VIS-Ringer muestra los pros y los contras respectivos de estos métodos. Por un lado, la centrifugación por gradiente de CsCl aparece como método de elección para preparar viriones vacíos con fines de investigación, puesto que la relación de partículas con respecto a UFP en la fracción de partículas vacías fue diez veces mayor después de la centrifugación por gradiente de densidad de CsCl que después de la etapa de Vis-Ringer, con un título específico superior a 10^{14} PP/mg de proteína. Por otro lado, el procedimiento de centrifugación por gradiente de Iodixanol de dos etapas surge como una mejor manera de purificar partículas infecciosas debido a que evita la toxicidad del CsCl (una desventaja en el caso de aplicaciones clínicas) y porque es

60

65

menos costoso y lleva menos tiempo (medio día frente a tres días para la centrifugación con CsCl). Además, produce títulos de actividad específicos de aproximadamente 5×10^{11} UFP/mg de proteína. La concentración de virus en la fracción de partículas completas de Vis-Ringer fue de aproximadamente 1×10^{10} UFP/ml y aumentó hasta 3×10^{11} UFP/ml cuando el gradiente escalonado de Vis-Ringer se reemplazó con un gradiente continuo. Las fracciones de virus recogidas de los gradientes de Vis-Ringer fueron estables durante más de dos años, permitiendo que estas fracciones se usasen como soluciones madre de virus sin ningún cambio de tampón adicional. Por estas diversas razones, el procedimiento de purificación con iodixanol se usa habitualmente para preparar soluciones madre de H-1PV infeccioso. Además de los métodos de centrifugación por gradiente de densidad que se presentan en el presente documento, otros procedimientos de purificación de virus validados en otros sistemas merecen ser sometidos a ensayo para determinar su aplicabilidad a la preparación de PV oncolíticos. La cromatografía y el cromatofoco son de especial interés para la producción a gran escala (Okada et al., 2009), puesto que las partículas vacías y completas pueden separarse mediante cromatografía, como se muestra para AAV (Qu et al., 2007). El uso de absorbentes de membrana para capturar el protoparvovirus MVM también se ha descrito recientemente (Weaver et al., 2013).

(C) Calidad alta de lotes de partículas completas y vacías

La Conferencia Internacional de Armonización ha publicado directrices para este tipo de producto en "*Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products*" (Especificaciones: Procedimientos de ensayo y criterios de aceptación para productos biotecnológicos/biológicos) (Q6B, 1999). Estas directrices especifican los niveles a los que deben caracterizarse los fármacos, incluyendo sus propiedades fisicoquímicas, actividad biológica, propiedades inmunoquímicas, cantidad, pureza, impurezas y contaminantes. En principio, el material de origen, las etapas de purificación y la formulación garantizan la calidad constante de un medicamento. Se cuantificaron y especificaron lotes de H-1PV de acuerdo con las directrices del CIH (ICH, por sus siglas en inglés). Una cuestión particular abordada en la presente invención fue la contaminación de las soluciones madre de virus de partículas completa por partículas vacías. Esto es importante porque las partículas vacías, aunque no son tóxicas, pueden afectar a la fisiología celular e inducir respuestas inmunitarias antivíricas (Gao et al., 2014). Por tanto, se requieren métodos para cuantificar tanto los viriones que contienen genoma como las partículas víricas físicas totales. Aunque la PCR cuantitativa aparece como una buena forma de cuantificar viriones completos, existe la necesidad de un método más conveniente de cuantificación de partículas físicas. Se desarrolló en la presente invención un "Cápside-ELISA" que usa el mAb BL-H1 que reconoce específicamente cápsides H-1PV ensambladas. Este ELISA demostró ser menos laborioso, más fiable y también más sensible que el ensayo de hemaglutinación utilizado habitualmente para detectar partículas parvovíricas. El aclaramiento de partículas vacías de lotes de viriones completos sigue siendo un objetivo para la mejora adicional de los procedimientos de purificación. Por el contrario, también es importante obtener soluciones madre de partículas vacías que estén libres de viriones infecciosos y puedan estudiarse por sus efectos *in vitro* e *in vivo* en ausencia de infectividad vírica. Esto se consiguió irradiando lotes de partículas vacías con luz UV para inactivar viriones infecciosos. El procedimiento T da como resultado lotes de partículas vacías que contienen menos del 10^{-10} % de viriones infecciosos.

(D) Ámbito de aplicación del anticuerpo monoclonal BL-H1

Además de su uso en el control cualitativo y cuantitativo de soluciones madre de virus, el mAb BL-H1 ha demostrado ser valioso tanto para la investigación preclínica como para la de ensayos clínicos y de acompañamiento. Se usa como patrón para cuantificar anticuerpos específicos contra H-1PV en suero de animales tratados (Grekova et al., 2011) y podría usarse en el futuro para controlar la seroconversión en pacientes. BL-H1 también puede usarse como anticuerpo de captura en un ELISA que detecta viremia en sujetos infectados y para seleccionar ratas de instalaciones animales para detectar infección por PV (documento EP 2 332 986 A1).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Caracterización de anticuerpos dirigidos a proteínas de la cápside vírica

Se analizaron extractos de proteínas preparados a partir de células 293T HEK transfectadas con un clon molecular de H-1PV infeccioso mediante centrifugación por gradiente de sacarosa. Se analizaron fracciones individuales para detectar la presencia de las proteínas GP, IU, HAU y VP. Las VP se detectaron, respectivamente, mediante transferencia puntual western con anticuerpos BL-H1 o α VP. Los datos muestran que el mAb BL-H1 reconoce específicamente las cápsides ensambladas, mientras que α VP reconoce las proteínas VP.

Figura 2: Caracterización del ELISA de Cápside de H-1PV

La absorbancia a 450 nm se representa gráficamente frente al número de partículas de H-1PV añadidas (determinado mediante ELM). Los valores indicados representan medias con barras de desviación típica de 3 mediciones independientes. Una dosis-respuesta lineal derivó del análisis de regresión de datos. Las muestras indicadas como "QC-L" y "QC-M" contenían, respectivamente, 4 y 8×10^8 partículas y se usaron posteriormente como patrones de control de calidad de concentración baja y media.

Figura 3: Separación de cápsides de H-1PV vacías de completas mediante centrifugación por gradiente de CsCl

Se detectaron cápsides mediante ensayo de hemaglutinación (HAU) o Cápside-ELISA (PP), mientras que el genoma que contenía partículas víricas (GP) se cuantificó mediante Q-PCR.

Figura 4: Reproducibilidad de la producción de H-1PV

Después de la producción en una CS de 10 capas, se prepararon y analizaron las recogidas de virus. Se determinaron los títulos de UFP, GP y PP y se expresaron con respecto al número de células en la CS en el momento de la infección. Se muestran valores para 5 producciones independientes.

Figura 5: Alcance de la separación de partículas completas y vacías después de la centrifugación por gradiente de densidad en (a) IOD-PBS y VIS-Ringer sucesivamente o (b) CsCl

Se muestran los títulos de UFP, GP y PP de las fracciones indicadas (medias con desviaciones típicas de 5 experimentos independientes).

Figura 6: Recuperación, actividad específica y relación de partículas con respecto a infectividad en fracciones de partículas completas y vacías

La recogida de virus se aclaró y después se purificó mediante centrifugación por gradiente de densidad de IOD-PBS y VIS-Ringer o mediante centrifugación por gradiente de densidad de CsCl. Se analizaron muestras de recogida aclaradas, fracción de gradiente de IOD-PBS que contenía virus, fracciones de gradiente de VIS-Ringer de partículas completas y vacías y fracciones de gradiente de CsCl de partículas completas y vacías.

(a) Actividad específica (UFP/mg), recuperación de UFP (%) y relación PP/UFP en las fracciones de partículas intermedias y completas.

(b) Título de cápside específico (PP/mg), recuperación de PP (%) y relación PP/UFP en las fracciones de partículas intermedias y vacías.

Figura 7: Concentración de H-1PV mediante centrifugación continua por gradiente de VIS-Ringer

Se aclaró una recogida de H-1PV y después se purificó mediante centrifugación por gradiente de densidad, en primer lugar en un gradiente escalonado de IOD-PBS y después en un gradiente continuo de VIS-Ringer. Se determinaron títulos de GP e IU en la recogida de virus aclarada, después del gradiente escalonado de IOD-PBS y en las fracciones 1 - 10 del gradiente continuo. Las fracciones ricas en IU 4 - 6 se analizaron adicionalmente, mostrando concentraciones de H-1PV infeccioso de hasta $3,0 \times 10^{11}$ UFP/ml.

Figura 8: Composición de proteínas de lotes de virus de etapas sucesivas de purificación

Paneles a, b: Se analizaron extractos de proteínas de muestras de virus (1×10^{10} PP) mediante SDS-PAGE y se revelaron mediante (a) tinción con plata o (b) inmunotransferencia con anticuerpos α VP.

Calle 1: Recogida de virus, calle 2: recogida de virus aclarado, calles 3-7: fracciones de gradiente de CsCl correspondientes a partículas completas (3), intermedias completas/vacías (4), vacías (5), intermedias completas/vacías irradiadas con rayos UV (6) y partículas vacías irradiadas con UV (7), calle 8: partículas víricas del gradiente de IOD-PBS, calles 9-11: fracciones de gradiente de VIS-Ringer correspondientes a partículas completas (9), intermedias completas/vacías (10) y vacías (11), M: marcadores de tamaño.

Paneles c, d: Micrografías electrónicas que muestran fracciones de partículas vacías antes (c) y después (d) de la irradiación UV.

Figura 9: Diagrama de flujo de la producción de H-1PV con los procedimientos recomendados para preparar partículas infecciosas (A) y vacías (B)

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para producir partículas de parvovirus activas completas y partículas de parvovirus inactivas vacías, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar la estirpe celular productora NB-324K;
- (b) cultivar la estirpe celular en condiciones adecuadas e infectar las células a una densidad celular de 2,0 a $5,0 \times 10^4$ células/cm² con el parvovirus a una MDI de 0,5 a 2×10^{-2} UFP/células;
- (c) recoger las células 2 a 6 días después de la infección y obtener un sedimento celular mediante centrifugación;
- (d) someter el sedimento celular resuspendido a un método de lisis celular mecánico, físico o químico para obtener un lisado celular que contiene parvovirus;
- (e) tratar con ultrasonidos el lisado celular y someterlo a tratamiento con ADNasa;
- (f) aclarar la recogida de parvovirus tratado con ADNasa mediante filtración; y
- (g1) purificar el parvovirus mediante dos ultracentrifugaciones por gradiente de densidad sucesivas, en donde el primer gradiente es un gradiente escalonado de Iodixanol/PBS y el segundo gradiente es un gradiente escalonado de Iodixanol/Ringer o un gradiente continuo de Iodixanol/Ringer para obtener partículas de parvovirus activas completas en una fracción y partículas de parvovirus vacías en otra fracción.

Para obtener resultados óptimos, la estirpe celular productora NB-324K se caracteriza por (a) una viabilidad de al

menos el 95 %, (b) un número de pases inferior a 20 (c) falta de contaminación por micoplasma y (d) falta de producción de SV 40.

Preferentemente, el método de la presente invención se usa para la producción/purificación del parvovirus H1-PV.

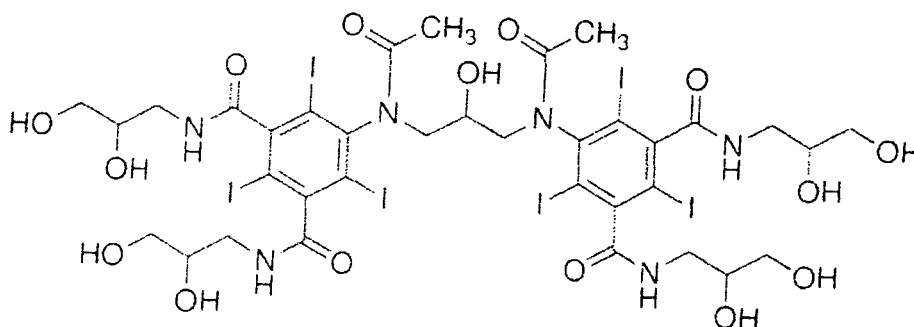
El experto en la materia conoce las condiciones comunes para cultivar la estirpe celular productora y para infectar las células con el parvovirus. Por lo general, las células se cultivan a 37 °C, por ejemplo, en medio esencial mínimo con suero fetal bovino inactivado por calor (por ejemplo, FBS al 5 %) en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Preferentemente, el medio debe complementarse con penicilina, estreptomycin y L-glutamina.

En una realización preferida de la presente invención, la densidad celular de la etapa (b) es de 3,0 a 4,0 x 10⁴ células/cm².

En una realización preferida adicional del método de la presente invención, la producción de virus se realiza en un sistema de cultivo celular de un solo uso, preferentemente una cámara de cultivo celular de 10 capas, por ejemplo, la cámara CellSTACK® (CS). Puede conseguirse una mejora adicional con una cámara CS de 40 capas o un sistema de soporte. Preferentemente, para la recogida, el medio de cultivo se aspira y las células infectadas se tratan con un tampón y/o enzima adecuados, por ejemplo, PBS-EDTA o tripsina. El sobrenadante del medio y las células desprendidas se centrifugan para obtener un sedimento celular, preferentemente a 5.000 x g, preferentemente durante aproximadamente 5 min. El experto en la materia conoce métodos mecánicos, químicos o físicos adecuados para liberar el parvovirus de las células productoras. Preferentemente, esto puede hacerse mediante ciclos de congelación/descongelación, tratamiento con ultrasonidos y/o tratamiento con Triton® S100. El experto en la materia también conoce métodos adecuados para tratar con ultrasonidos las células y el posterior tratamiento con ADNasa. Por ejemplo, las células pueden tratarse con ultrasonidos a 30 a 70 W durante un tiempo suficiente y el tratamiento con ADNasa se realiza con 20-80 U/ml de ADNasa, generalmente a 37 °C durante 10 a 50 min.

Para la purificación adicional y para el enriquecimiento de partículas parvovíricas activas completas, se realizan gradientes de densidad de Iodixanol/PBS (IOD-PBS) y Visipaque/Ringer (Vis-Ringer). Estas etapas se describen con más detalle a continuación.

