

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 413**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012 PCT/US2012/049550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13022764**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12746243 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2739293**

54 Título: **Métodos y composiciones para la producción de virus vaccina**

30 Prioridad:

05.08.2011 US 201161515724 P

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

23.03.2021

73 Titular/es:

**SILLAJEN BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
450 Sansome Street, 16th floor
San Francisco, CA 94111, US**

72 Inventor/es:

**KIRN, DAVID y
BELL, JOHN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 813 413 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

Métodos y composiciones para la producción de virus vaccinia

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 Las modalidades de esta invención están dirigidas generalmente a virología, medicina y terapéutica viral. Ciertas modalidades están dirigidas a procesos de producción viral.

Antecedentes

15 Los virus oncolíticos (OV) son terapéuticos replicantes que se han diseñado o seleccionado para crecer específicamente y matar células tumorales. Varios grupos están en las primeras etapas de comercialización basadas en datos preclínicos de modelos animales