El "Iodixanol" mencionado anteriormente es sinónimo de "Visipaque" (para inyección humana) o "Iodixanolum" (calidad de investigación). La estructura química es



El nombre IUPAC es 5-[acetil-[3-[N-acetil-3,5-bis(2,3-dihidroxiopropilcarbamoi)-2,4,6-triyodoanilino]-2-hidroxiopropil]amino]-1-N,3,N-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triidobenceno-1,3-dicarboxamida. El número de CAS es 92339-11-2. Visipaque también es un agente de contraste bien conocido para imágenes de TC.

(i) Gradientes de densidad de IOD-PBS y Vis-Ringer

Por tanto, para eliminar proteínas, se realizó una centrifugación por gradiente de densidad escalonada como se describe por Zolotukhin (Zolotukhin et al., 1999). En una realización preferida, se llenaron tubos Quickseal (Beckman, Alemania, por ejemplo, 25 x 89 mm) con 10-50 ml, preferentemente 20 ml, de suspensión de virus. Esta suspensión se cubrió con dos a cinco, por ejemplo, cuatro, capas de Iodixanol (Alexis Shield, Noruega) en PBS. Concentraciones preferidas de Iodixanol: 15, 25, 40 y 60 %. La ultracentrifugación se realizó durante un tiempo y velocidad adecuados en una ultracentrífuga, preferentemente 2 h a 4 °C en un rotor de 50,2 Ti a 50.000 rpm (Beckman, L870M, Alemania) que corresponde a una fuerza centrífuga relativa (FCR) de 227.220. Por lo general, se recogieron 3,5 ml de suspensión de virus de la capa de Iodixanol al 40 %. A continuación, se realizó una segunda centrifugación por gradiente de densidad con Visipaque (GE Healthcare, Noruega) diluido en solución de Ringer (B. Braun, Alemania) para una eliminación adicional de proteínas y una separación de partículas completas de partículas vacías. En una realización preferida, se llenaron tubos Quickseal (por ejemplo, 25 x 89 mm) con suspensión de virus del gradiente de densidad de IOD-PBS, diluido al menos 1:2,5 en tampón, por ejemplo, solución de Ringer. Después se colocaron 1-10 ml (por ejemplo, 5 ml) de Visipaque al 25 %, 1-10 ml (por ejemplo, 4 ml) de Visipaque al 40 % y 1-10 ml (por ejemplo, 4 ml)

de Visipaque al 55 % en solución de Ringer. Para la detección de la capa del 40 %, se realizó un gradiente de referencia, donde las fases de Visipaque/Ringer al 25 % y al 55 % se colorearon con rojo fenol. Adicionalmente, la fase del 40 % se etiquetó por fuera en el tubo de muestra. La ultracentrifugación se realizó en condiciones adecuadas, por ejemplo, durante 2 h a 4 °C en un rotor de 50,2 Ti a 50.000 rpm. Después se recogieron dos fracciones de la fase del 40 % con una jeringa y una aguja hueca: preferentemente 1-5 ml, por ejemplo, 2,5 ml, de la fracción de partículas completas (banda inferior en la capa del 40 %) y preferentemente 0,1-1,5 ml, por ejemplo, 800 µl, de la fracción de partículas vacías (banda superior en la capa del 40 %). El índice de refracción de una muestra de 5 µl se midió con un refractómetro (AR200, Reichert Analytical Instruments, Alemania) y las densidades de las regiones de las que se tomaron las fracciones se calcularon con una tabla de referencia para Iodixanol (AXIS-SHIELD, Noruega).

(ii) Gradiente continuo de Vis-Ringer

Para el gradiente continuo de Vis-Ringer, los tubos Quickseal se llenaron con suspensión de virus diluida en solución de Ringer a un índice de refracción de aproximadamente 1,3 a 1,4, por ejemplo, 1,3815, (correspondiente a Visipaque al 30 %). La suspensión de virus se cubrió con 0,1-1 ml, preferentemente 0,5 ml, de lecho de Visipaque al 60-70 %, preferentemente al 65,2 %, y el tubo se llenó completamente con, preferentemente, solución de Visipaque/Ringer al 30 %. La ultracentrifugación se realizó en condiciones adecuadas, preferentemente durante 10 h a 4 °C en un rotor 70,1 Ti a 63.000 rpm. Se recogieron fracciones de aproximadamente 500 µl del fondo con goteo controlado.

Como se ha mencionado anteriormente, para obtener partículas inactivas vacías se realiza un gradiente de densidad de CsCl. Se estableció un gradiente de densidad de CsCl como se ha descrito anteriormente (Paradiso, 1981). Se llenaron tubos de centrifuga de polialómero (Beckmann, Alemania; 14 x 95 mm) con 1-10 ml, preferentemente 5 ml, de CsCl a aproximadamente 1,4 g/cm³ de densidad y se recubrieron con 0,1-2 ml, preferentemente 1 ml, de sacarosa 1 M seguido de 5 ml de suspensión de virus. La ultracentrifugación se realizó en condiciones adecuadas, preferentemente 15 °C durante al menos 20 h a 39.000 rpm en un rotor SW41. Se recogieron diferentes fracciones del fondo (por ejemplo Fr n.º 1: 500 µl, fr n.º 2: 300 µl, fr n.º 3-20: 200 µl) y el contenido de la cápside (partícula física, PP (por sus siglas en inglés)) se midió por medio del nuevo ELISA (Cápside-ELISA) que se describe a continuación o mediante ensayo de hemaglutinación. Para la detección de unidades de hemaglutinación (Kongsvik y Toolan, 1972), las fracciones se diluyeron de 1:10 a 1:50, por ejemplo, 1:25, en tampón (por ejemplo, PBS) y se diluyeron adicionalmente en serie (por ejemplo, 1:2) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania). A continuación, se añadió una cantidad adecuada, preferentemente 25 µl, de una suspensión al 2 % de glóbulos rojos de cobaya (Charles River Laboratories, Alemania) en PBS. La placa se incubó, por ejemplo, durante 1 h a 4 °C, y el título se leyó como la dilución más alta a la que se completó la hemaglutinación. Se midió el índice de refracción y se calculó la densidad de acuerdo con una tabla de referencia para CsCl (Griffith, 2006). Las fracciones que contenían cápsides completas o vacías se agruparon y se dializaron directamente, por ejemplo, frente a 1.000 volúmenes de tampón VTE durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente. A esto le siguieron varios, preferentemente tres, ciclos de diálisis a 4 °C para eliminar el CsCl tóxico.

En otra realización preferida, también pueden obtenerse partículas vacías después de la centrifugación por gradiente de Vis-Ringer. Como se ha mencionado anteriormente, la fracción de partículas vacías se encuentra como la banda superior en la capa del 40 %.

Para la inactivación de partículas infecciosas residuales en el conjunto de partículas vacías, la fracción de partículas vacías se somete a una etapa de desactivación. Son métodos de desactivación adecuados la inactivación UV (Tuynder et al, 2004), los métodos químicos, físicos y/o térmicos. Se prefiere en particular la inactivación UV.

La presente invención también proporciona un método para determinar la relación de cápsides de parvovirus nativas con respecto a proteínas de cápsides no ensambladas o cápsides desnaturalizadas. En una realización preferida, la relación se determina usando un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal particularmente preferido es el anticuerpo monoclonal BL-H1 (DSM ACC 3030). El experto en la materia conoce formatos adecuados para el uso de este anticuerpo, por ejemplo, ELISA. Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar, pero no limitar, la invención. Aunque dichos ejemplos son típicos de aquellos que podrían usarse, pueden utilizarse como alternativa otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

(A) Estirpe celular productora, solución madre de virus H-1PV

Se cultivaron células de riñón de recién nacido humano NB-324K transformadas con virus de simio 40 (SV40) (Tattersall y Bratton, 1983) a 37 °C en medio esencial mínimo (MEM, Sigma, Alemania) con suero fetal bovino al 5 % inactivado por calor (FBS, Biowest, Francia) en una atmósfera de CO₂ al 5 %. El medio se complementó con penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM (Life Technologies, Alemania). Para la producción, se sembraron células NB-324K propagadas en matraces Y de 175 cm² (Nunc, Dinamarca) en una cámara de cultivo CellSTACK® de 10 capas (Corning, Alemania) con un área de crecimiento de 6,360 cm². Se midieron la densidad

celular y la viabilidad tiñendo las células vivas con azul de tripano al 0,4 % (Invitrogen™, Alemania). Las células se contaron con un contador de células Countess® (Life Technologies, Alemania). Se usó una solución madre de virus H-1PV purificada internamente para infectar las células.

5 (B) Producción de H-1PV

Se eligió una CellSTACK® (CS) de 10 capas como sistema de producción de un solo uso conveniente. Para la siembra y la infección celular simultáneas, se sembraron células NB-324K a $3,6 \times 10^4$ células/cm² en la CS de 10 capas y se infectaron inmediatamente con H-1PV a una multiplicidad de infección (MDI) de 0,01 unidades formadoras de placa (UFP) por célula. El pH durante la infección fue de $7,0 \pm 0,1$. Las células infectadas se incubaron durante 4 días a 37 °C con CO₂ al 5 % hasta que el efecto citopático (ECP), medido como el porcentaje de células muertas y desprendidas observadas con un microscopio, alcanzó al menos el 30 %. Para la siembra y la infección no simultáneas, se sembraron células NB-324K a $7,9 \times 10^3$ células/cm² en una CS de 10 capas y se les permitió crecer durante tres días, momento en el que habían alcanzado una densidad de aproximadamente $3,6 \times 10^4$ células/cm², medida en un cultivo de matraz de control. Después, estas células ancladas se infectaron a una MDI de 0,01 UFP/célula y se incubaron durante 4 días como se ha descrito anteriormente. Para la recogida, el medio se aspiró y las células infectadas se trataron con PBS/EDTA 1 mM. El sobrenadante de medio y las células separadas se centrifugaron durante 5 min a 5.000 x g. El sedimento se lavó con PBS, se resuspendió en tampón Virus Tris/EDTA, pH 8,7 (VTE) que contenía Tris HCl 0,05 M, EDTA 0,5 mM, y se sometió a tres ciclos de congelación/descongelación. Después de la centrifugación durante 5 min a 5.000 x g, se desecharon los residuos celulares. Después, el lisado celular se trató con ultrasonidos a 48 W durante 1 min en un homogeneizador ultrasónico Sonorex Super 10 P (Bandelin, Alemania) y se trató con ADNasa (50 U/ml, Sigma, Alemania) durante 30 min a 37 °C.

25 (C) Purificación de H-1PV

La recogida del virus tratado con ADNasa se aclaró mediante filtración a través de un filtro Sartolab® P20 Plus de 0,2 µm (Sartorius, Alemania). Se usaron dos métodos diferentes para purificar el virus, ya sea dos gradientes escalonados consecutivos, uno con Iodixanol-PBS (IOD-PBS) y otro con Visipaque-Ringer (VIS-Ringer), o un gradiente de densidad de cloruro de cesio seguido de diálisis frente a tampón VTE.

30 (i) Gradientes de densidad de IOD-PBS y VIS-Ringer

Para eliminar proteínas, se realizó una centrifugación por gradiente de densidad escalonada como se describe por Zolotukhin (Zolotukhin et al., 1999). Para esto, se llenaron tubos Quickseal de 25 x 89 mm (Beckmann, Alemania) con 20 ml de suspensión de virus. Esta suspensión se cubrió con cuatro capas de Iodixanol (Alexis Shield, Noruega) en PBS (concentraciones de Iodixanol: 15, 25, 40 y 60 %). La ultracentrifugación se realizó durante 2 h a 4 °C en un rotor 50,2 Ti a 50.000 rpm (Beckmann, L870M, Alemania) que corresponde a una fuerza centrífuga relativa (FCR) de 227.220. Por lo general, se recogieron 3,5 ml de suspensión de virus de la capa de Iodixanol al 40 %. A continuación, se realizó una segunda centrifugación por gradiente de densidad con Visipaque (GE Healthcare, Noruega) diluido en solución de Ringer (B. Braun, Alemania) para una eliminación adicional de proteínas y una separación de partículas completas de partículas vacías. Para esto, se llenaron tubos Quickseal de 25 x 89 mm con suspensión de virus del gradiente de densidad IOD-PBS, diluido al menos 1:2,5 en solución de Ringer. Después se colocaron 5 ml de Visipaque al 25 %, 4 ml de Visipaque al 40 % y 4 ml de Visipaque al 55 % en solución de Ringer. Para la detección de la capa del 40 %, se realizó un gradiente de referencia, donde las fases de Visipaque/Ringer al 25 % y al 55 % se colorearon con rojo fenol. Adicionalmente, la fase del 40 % se etiquetó por fuera en el tubo de muestra. La ultracentrifugación se realizó durante 2 h a 4 °C en un rotor 50,2 Ti a 50.000 rpm. Después se recogieron dos fracciones de la fase del 40 % con una jeringa y una aguja hueca: 2,5 ml de la fracción de partículas completas (banda inferior en la capa del 40 %) y 800 µl de la fracción de partículas vacías (banda superior en la capa del 40 %). El índice de refracción de una muestra de 5 µl se midió con un refractómetro (AR200, Reichert Analytical Instruments, Alemania) y las densidades de las regiones de las que se tomaron las fracciones se calcularon con una tabla de referencia para Iodixanol (AXIS-SHIELD, Noruega).

(ii) Gradiente continuo de Vis-Ringer

55 Para el gradiente continuo de Vis-Ringer, se llenaron tubos Quickseal con suspensión de virus diluida en solución de Ringer a un índice de refracción de 1,3815 (correspondiente de Visipaque al 30 %). La suspensión de virus se cubrió con 0,5 ml de un lecho de Visipaque al 65,2 % y el tubo se llenó completamente con una solución de Visipaque/Ringer al 30 %. La ultracentrifugación se realizó durante 10 h a 4 °C en un rotor 70,1 Ti a 63.000 rpm. Se recogieron fracciones de aproximadamente 500 µl del fondo con goteo controlado.

60 (iii) Gradiente de densidad de cloruro de cesio y ensayo de hemaglutinación

Se estableció un gradiente de densidad de CsCl como se ha descrito anteriormente (Paradiso, 1981). Para esto, se llenaron tubos de centrifuga de polialómero de 14 x 95 mm (Beckmann, Alemania) con 5 ml de CsCl a 1,4 g/cm³ de densidad y se cubrieron con 1 ml de sacarosa 1 M seguido de 5 ml de suspensión de virus. La ultracentrifugación se realizó a 15 °C durante al menos 20 h a 39.000 rpm en un rotor SW41. Se recogieron diferentes fracciones del fondo

(fr n.º 1: 500 µl, fr n.º 2: 300 µl, fr n.º 3-20: 200 µl) y se midió el contenido de la cápside (partícula física, PP) por medio del nuevo ELISA (Cápside-ELISA) que se describe en el presente documento o mediante ensayo de hemaglutinación. Para la detección de unidades de hemaglutinación (Kongsvik y Toolan, 1972), las fracciones se diluyeron 1:25 en PBS y se diluyeron adicionalmente en serie 1:2 en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania).
 5 A continuación, se añadieron 25 µl de una suspensión al 2 % de glóbulos rojos de cobaya (Charles River Laboratories, Alemania) en PBS. La placa se incubó durante 1 h a 4 °C y el título se leyó como la dilución más alta a la que se completó la hemaglutinación. Se midió el índice de refracción y se calculó la densidad de acuerdo con una tabla de referencia para CsCl (Griffith, 2006). Se agruparon fracciones que contenían cápsides completas o vacías y se dializaron directamente frente a 1.000 volúmenes de tampón VTE durante aproximadamente 30 min a temperatura
 10 ambiente. A esto le siguieron tres ciclos de diálisis a 4 °C para eliminar el CsCl tóxico.

(D) Inactivación UV del grupo de partículas vacías

15 Para la inactivación de partículas infecciosas residuales en el conjunto de partículas vacías, se colocaron 500 µl de fracción de partículas vacías en el centro de un plato de 6 cm (Greiner Bio-One, Alemania) debajo de una campana de flujo laminar estéril. Se usó una lámpara UV (Tipo NU-4, Herolab, Alemania) que emitía a 254 nm para irradiar la muestra a 0,5 mW/cm², medida con un radiómetro (VLX-3W, Benda, Alemania). La muestra se irradió 4 veces durante 2 min con intervalos de 5 min sin UV.

(E) Cuantificación y caracterización del virus

(i) Ensayo de formación de placa

25 Los ensayos de placa se realizaron esencialmente como describieron Tattersall y Bratton, 1983. Se cultivaron células NB-324K en cultivos de monocapa en medio MEM que contenía FBS al 5 %, penicilina 100 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM. Se infectaron al 60 % de confluencia con diluciones en serie de H-1PV y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después, el inóculo se reemplazó con una capa de bacto-agar (al 1,7 % en MEM que contenía FBS al 5 %). El día cuatro después de la infección, las células vivas se tiñeron durante 18-24 h mediante la adición de una solución de tinción con rojo de tolúileno al 0,02 % (Sigma, Alemania) que contenía bacto-agar (Becton Dickinson, Alemania). Los platos se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las unidades formadoras de placas se contaron 5 días
 30 después de la infección en una caja de luz y su concentración se expresó en UFP/ml.

(ii) Ensayo de hibridación de ADN para H-1PV infeccioso

35 Se sembraron células NB-324K (7,6 x 10³ células/pocillo) en una placa de 96 pocillos 24 h antes de la infección con H-1PV. Se infectaron con diluciones en serie con factor de dilución 10 de H-1PV y se incubaron durante 72 h a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de congelar a -80 °C y de lisis alcalina (NaOH 1,5 M), su ADN se transfirió a una membrana de nylon, se entrecruzó con un agente de Entrecruzamiento Ultravioleta CL-1000 (UVP, EE.UU.) y se hibridó con una sonda radiomarcada con ³²P específica de NS1 antes de la autorradiografía. La titulación del virus se realizó por
 40 duplicado y el título se expresó en unidades infecciosas (UI) por ml (Lacroix et al., 2010).

(iii) Determinación de partículas víricas que contienen genoma

45 El número de partículas víricas que contienen genoma (GP, por sus siglas en inglés) se determinó mediante Q-PCR, esencialmente como se ha descrito anteriormente (Lacroix et al., 2010). Cada pocillo recibió 20 µl de mezcla de reacción que contenía 1x Premix Ex Taq™ (TaKaRa, Francia), sonda NS1-TaqMan™ marcada 0,3 µM, cada cebador a 0,3 µM y 3 µl de molde. La Q-PCR se ejecutó en un sistema de detección de secuencia Abi Prism 7900 HT y los resultados se procesaron con el software SDS 2.1 (Applied Biosystems, Alemania).

(iv) Cápside-ELISA de H-1PV

50 Se desarrolló un ELISA para la detección de cápsides (completas o vacías, en lo sucesivo en el presente documento denominadas "partículas físicas" o PP). Se recubrió una placa flexible de 96 pocillos de fondo en U (BD Falcon, NJ) durante la noche a 4 °C con 100 µl de anticuerpo monoclonal BL-H1 a 2 ng/µl en PBS. El desarrollo de este anticuerpo (Leuchs et al., 2010) se describe a continuación. Se retiró la solución de recubrimiento, se añadieron 200 µl de tampón de bloqueo (caseína 2 mg/ml (Sigma, Alemania) y Tween 20 al 0,05 % (Sigma, Alemania) en PBS) a cada pocillo y la
 55 mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. Se aspiró el tampón de bloqueo y los pocillos se lavaron con PBS, Tween 20 al 0,05 %, después de lo cual el control positivo, el control negativo, la muestra y las diluciones en serie de patrón de H-1PV (todas ellas en tampón PBS) se sembraron en placas por duplicado a 100 µl/pocillo. La placa se incubó durante 1 h a 37 °C. La mezcla de reacción se aspiró y los pocillos se lavaron. A continuación, se añadieron 100 µl de mAb BL-H1 marcado con peroxidasa de rábano picante (0,1 µg/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las muestras se aspiraron y los pocillos se lavaron con PBS, Tween 20 al 0,05 %. Después de la adición de 100 µl de
 60 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma, Alemania) a cada pocillo, la placa se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 1 M por pocillo. La absorbancia de la muestra se midió a 450 nm con un Lector de Placas Ascent Multiscan (Thermo Fisher Scientific, Alemania).

(v) Ensayo de ácido bicinconínico (BCA) y de Bradford

La concentración de proteína se determinó con el kit de ensayo de proteínas Pierce® BCA 23227 (Pierce, EE.UU.) en el intervalo de trabajo de 5-250 µg/ml. La concentración de proteína se determinó con un patrón de albúmina sérica bovina (BSA) y se midió con Nanodrop 2000. El Ensayo de Bradford se realizó en una placa de 96 pocillos en el intervalo de trabajo de 50-2000 µg/ml, con BSA como patrón (Sigma, Alemania).

(vi) SDS-PAGE, tinción con plata y transferencia Western

Para evaluar la pureza de las preparaciones de virus, se realizó una SDS-PAGE al 10 % (SERVA Electrophoresis, Alemania), seguida de tinción con plata (Invitrogen, CA) y transferencia Western. Para la detección de proteína de la cápside vírica (VP), se usó anticuerpo anti-VP de conejo policlonal (αVP) (proporcionado por C. Dinsart, DKFZ, Heidelberg) y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Análisis por Transferencia Western Amersham™ ECL).

(vii) Medición de ADN

El ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro Nanodrop. El ADN genómico humano en las preparaciones de virus se cuantificó mediante Q-PCR con el kit de cuantificación de ADN humano Quantifiler® (Applied Biosystems, Alemania) para la detección de h-*TERT* (transcriptasa inversa de telomerasa humana), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de 26 ng/ml y el tamaño del amplicón fue de 62 pb. Como control positivo, se usó ADN genómico de células NB-324K.

(viii) Endotoxinas y esterilidad

La contaminación por endotoxinas se sometió a ensayo con el Ensayo de Lisado de Amebocitos *Limulus* Endosafe® Gel-Clot (Charles River Laboratories, Alemania). La sensibilidad del ensayo fue de 0,25 unidades de endotoxinas (UE) por mililitro. En cada preparación de H-1PV se verificó la ausencia de contaminación bacteriana o fúngica incubando 2,5 µl de la preparación en agar de soja/peptona durante 5 días a 37 °C.

(ix) Microscopía electrónica

Para el análisis cualitativo de las preparaciones de virus, se tomaron imágenes de microscopía electrónica. Para esto, se añadieron 5 µl de suspensión de virus a una rejilla de cobre recubierta de carbono lista para usar y se incubaron durante 2 min. Después, la rejilla se lavó con 5 µl de agua bidestilada y se recubrió con acetato de uranilo al 2 % durante 30 s. Las gotas se absorbieron de la rejilla con papel de filtro Whatman 50 y la rejilla se secó durante aproximadamente 1 min. Las fotos se tomaron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss con un aumento de 20.100 x.

(F) Desarrollo y caracterización del anticuerpo monoclonal BL-H-1

Para generar un anticuerpo monoclonal contra las cápsides H-1PV (PP), se inmunizaron ratones Balb/c (Charles River, Alemania) por vía intraperitoneal, 3 veces durante un período de 3 meses, con $1,2 \times 10^8$ UFP cada vez. Una semana después de la última inyección de H-1PV, se les extrajo el bazo y las células del bazo se fusionaron con células de linfoma X63/Ag8 (Kuck et al., 2007; Wobus et al., 2000). Las células de hibridoma se propagaron y los sobrenadantes de un solo clon se seleccionaron mediante transferencia puntual western contra H-1PV. Los pocillos positivos se seleccionaron mediante análisis de colonias únicas y después de tres rondas de selección, las células de hibridoma seleccionadas se usaron para producir anticuerpos BL-H1 en un biorreactor CELLLine 1000 (Integra Biosciences AG, Suiza).

Se usó medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 %, penicilina 100 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, Hepes 20 mM pH 7,2 para cultivar las células de hibridoma. La subclase del anticuerpo BL-H1 se determinó con el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón Amersham (Braunschweig, Alemania). Se realizó una purificación con el kit de columna de afinidad HiTrap™ Protein A HP (GE Healthcare, Suecia) y el sistema Äkta prime (GE Healthcare, Alemania). La concentración de IgG_{2a} se determinó con el Kit de ELISA de IgG_{2a} de ratón (BD Biosciences, Alemania).

(i) Análisis de H-1PV mediante transferencia puntual Western

Se transfirieron H-1PV purificado (1×10^8 UFP/punto) o fracciones de gradiente de densidad de sacarosa (diluido 1:10 en 100 µl de PBS) a una membrana de nitrocelulosa (AppliChem, Alemania) con un transferidor de vacío. Las etapas de lavado se realizaron con PBS y Tween 20 al 0,05 %. La membrana se bloqueó durante 1 h con PBS que contenía leche desnatada en polvo al 5 %. Para la detección de hibridoma, se incubaron 40 µl de sobrenadante de hibridoma sin diluir durante al menos 3 h. Para el análisis de gradiente de sacarosa, se usó mAb BL-H1 purificado (1:1.000) o anticuerpo αVP (diluido 1:500). Después, la membrana se lavó durante 30 min a TA y se incubó con un anticuerpo anti-ratón secundario de cabra acoplado a peroxidasa (GE Healthcare, Alemania) o un anticuerpo anti-conejo de cabra

(GE Healthcare, Alemania) en PBS. La detección se realizó con ECL Plus e Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences GmbH, Alemania).

5 (ii) Fraccionamiento del gradiente de densidad de sacarosa de proteínas de cápsides víricas ensambladas y no ensambladas

10 Se preparó extracto de células 293T (CRL-11268, American Tissue Culture Collection) transfectadas con un clon molecular de H-1PV infeccioso (Kestler et al., 1999) y recogido 72 h después de la transfección. Se transfirió un ml de extracto a un gradiente lineal de sacarosa al 10-50 %. La centrifugación se realizó a 4 °C durante 3,3 h a 28.000 rpm en un rotor TST 41.14 (Kontron). Se recogieron fracciones (400 µl) y se analizaron mediante transferencia Western y ensayo de hemaglutinación. Las fracciones también se analizaron para determinar la infectividad y las partículas que contenían genoma.

15 Ejemplo 2

Caracterización de H1-PV

20 Uno de los objetivos de la presente invención era normalizar el procedimiento de fabricación de H-1PV. Esto implicó caracterizar cada etapa del proceso corriente arriba y corriente abajo, garantizando la reproducibilidad y caracterizando completamente la identidad, pureza y seguridad del producto final con el fin de establecer procedimientos operativos de referencia.

25 Se sometieron a ensayo dos métodos alternativos de preparación de células e infección corriente arriba del proceso de producción central. También se compararon dos pistas de purificación diferentes corrientes abajo de la producción central. La Tabla 1 resume los ensayos utilizados para caracterizar las etapas intermedias en el procedimiento de producción y el producto final como se describe a continuación. Para cuantificar las partículas físicas de manera más conveniente, fue necesario establecer un nuevo ensayo, que se describe a continuación.

30 Tabla 1
Ensayos utilizados para la caracterización cuantitativa y cualitativa de soluciones madre de H-1PV

Ensayo	Tipo de caracterización	Unidad
Ensayo de formación de placa	Ensayo biológico para la multiplicación y propagación de virus. Títulos de virus expresados en unidades formadoras de placa	UFP/ml
Ensayo de hibridación de ADN para infectividad	Ensayo <i>in situ</i> para infección de virus y replicación de ADN. Títulos de virus expresados en unidades infecciosas	UI/ml
Cuantificación del genoma vírico mediante PCR en tiempo real (Q-PCR)	Caracterización física para determinar la presencia de genoma que contiene partículas víricas	GP/ml
Cápside-ELISA	Determinación física de partículas víricas ensambladas, expresadas en partículas físicas	PP/ml
Ensayo de hemaglutinación	Caracterización física para determinar la aglutinación de eritrocitos de cobaya mediada por virus. Título de virus expresado en unidades de hemaglutinación	HAU/ml
Medición del índice de refracción	Determinación física de la densidad a partir del índice de refracción (IR)	mg/cm ³
Ensayo de ácido bicinonínico y de Bradford	Cuantificación colorimétrica de proteínas	µg de proteína/ml
SDS-PAGE y transferencia Western	Determinación de la pureza e identidad de proteínas víricas	-
Q-PCR con h- <i>TERT</i> Quantifiler	Cuantificación de ADN genómico celular	ng de ADN/ml
Medición A ₂₆₀	Determinación espectrométrica de ADN	ng de ADN/ml
Microscopía electrónica	Visualización ultraestructural de soluciones madre de virus	-

(continuación)

Ensayo	Tipo de caracterización	Unidad
Ensayo LAL	Determinación de unidades de endotoxinas	UE/ml
Ensayo de esterilidad	Determinación de unidades formadoras de colonias de bacterias y hongos en placas de agar de soja/peptona	UFC/ml

Dos objetivos de este estudio fueron separar las partículas completas de las vacías y determinar la relación de partículas con respecto a infectividad del producto final. La determinación de esta relación, que debería influir tanto en la eficacia terapéutica del tratamiento parvovírico como en la respuesta inmunitaria esperada, requiere determinar el número total de partículas físicas (Rajendran et al.). Para desarrollar un método conveniente para cuantificar PP, los inventores generaron un anticuerpo monoclonal contra H-1PV, que reconoce las cápsides nativas pero no reconoce las proteínas de la cápside no ensambladas o las cápsides desnaturalizadas. Este anticuerpo, denominado BL-H1, es de tipo IgG_{2a}. Su especificidad se ilustra en la Figura 1, que muestra los resultados de diversos análisis realizados en las fracciones obtenidas después de la centrifugación por densidad de sacarosa de extractos de células 293T transfectadas con un clon molecular de H-1PV infeccioso. En las transferencias puntuales western, las únicas fracciones que proporcionaron una señal tanto con el antisuero αVP (que reconoce predominantemente las proteínas de la cápside no ensambladas) como con el mAb BL-H1 fueron las fracciones 9 a 18. Se descubrió que estas fracciones contenían cápsides ensambladas, como se demostró midiendo la hemaglutinación, GP e IU. BL-H1 no reaccionó con las fracciones 3 a 8, que contenían proteínas de la cápside no ensambladas o parcialmente ensambladas. Las fracciones 9 a 19 incluían partículas vacías y que contenían genoma, y las partículas infecciosas se concentraron en las fracciones 12 a 19. Cabe señalar que, aunque las señales de hemaglutinación y BL-H1 se limitaron a la misma región de los gradientes, el último pico se desplazó hacia densidades más altas. Además, se descubrió que BL-H1 no reaccionaba con las proteínas de la cápside desnaturalizadas y no mostraba reacción cruzada con las cápsides del virus diminuto protoparvovirus estrechamente relacionado del ratón (datos no mostrados).

Ejemplo 3

ELISA para la cuantificación de la cápside de H-1PV

Para cuantificar las partículas físicas a lo largo de la producción de H-1PV, los inventores desarrollaron un "Cápside-ELISA" usando mAb BL-H1. Para normalizar el ELISA, se mezcló H-1PV con diluciones apropiadas de una solución madre de adenovirus de tipo 5 (Ad5, American Type Culture Collection) de título conocido y las mezclas se visualizaron mediante microscopía electrónica. En 8 imágenes elegidas al azar, se contaron las partículas H-1PV y Ad5 y se determinó el número de partículas de H-1PV con respecto al título de Ad5 conocido. El ELISA mostró una relación lineal reproducible entre el número de PP (en el intervalo de $2,5 \times 10^9$ a $3,9 \times 10^7$ PP) y la absorbancia a 450 nm (Fig. 2). Se usaron dos de las diluciones sometidas a ensayo, QC-L (carga de viriones baja) y QC-M (carga de viriones media) como controles de calidad en ensayos posteriores. Cuando se usó centrifugación por gradiente de densidad de CsCl para separar las cápsides de H-1PV vacías de las completas, este ELISA permitió la cuantificación de ambas. Esto se ilustra en la Fig. 3, que muestra la distribución de las cápsides (determinada mediante la presente Cápside-ELISA y mediante ensayo de hemaglutinación) y la de las partículas que contenían genoma después de la centrifugación. Los dos métodos para detectar partículas físicas proporcionaron perfiles superponibles, con un pico mayor para cápsides vacías y dos menores para cápsides completas. La detección por PCR de cápsides que contenían ADN análogamente reveló dos grupos de densidad (fracciones 4-6 y fracciones 7-10). Aunque las partículas de densidad intermedia pueden consistir en partículas interferentes defectuosas (Faust y Ward, 1979), su naturaleza no se analizó adicionalmente. No obstante, los resultados de los presentes inventores muestran claramente que el ELISA desarrollado es adecuado para la detección de rutina de partículas físicas.

Ejemplo 4

Producción a gran escala de H-1PV

(A) Optimización de la siembra e infección celulares

En primer lugar, los inventores optimizaron la densidad celular en el momento de la infección, la MDI y el momento de la recogida. Los mayores rendimientos de virus se obtuvieron con una densidad celular de $3,6 \times 10^4$ células/cm², una MDI de 1×10^{-2} UFP/célula y recogiendo 4 días después de la infección, con un ECP de aproximadamente el 30 % (datos no mostrados). Estas condiciones se usaron posteriormente en todos los experimentos de producción, siendo la única diferencia que algunas células se cultivaron en matraces Y de 175 cm², se recogieron, se transfirieron a una CS y se infectaron inmediatamente, mientras que a otras se les permitió crecer en la CS durante tres días antes de la infección.

La Tabla 2a muestra que las células infectadas y sembradas simultáneamente y las células a las que se les permitió crecer durante tres días en la CS antes de la infección no diferían significativamente en cuanto a la producción de virus por célula infectada o la liberación de virus en el sobrenadante por célula infectada. En ambos casos, se produjeron aproximadamente 1×10^3 UFP por célula infectada, lo que corresponde a un rendimiento promedio de 2 x

10¹¹ UFP por CellSTACK® de 10 capas. Las concentraciones de proteínas en las recogidas de virus obtenidas también fueron similares para los dos procedimientos (2 x 10³ µg/ml), lo que indica que los dos cultivos alcanzaron la misma densidad en el momento de la recogida. Como la infección tres días después de la siembra ahorró tiempo de trabajo y material en comparación con la siembra e infección simultáneas, se adoptó el primer enfoque. El sobrenadante del medio de cultivo contenía solo el 10 % de las UFP totales, a una concentración relativamente baja (aproximadamente 10⁷ UFP/ml). Como concentrar el sobrenadante era laborioso, lento e ineficiente, esta fracción se desechó en las producciones de rutina.

Tabla 2a

Recuperaciones de partículas infecciosas después de dos procedimientos diferentes de siembra/infección			
	Procedimiento de siembra/infección	UFP/célula infectada	µg/ml de proteína
Extracto celular	3 días en CS antes de la infección	1,1 ± 1,8E+03	2,0 ± 0,9E+03
	siembra e infección simultáneas	0,8 ± 0,4E+03	1,7 ± 0,4E+03
Sobrenadante de medio	3 días en CS antes de la infección	0,1 ± 0,2E+03	0,8 ± 0,4E+03
	siembra e infección simultáneas	0,5 ± 0,4E+03	0,9 ± 0,4E+03

Medias con desviaciones típicas de las concentraciones de partículas infecciosas proteínas en las recogidas de virus. Se calcularon concentraciones en extractos celulares (20 ml/CS) y sobrenadantes de medio (1000 ml/CS) a partir de 5 o más producciones independientes.

(B) Reproducibilidad del proceso corriente arriba normalizado y rendimientos de H-1PV

Como se muestra en la Figura 4, el rendimiento de viriones de H-1PV fue altamente reproducible en cinco producciones independientes. La relación de partículas con respecto a infectividad (PP/UFP) y la proporción de partículas que contenían genoma (PP/GP) también fueron similares entre estas producciones. La relación de UFP con respecto a GP a PP fue de 1:7 x 10²:5 x 10³. Por tanto, parecía que en promedio una célula indicadora tenía que infectarse con 7 x 10² viriones que contenían genoma para experimentar una infección productiva. Aproximadamente el 14 % de los viriones totales contenían un genoma encapsulado.

Ejemplo 5

Purificación de H-1PV

(A) Digestión con ADNasa y aclaramiento de las recogidas de H-1PV

Las recogidas de virus sin procesar se trataron con ADNasa para digerir ADN vírico no encapsulado y de células hospedadoras, y después se aclararon mediante filtración a través de un filtro Sartolab® P20 Plus. Los resultados obtenidos para cinco lotes individuales mostraron la importancia de estas etapas. Según se midió con el kit de cuantificación de ADN humano, el 99,8 % del ADN de la célula hospedadora se retiró mediante tratamiento con ADNasa. Sin embargo, solo se eliminó el 37 % del ADN total, determinado mediante medición de A_{260nm}. El ADN residual podría ser genomas víricos protegidos y/o fragmentos de ADN celular más pequeños que los amplicones h-TERT (62 pb) utilizados para la detección de ADN. Como se ilustra en la Fig. 8a, la etapa de filtración eliminó el 24 % de las proteínas de la célula hospedadora y derivadas de FBS. Más del 80 % de los viriones infecciosos y el 100 % de las partículas físicas se recuperaron después del aclaramiento (Tabla 2b). En conclusión, esta primera etapa de purificación es rápida y elimina cantidades significativas de ADN y proteínas extraños.

Tabla 2b

Rendimientos de la recogida de virus (extractos celulares) y recuperaciones después del aclaramiento			
	Recogida de virus	Después del aclaramiento	% de Recuperación
UFP/ml	7,2 ± 6,4E+09	5,8 ± 6,1E+09	81
GP/ml	4,8 ± 2,7E+12	6,1 ± 3,4E+12	127
PP/ml	1,7 ± 0,8E+13	1,9 ± 1,3E+13	111
µg de proteína/ml	2,1 ± 0,9E+03	1,6 ± 0,4E+03	76

Se disolvió el virus recuperado de una CS de 10 capas en 20 ml de VTE y se determinaron UFP, GP y PP. La concentración de proteínas se cuantificó mediante ensayo colorimétrico. Se muestran medias con desviaciones típicas para 5 producciones independientes. La recuperación se calculó después del aclaramiento de la recogida del virus mediante filtración de 0,2 µm.

(B) Separación de las partículas completas de las vacías

Para separar las partículas de H-1PV completas de las vacías, se compararon dos procedimientos de centrifugación por gradiente. Se obtuvieron resultados similares con cinco recogidas individuales de H-1PV de dos cultivos de CS de 10 capas. Después del aclaramiento, cada recogida se dividió en dos partes iguales, una de las cuales se purificó

mediante dos gradientes escalonados consecutivos: IOD-PBS y VIS-Ringer, siendo las formulaciones de Ringer y Visipaque de esta última muy adecuadas para la inyección en seres humanos. Como se describe en *Materiales y métodos*, se recogieron dos fracciones, la fracción de partículas completas (banda inferior en la fase del 40 %) con una densidad aproximada de 1,25 g/ml y la fracción de partículas vacías (banda superior en la fase del 40 %) con una densidad aproximada de 1,23 g/ml. Como se muestra en la Figura 5a, el título medio de partículas infecciosas en la fracción de partículas completas fue de $1,3 \times 10^{10}$ UFP/ml, mientras que las concentraciones de GP y PP fueron respectivamente de $9,2 \times 10^{12}$ GP/ml y $1,7 \times 10^{13}$ PP/ml. Los títulos en la fracción de partículas vacías fueron de $6,3 \times 10^9$ UFP/ml, $4,6 \times 10^{12}$ GP/ml y $3,9 \times 10^{13}$ PP/ml.

Tabla 2c

Fracción de partículas vacías después de la centrifugación por gradiente de Visipaque/Ringer	
Título ^a	fracción de partículas vacías ^b
PP/ml	$3,9E+13 \pm 2,9E+13$
GP/ml	$4,6E+12 \pm 3,1E+12$
UFP/ml	$6,3E+09 \pm 5,8E+09$
PP/UFP	$6,1E+03 \pm 6,5E+03$

^aPP, partículas físicas; GP, partículas que contienen genoma; UFP, unidades formadoras de placa
^bDespués de la centrifugación por gradiente de Visipaque/Ringer

Como alternativa para obtener partículas vacías, la segunda mitad de la recogida del virus se fraccionó en un gradiente continuo de densidad de CsCl seguido de diálisis contra VTE. Como se muestra en la Figura 5b, la fracción de partículas vacías mostró una concentración de partículas ligeramente más alta ($1,1 \times 10^{14}$ PP/ml) y todavía contenía virus infecciosos residuales ($1,8 \times 10^9$ UFP/ml, $1,2 \times 10^{12}$ GP/ml). Las partículas infecciosas en la fracción de partículas completas tenían un título de UFP comparable al obtenido después de las centrifugaciones por gradiente de IOD-PBS y VIS-Ringer ($1,0 \times 10^{10}$ UFP/ml), mientras que la contaminación por partículas vacías se redujo ligeramente ($1,4 \times 10^{13}$ PP/ml). Ambos métodos mostraron buena reproducibilidad.

(C) Recuperación y enriquecimiento en partículas infecciosas de H-1PV

Como se muestra en la Figura 6a, la centrifugación por gradiente de densidad de IOD-PBS condujo a una pérdida significativa de partículas infecciosas (46 %). La pérdida adicional en la siguiente etapa de gradiente de VIS-Ringer fue insignificante. Cabe destacar que las centrifugaciones combinadas de gradiente de Iodixanol condujeron a la eliminación de más del 90 % de la proteína total de la fracción infecciosa de virus. La etapa de IOD-PBS dio como resultado un aumento de 15,4 veces en la actividad específica y la etapa de VIS-Ringer dio como resultado un aumento adicional de 5,9 veces. Por tanto, se consiguió un aumento global de 91 veces en la actividad específica, a 3×10^{11} UFP/mg de proteína, a través de este proceso de purificación. Por otro lado, la purificación del gradiente de densidad de CsCl condujo a una pérdida ligeramente mayor de partículas infecciosas (57 %) pero también a una eliminación de proteínas más eficiente, dando como resultado un aumento de 227 veces en la actividad específica. La relación resultante de partículas con respecto a infectividad (PP/UFP) fue cercana a $10^3 : 1$ después de ambos métodos de purificación.

(D) Recuperación de partículas vacías

Como se muestra en la Figura 6b, la recuperación de partículas físicas en la fracción de partículas vacías fue mayor después de la purificación por gradiente de densidad de CsCl (78 % del PP total de la recogida de virus aclarado) que después de las centrifugaciones por gradiente de densidad de IOD-PBS y VIS-Ringer (7 %). Además, la fracción de partículas vacías de VIS-Ringer contenía una proporción relativamente alta de GP (relación de GP con respecto a PP: 1 : 10) y UFP (relación de UFP con respecto a PP: 1 : 10^4) en comparación con la fracción de partículas vacías de CsCl (relación de GP con respecto a PP: 1 : 10^2 ; relación de UFP con respecto a PP: 1 : 10^5). Esto conduce a los presentes inventores a recomendar la centrifugación por gradiente de densidad de CsCl para la preparación de cápsidas vacías. La concentración de cápsida de la fracción de partículas vacías de CsCl fue de aproximadamente $1,4 \times 10^{14}$ PP/mg de proteína.

(E) Concentración de H-1PV mediante centrifugación continua por gradiente de VIS-Ringer

El título de partículas infecciosas en lotes de virus obtenidos mediante los métodos de purificación de IOD-PBS/VIS-Ringer y CsCl mencionados anteriormente fue de aproximadamente 1×10^{10} UFP/ml. Puesto que se requiere un título más alto para algunas aplicaciones, los presentes inventores intentaron reemplazar el gradiente escalonado de VIS-Ringer con un gradiente continuo. Esto permitió a los presentes inventores conseguir un título de 3×10^{11} UFP/ml (Fig. 7).

Ejemplo 6

Partículas vacías inactivadas

En la fracción de partículas vacías obtenida después del fraccionamiento con CsCl, todavía se podían detectar virus infecciosos (relación de UFP con respecto a PP: 1 : 10⁵). Para permitir el uso de partículas vacías como control no infeccioso, fue necesario desarrollar un método de inactivación que eliminase la infectividad del virus sin alterar la estructura de la cápside. Esto se consiguió mediante irradiación UV (Tabla 3). Aunque la irradiación UV no cambió el título de PP, redujo el título de GP medido en un 90 %. Esto probablemente se deba a la interferencia del daño del ADN inducido en los genomas víricos con su titulación mediante Q-PCR. Cabe destacar que, la irradiación UV redujo la infectividad del virus en más de 7 logs, con una infectividad residual tan baja como de 1 UFP por 7 x 10¹¹ PP. Esto permitió usar preparaciones purificadas de partículas vacías irradiadas con UV como controles no infecciosos en estudios preclínicos de los efectos oncolíticos de H-1PV (Kiprianova et al., 2011).

Tabla 3

Efecto de la irradiación UV sobre la contaminación de la fracción de partículas vacías por viriones infecciosos		
Título ^a	Fracción de partícula vacía ^b	Fracción de partícula vacía inactivada por UV ^c
PP/ml	1,1 ± 0,7E+14	1,1 ± 0,7E+14
GP/ml	1,2 ± 1,0E+12	9,0 ± 5,1E+10
UFP/ml	1,8 ± 3,0E+09	1,6 ± 0,8E+02
PP/UFP	4,6 ± 4,3E+05	6,9 ± 4,9E+11

^aPP, partículas físicas; GP, partículas que contienen genoma; UFP, unidades formadoras de placa
^bDespués de la centrifugación por gradiente de CsCl (véase la Fig. 6b)
^c254 nm, 0,5 mW/cm², muestras irradiadas 4 veces durante 2 min a intervalos de 5 min

Ejemplo 7

Pureza de las preparaciones de H-1PV

Las preparaciones de H-1PV se analizaron para detectar la contaminación por proteínas y ADN, la presencia de endotoxinas y la esterilidad. Se analizaron proteínas de diferentes etapas y fracciones de gradiente en el proceso de purificación mediante SDS-PAGE y se revelaron mediante tinción con plata. Como se ilustra en la Figura 8a, se detectaron los polipéptidos víricos esperados VP1, VP2 y VP3. Las cantidades de impurezas restantes después del fraccionamiento por gradiente de densidad fueron bajas o indetectables. Los dos métodos de purificación fueron igualmente eficaces. Cabe señalar que las partículas vacías purificadas con CsCl carecían de VP3, en consonancia con el hecho de que las cápsides vacías no lograron la escisión de VP2 a VP3 (Paradiso et al., 1984; Tattersall et al., 1976). No se observó degradación significativa de la proteína de la cápside después de la irradiación UV. El análisis por transferencia Western confirmó la identidad de las bandas de polipéptidos VP (Fig. 8b). No se observó diferencia ultraestructural entre las cápsides irradiadas con UV y no irradiadas con UV mediante microscopía electrónica (Fig. 8c, d). Los lotes purificados de cápsides completas contenían menos de 2,5 UE/ml, cualquiera que sea el método de purificación, mientras que los lotes de partículas vacías e inactivadas contenían menos de 25 UE/ml, compatible con el uso de preparaciones de H-1PV en modelos animales con el límite de la administración de alimentos y fármacos de los EE.UU. de 5 UE/kg de peso corporal (Malyala y Singh, 2008). Todas las preparaciones resultaron ser estériles.

Lista de referencias

Angelova, A.L., Aprahamian, M., Balboni, G., Delecluse, H.J., Feederle, R., Kiprianova, I., Grekova, S.P., Galabov, A.S., Witzens-Harig, M., Ho, A.D., Rommelaere, J. y Raykov, Z., 2009a. *Oncolytic rat parvovirus H-1PV, a candidate for the treatment of human lymphoma: In vitro and in vivo studies. Molecular therapy; The journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1164-72.

Angelova, A.L., Aprahamian, M., Grekova, S.P., Hajri, A., Leuchs, B., Giese, N.A., Dinsart, C., Herrmann, A., Balboni, G., Rommelaere, J. y Raykov, Z., 2009b. *Improvement of Gemcitabine-Based Therapy of Pancreatic Carcinoma by Means of Oncolytic Parvovirus H-1PV. Clinical Cancer Research* 15, 511-519.

Bhat, R. y Rommelaere, J., *NK-cell-dependent killing of colon carcinoma cells is mediated by natural cytotoxicity receptors (NCRs) and stimulated by parvovirus infection of target cells, BMC Cancer, BIOMED CENTRAL*, Vol. 13, N.º 1, 2013, 367 y siguientes.

Burnett, E., Cotmore, S.F. y Tattersall, P., 2006. *Segregation of a single outboard left-end origin is essential for the viability of parvovirus minute virus of mice. J Virol* 80, 10879-83.

Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D. y Davison, A.J., 2014. *The family Parvoviridae. Archives of virology* 159, 1239-47.

Dupressoir, T., Vanacker, J.M., Cornelis, J.J., Duponchel, N. y Rommelaere, J., 1989. *Inhibition by parvovirus H-1*

of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer research* 49, 3203-8.

- 5 Faisst, S., Faisst, S.R., Dupressoir, T., Plaza, S., Pujol, A., Jauniaux, J.C., Rhode, S.L. y Rommelaere, J., 1995. *Isolation of a Fully Infectious Variant of Parvovirus H-1 Supplanting the Standard Strain in Human-Cells. Journal of Virology* 69, 4538-4543.
- 10 Faisst, S., Guittard, D., Benner, A., Cesbron, J.Y., Schlehofer, J.R., Rommelaere, J. y Dupressoir, T., 1998. *Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. International journal of cancer. Journal international du cancer* 75, 584-9.
- 15 Faust, E.A. y Ward, D.C., 1979. *Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication. J Virol* 32, 276-92.
- 20 Gao, K., Mengxin, L., Li, Z., Qin, S., Jia, L., Shaoyong, L., Ran, H., Yu, Z., Gregory, H., Junzhi, W. y Guangping, G., 2014. *Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side effects. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 1.
- 25 Geletneky, K., Huesing, J., Rommelaere, J., Schlehofer, J.R., Leuchs, B., Dahm, M., Krebs, O., von Knebel Doeberitz, M., Huber, B. y Hajda, J., 2012. *Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. BMC cancer* 12, 99.
- 30 Geletneky, K., Kiprianova, I., Ayache, A., Koch, R., Herrero, Y.C.M., Deleu, L., Sommer, C., Thomas, N., Rommelaere, J. y Schlehofer, J.R., 2010. *Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. Neuro-oncology* 12, 804-14. Grekova, S.P., Aprahamian, M., Daeffler, L., Leuchs, B., Angelova, A., Giese, T., Galabov, A., Heller, A., Giese, N.A., Rommelaere, J. y Raykov, Z., 2011. *Interferon gamma improves the vaccination potential of oncolytic parvovirus H-1PV for the treatment of peritoneal carcinomatosis in pancreatic cancer. Cancer biology & therapy* 12, 888-95.
- 35 Griffith, O.M., 2006. *Practical Techniques for centrifugal separations. FiberLite*, Piramon Technologies, Inc.
- 40 Halder, S., Nam, H.J., Govindasamy, L., Vogel, M., Dinsart, C., Salome, N., McKenna, R. y Agbandje-McKenna, M., 2012. *Production, purification, crystallization and structure determination of H-1 Parvovirus. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 68, 1571-6.
- 45 Hanson, N.D. y Rhode, S.L., 3ª, 1991. *Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. J Virol* 65, 4325-33.
- 50 Hundt, B., Best, C., Schlawin, N., Kassner, H., Genzel, Y. y Reichl, U., 2007. *Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave Bioreactor microcarrier culture in 1-10 L scale. Vaccine* 25, 3987-95.
- 55 Kestler, J., Neeb, B., Struyf, S., Van Damme, J., Cotmore, S.F., D'Abramo, A., Tattersall, P., Rommelaere, J., Dinsart, C. y Cornelis, J.J., 1999. *cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. Human Gene Therapy* 10, 1619-1632.
- 60 Kiprianova, I., Thomas, N., Ayache, A., Fischer, M., Leuchs, B., Klein, M., Rommelaere, J. y Schlehofer, J.R., 2011. *Regression of Glioma in Rat Models by Intranasal Application of Parvovirus H-1. Clinical Cancer Research* 17, 5333-5342.
- 65 Kongsvik, J.R. y Toolan, H.W., 1972. *Effect of proteolytic enzymes on the hemagglutinating property of the parvoviruses, H-1, H-3, and RV. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 140, 140-4.
- 70 Kuck, D., Kern, A. y Kleinschmidt, J.A., 2007. *Development of AAV serotype-specific ELISAs using novel monoclonal antibodies. J Virol Methods* 140, 17-24.
- 75 Lacroix, J., Leuchs, B., Li, J., Hristov, G., Deubzer, H.E., Kulozik, A.E., Rommelaere, J., Schlehofer, J.R. y Witt, O., 2010. *Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells. International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 1230-9.
- 80 Leuchs, B., Kern, A., Kuerschner, K., Mueller, M., Muenstermann, S. y Rommelaere, J. 2010. *Antibody that binds to H-1 parvovirus, European Patent* págs. 1-24.
- 85 Li, J., Bonifati, S., Hristov, G., Marttila, T., Valmary-Degano, S., Stanzel, S., Schnolzer, M., Mougin, C., Aprahamian,

- M., Grekova, S.P., Raykov, Z., Rommelaere, J. y Marchini, A., 2013. *Synergistic combination of valproic acid and oncolytic parvovirus H-1PV as a potential therapy against cervical and pancreatic carcinomas. EMBO molecular medicine* 5, 1537-55.
- 5 Malyala, P. y Singh, M., 2008. *Endotoxin limits in formulations for preclinical research. Journal of pharmaceutical sciences* 97, 2041-4.
- Nuesch, J.P., Lacroix, J., Marchini, A. y Rommelaere, J., 2012. *Molecular pathways: rodent parvoviruses--mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. Clin Cancer Res* 18, 3516-23.
- 10 Okada, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Kinoshita, K., Hayashita-Kinoh, H., Nitahara-Kasahara, Y., Takeda, S. y Ozawa, K., 2009. *Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ionexchange adsorptive membranes. Hum Gene Ther* 20, 1013-21.
- 15 Paradiso, P.R., 1981. *Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. J Virol* 39, 800-7.
- Paradiso, P.R., Williams, K.R. y Costantino, R.L., 1984. *Mapping of the amino terminus of the H-1 parvovirus major capsid protein. J Virol* 52, 77-81.
- 20 Q6B. 1999. *ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA FOR BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS Q6B ICH Expert Working Group.*
- 25 Qu, G., Bahr-Davidson, J., Prado, J., Tai, A., Cataniag, F., McDonnell, J., Zhou, J., Hauck, B., Luna, J., Sommer, J.M., Smith, P., Zhou, S., Colosi, P., High, K.A., Pierce, G.F. y Wright, J.F., 2007. *Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. J Virol Methods* 140, 183-92.
- 30 Rajendran, R., Lingala, R., Vuppu, S.K., Bandi, B.O., Manickam, E., Macherla, S.R., Dubois, S., Havelange, N. y Maithal, K., 2014. *Assessment of packed bed bioreactor systems in the production of viral vaccines. AMB Express* 4, 25.
- Rommelaere, J., Geletneky, K., Angelova, A.L., Daeffler, L., Dinsart, C., Kiprianova, I., Schlehofer, J.R. y Raykov, Z., 2010. *Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. Cytokine & growth factor reviews* 21, 185-95.
- 35 Tattersall, P. y Bratton, J., 1983. *Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. J Virol* 46, 944-55.
- 40 Tattersall, P., Cawte, P.J., Shatkin, A.J. y Ward, D.C., 1976. *Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. J Virol* 20, 273-89.
- Toolan, H.W., Dalldore, G., Barclay, M., Chandra, S. y Moore, A.E., 1960. *An Unidentified, Filtrable Agent Isolated from Transplanted Human Tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 46, 1256-8.
- 45 Tuynder, M., Fiucci, G., Prieur, S., Lespagnol, A., Géant, A., Beaucourt, S., Duflaut, D., Besse, S., Susini, L., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., Teleman, A., 2004. *Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion, PNAS*, Vol. 101, N.º 43, págs. 15364-15369
- 50 Weaver, J., Husson, S.M., Murphy, L. y Wickramasinghe, S.R., 2013. *Anion exchange membrane adsorbers for flow-through polishing steps: Part II. Virus, host cell protein, DNA clearance, and antibody recovery. Biotechnology and bioengineering* 110, 500-10.
- 55 Weiss, N., Stroh-Dege, A., Rommelaere, J., Dinsart, C. y Salome, N., 2012. *An in-frame deletion in the NS protein coding sequence of parvovirus H-1PV efficiently stimulates export and infectivity of progeny virions. J Virol* 86, 7554-64.
- 60 Wobus, C.E., Hugle-Dorr, B., Girod, A., Petersen, G., Hallek, M. y Kleinschmidt, J.A., 2000. *Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. J Virol* 74, 9281-93.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J. y Muzyczka, N., 1999. *Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. Gene Ther* 6, 973-85.
- 65

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir partículas de parvovirus vacías inactivas o completas activas, comprendiendo dicho método:
- 5
- (a) proporcionar la estirpe celular productora NB-324K;
 - (b) cultivar la estirpe celular en condiciones adecuadas e infectar las células a una densidad celular de 2,0 a 5,0 x 10⁴ células/cm² con el parvovirus a una MDI de 0,5 a 2 x 10⁻² UFP/células;
 - (c) recoger las células 2 a 6 días después de la infección y obtener un sedimento celular mediante centrifugación;
 - 10 (d) someter el sedimento celular resuspendido a un método de lisis celular mecánico, físico o químico para obtener un lisado celular que contiene parvovirus;
 - (e) tratar con ultrasonidos el lisado celular y someterlo a tratamiento con ADNasa;
 - (f) aclarar la recogida de parvovirus tratado con ADNasa mediante filtración; y
 - 15 (g1) purificar el parvovirus mediante dos ultracentrifugaciones por gradiente de densidad sucesivas, en donde el primer gradiente es un gradiente escalonado de Iodixanol/PBS y el segundo gradiente es un gradiente escalonado de Iodixanol/Ringer o un gradiente continuo de Iodixanol/Ringer para obtener partículas de parvovirus activas completas en una fracción y partículas de parvovirus vacías en otra fracción.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la densidad celular de la etapa (b) es de 3,0 a 4,0 x 10⁴ células/cm².
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde para la etapa (f) se usa un filtro de 0,2 µm con prefiltro.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la estirpe celular productora NB-324K se caracteriza por
- 25
- (a) una viabilidad de al menos el 95 %;
 - (b) un número de pases inferior a 20; y/o
 - (c) falta de contaminación por micoplasma.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la producción de virus se realiza en un sistema de recogida.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el sistema de recogida es una cámara de cultivo celular de 10 capas.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el parvovirus es H1-PV.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende adicionalmente determinar la relación de cápsides de parvovirus nativas con respecto a proteínas de cápsides no ensambladas o cápsides desnaturalizadas.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en donde la relación se determina mediante el uso de un anticuerpo monoclonal.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo BL-H1 (DSM ACC 3030).

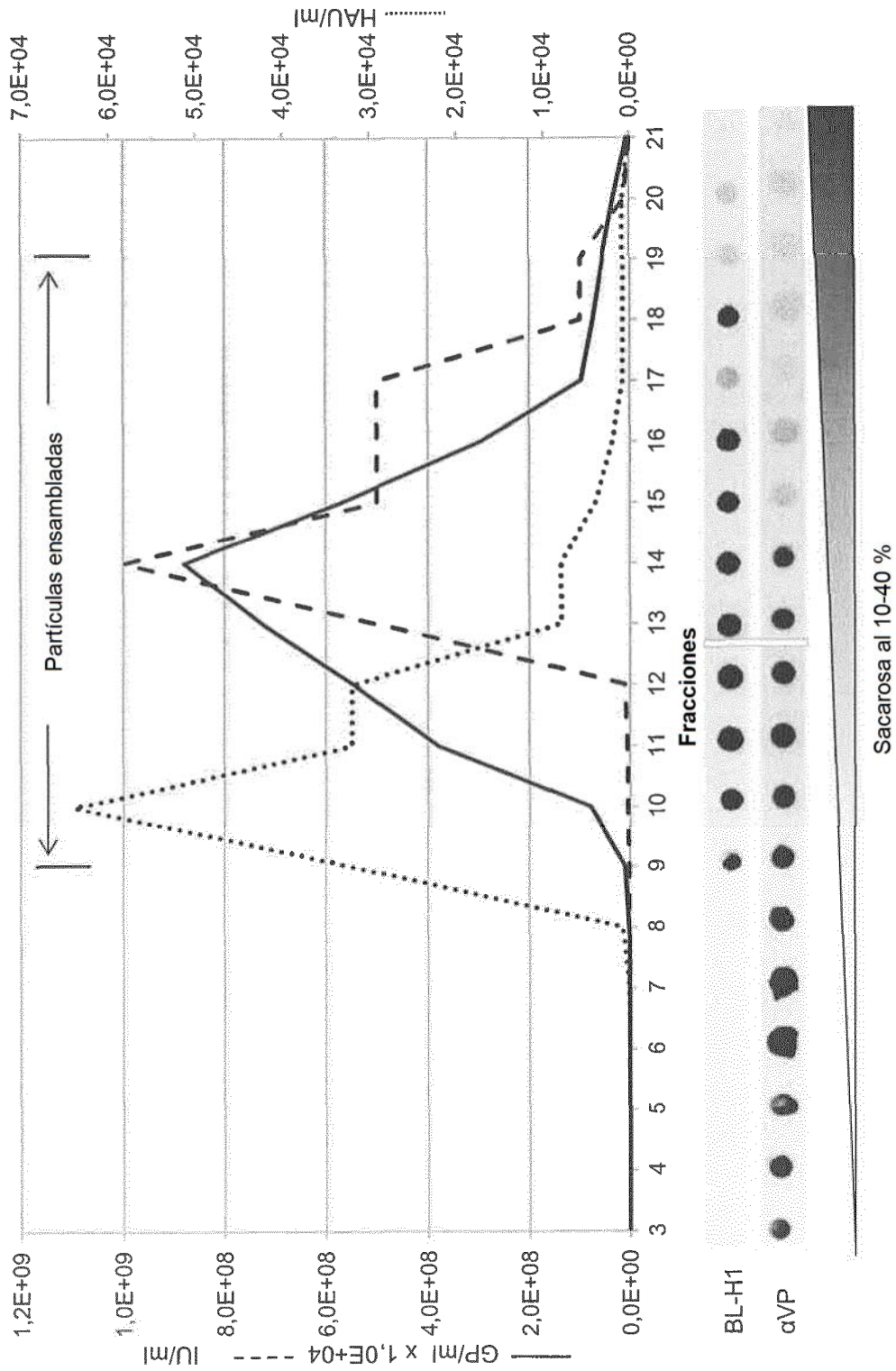


Fig. 1

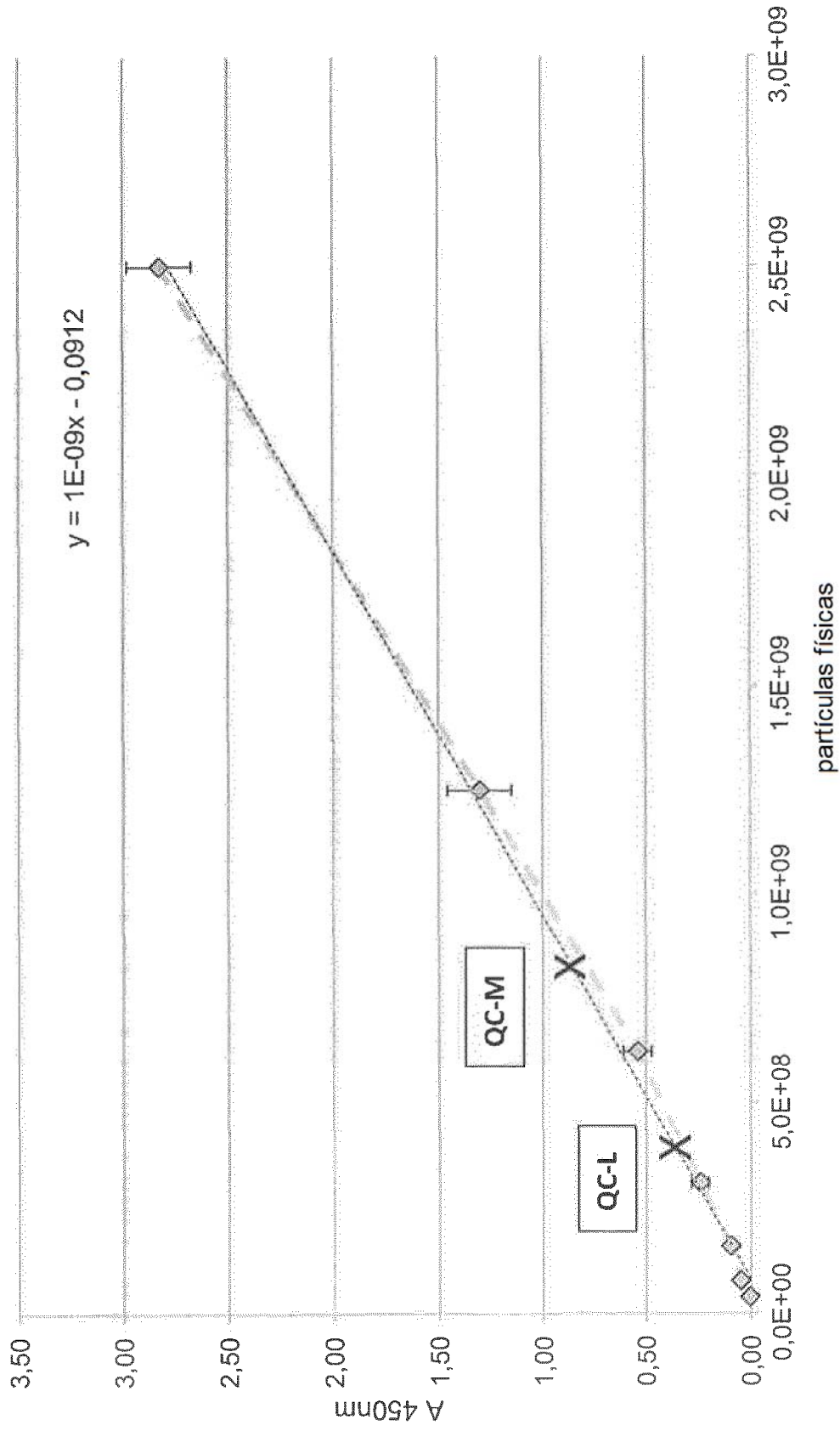
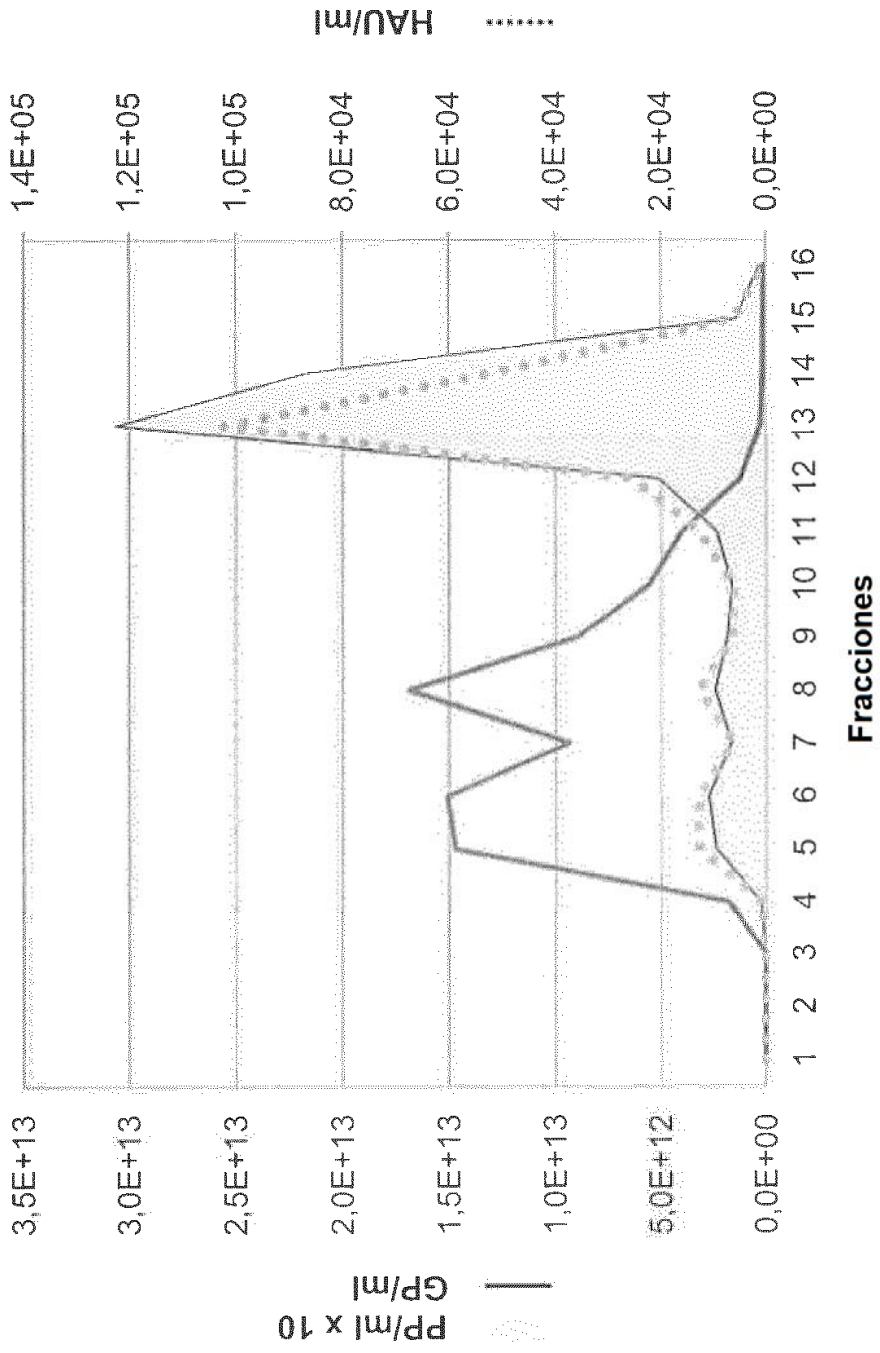


Fig. 2



1,54 - 1,34 g/cm³

Fig. 3

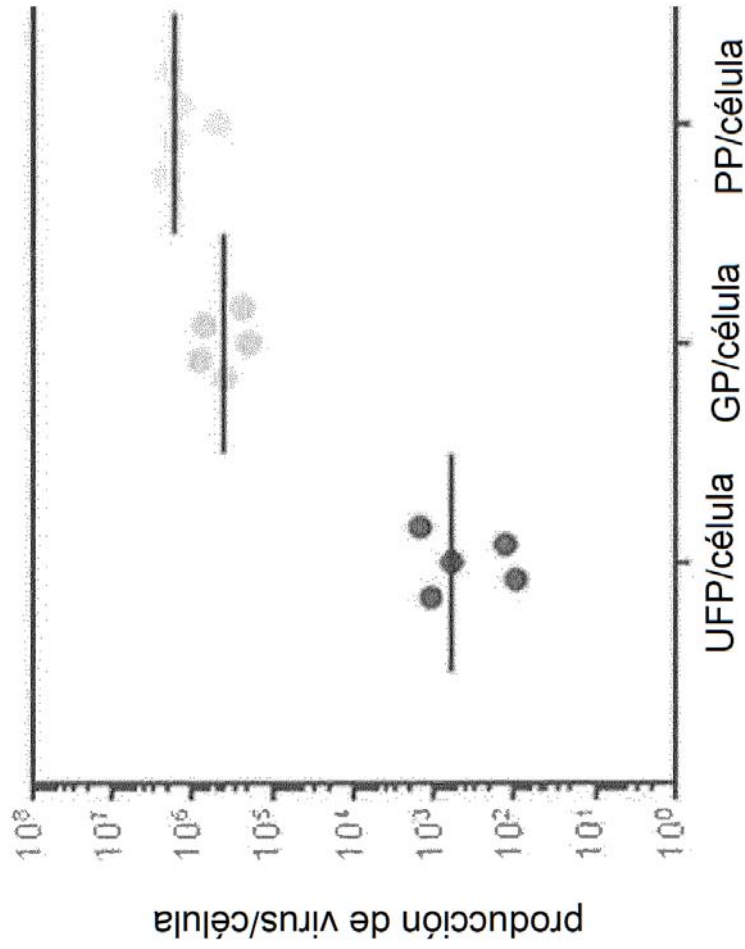


Fig. 4

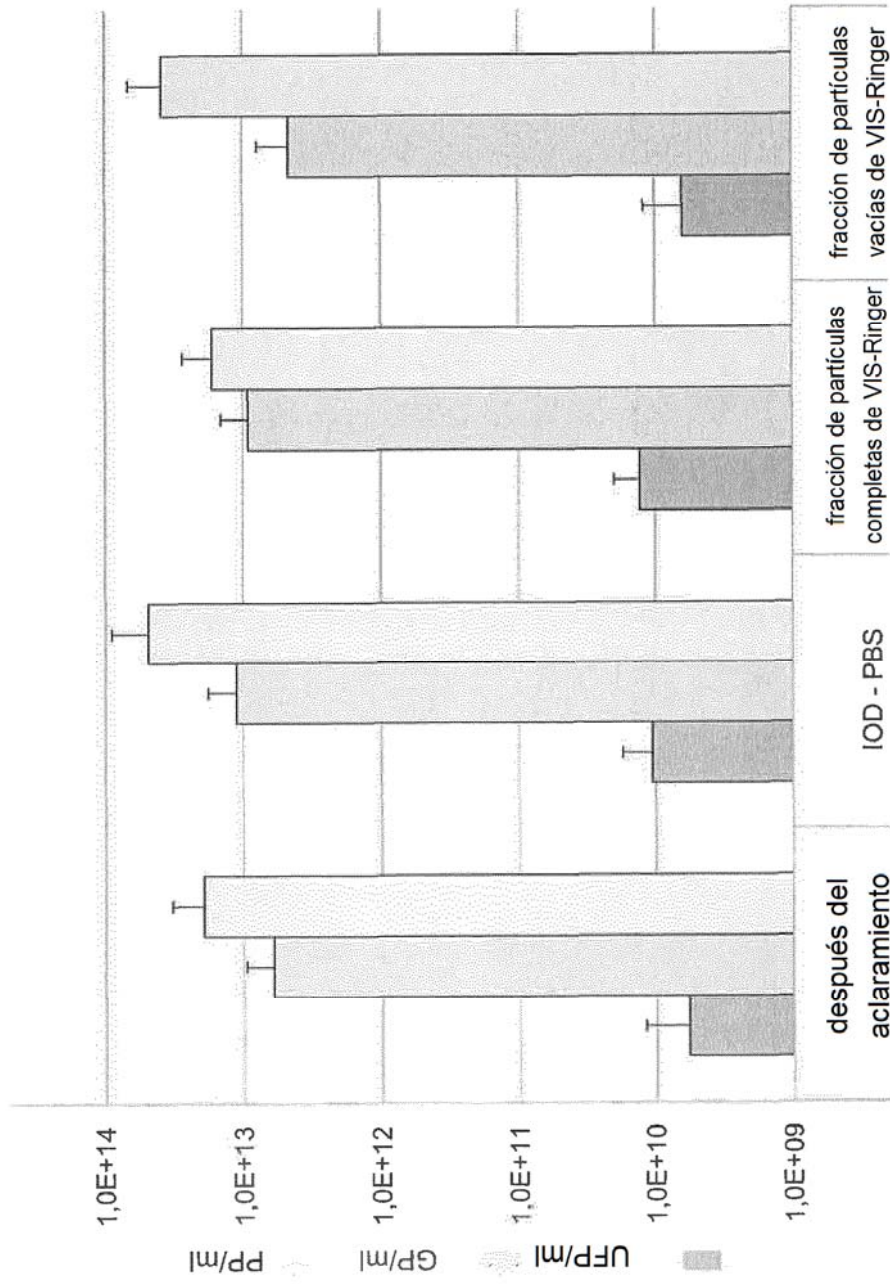


Fig. 5a

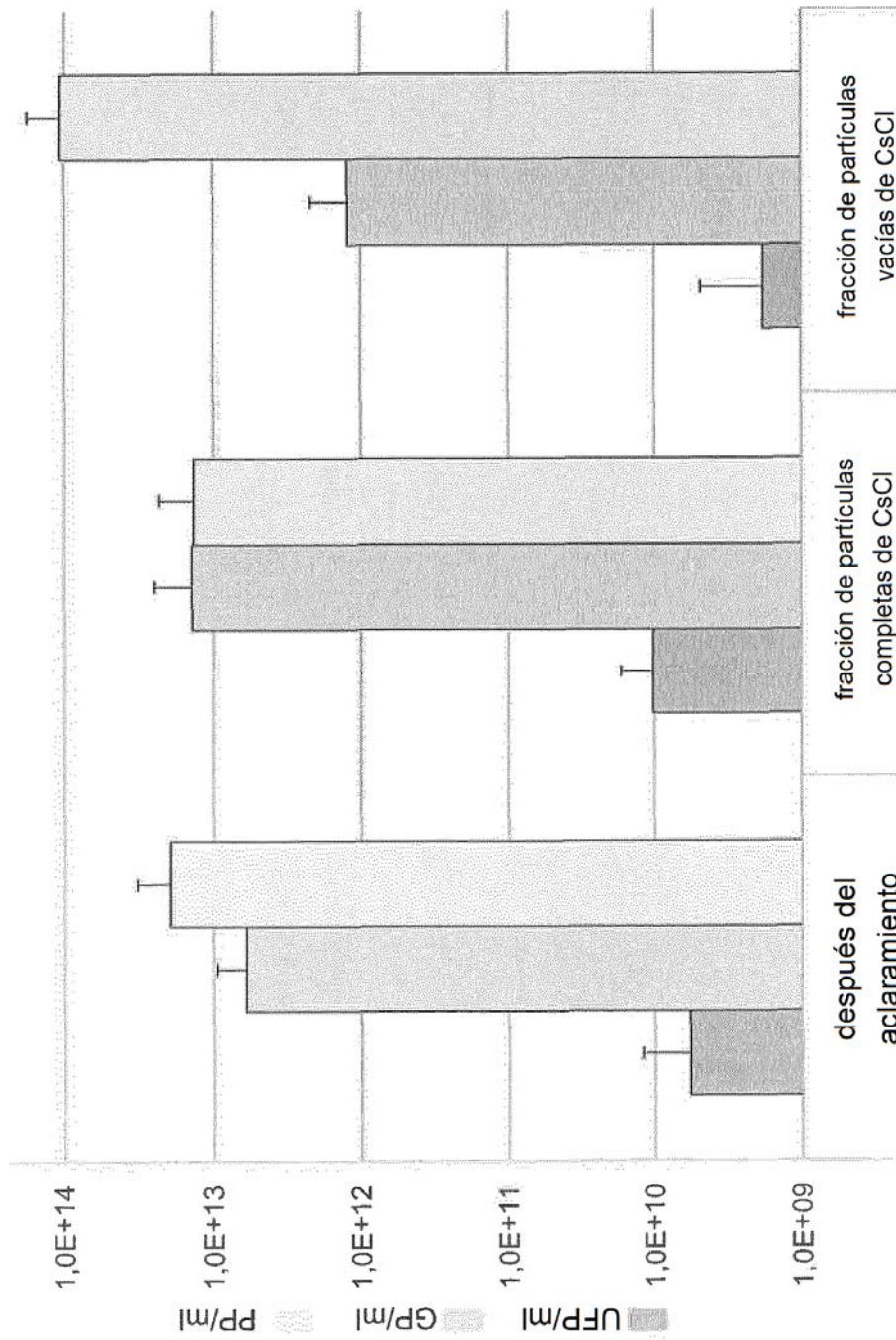


Fig. 5b

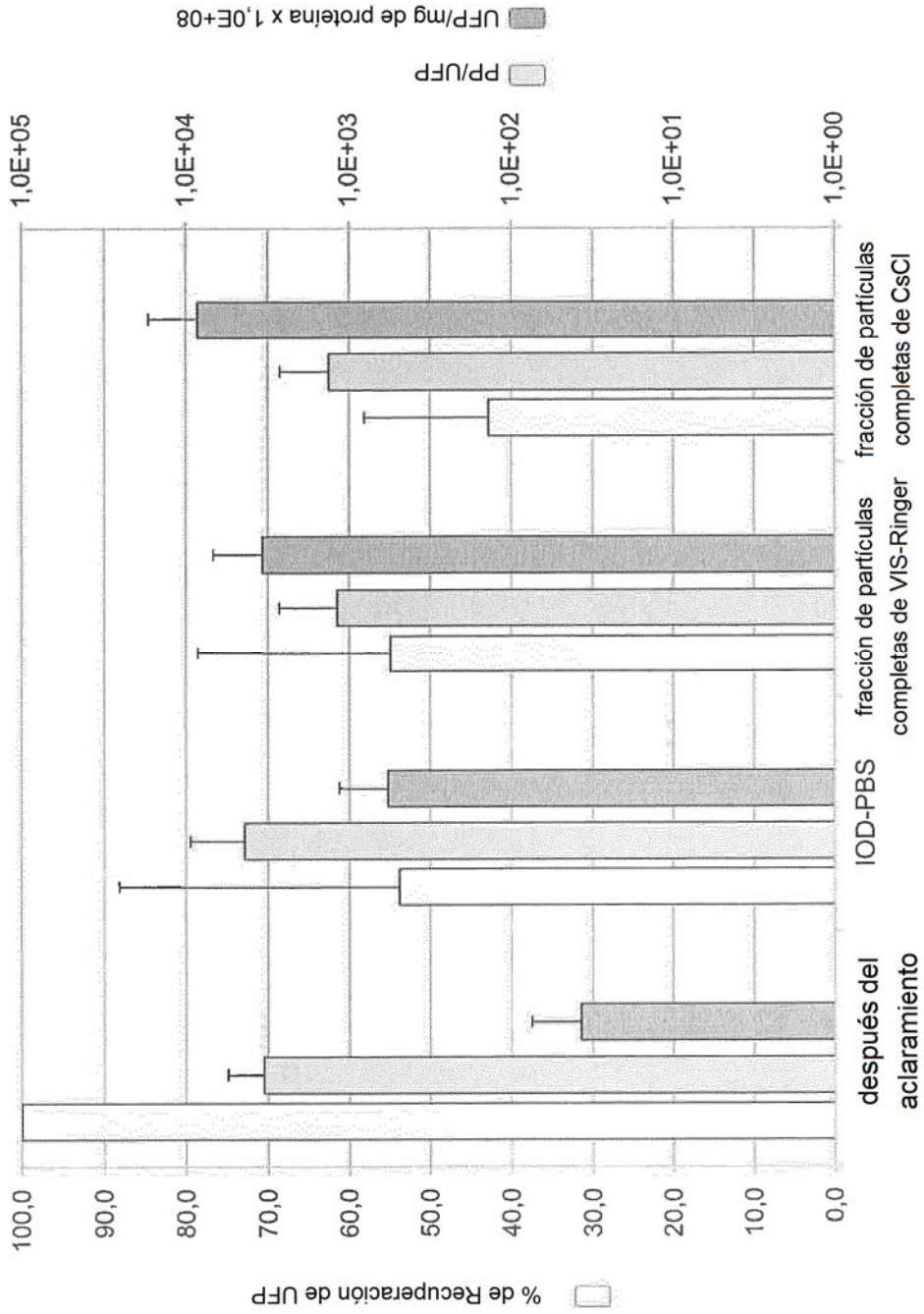


Fig. 6a

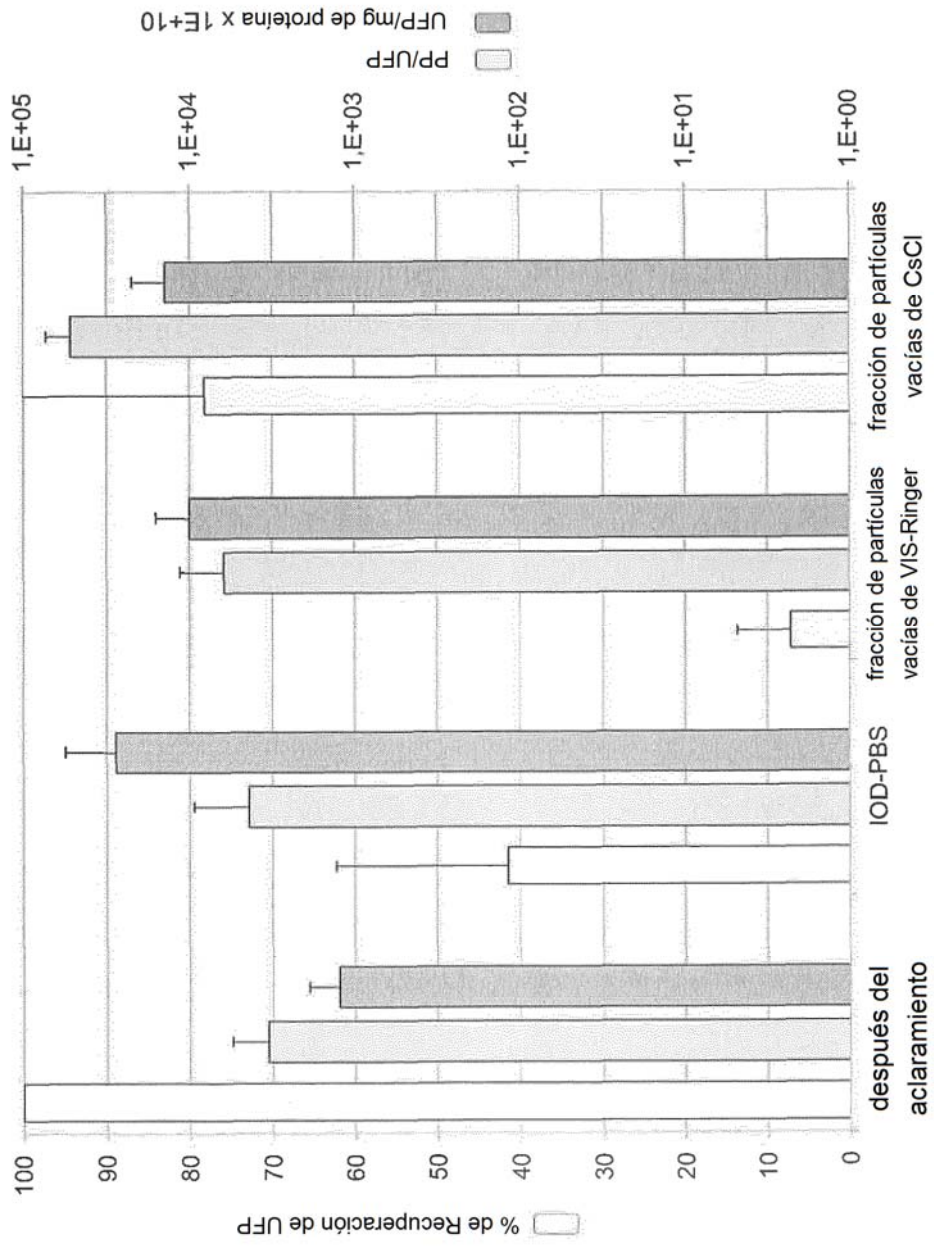


Fig. 6b

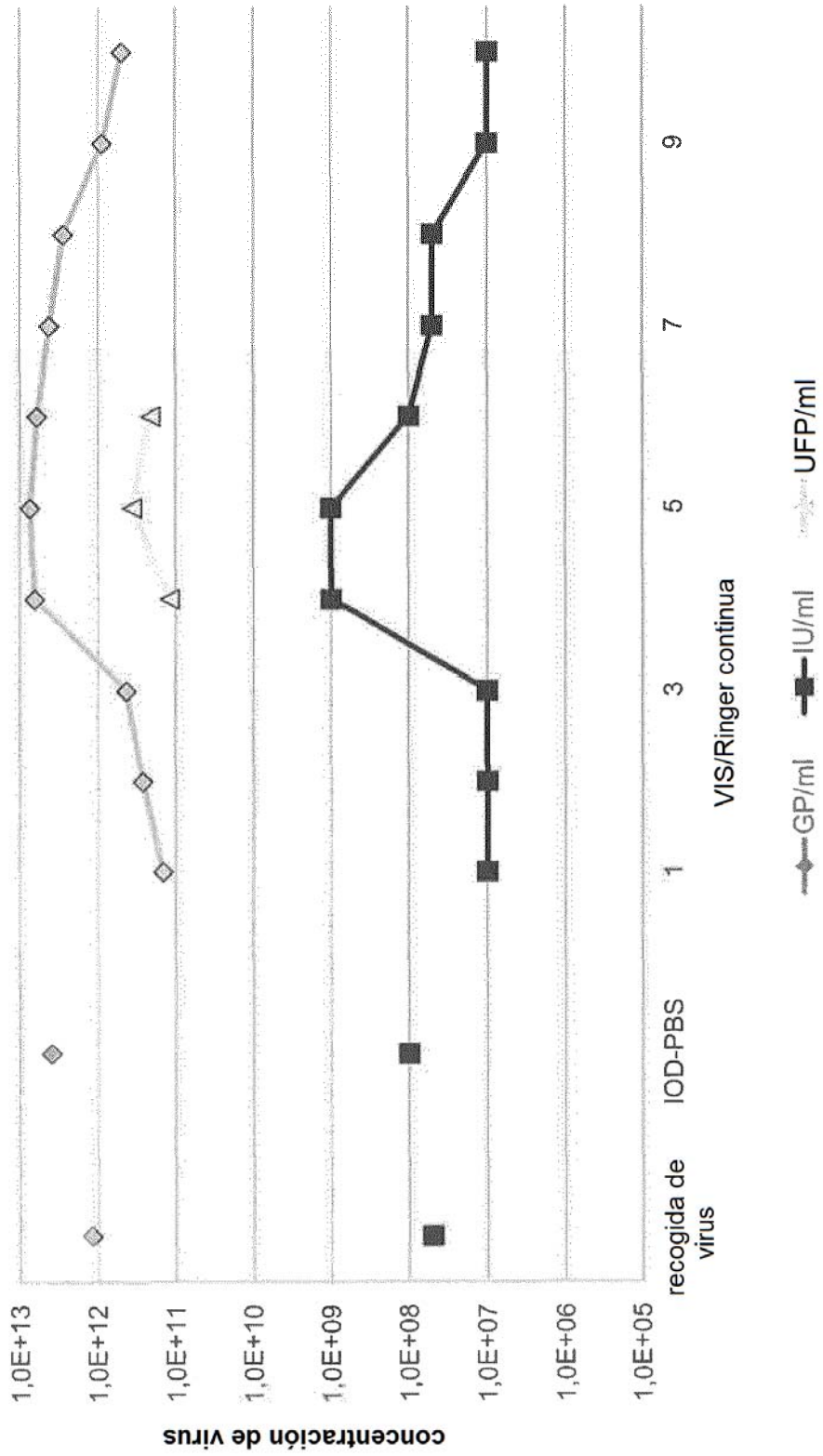


Fig. 7

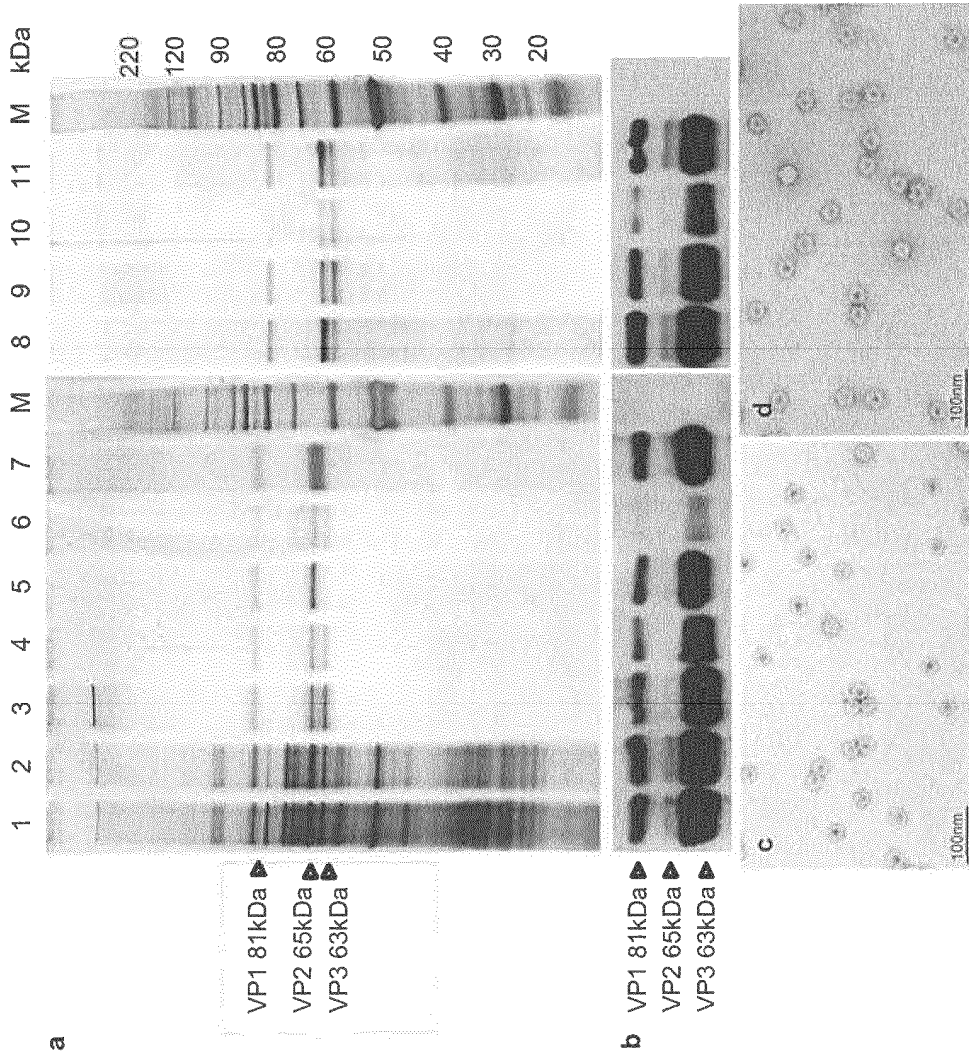


Fig. 8

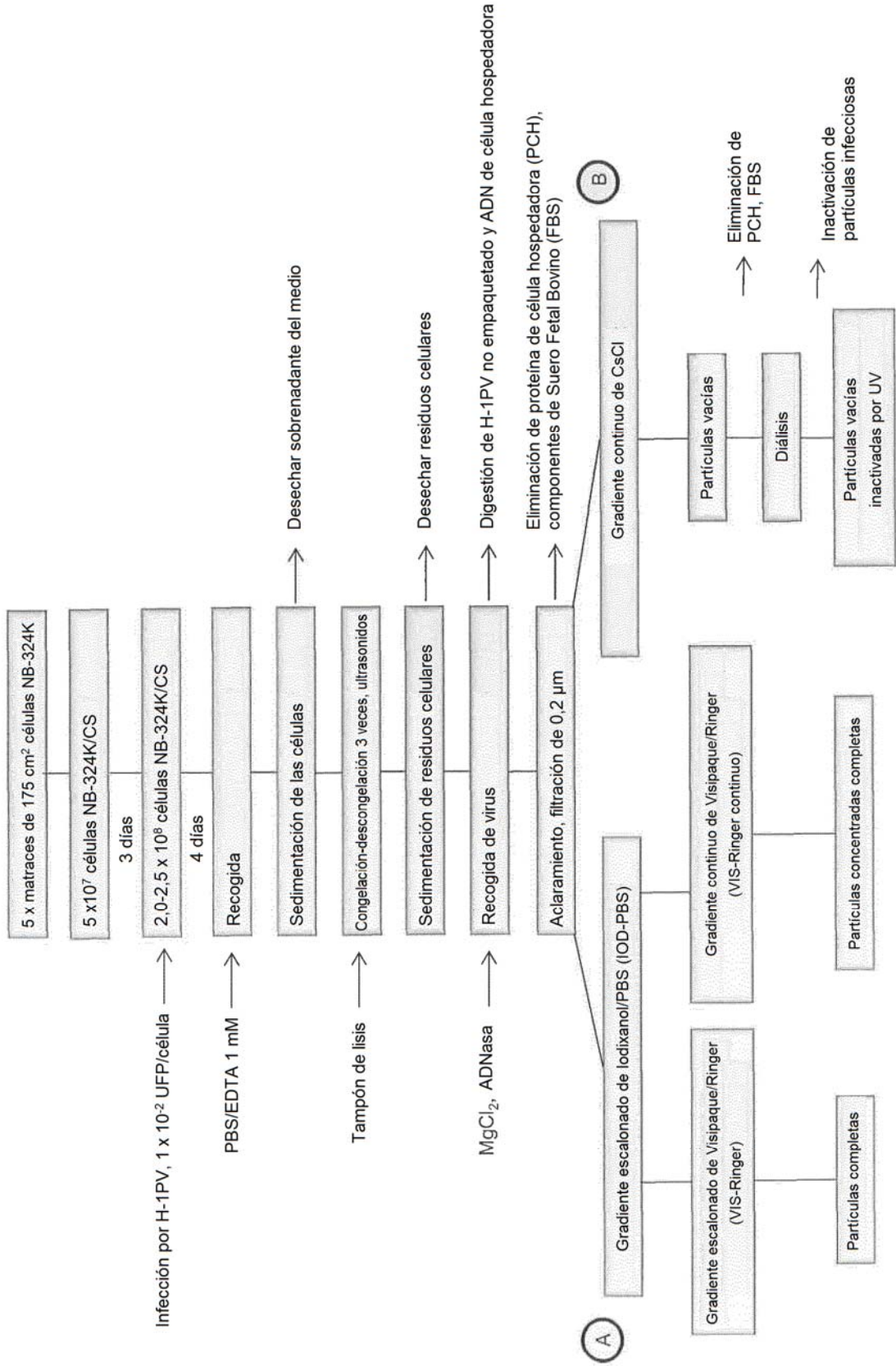


Fig. 9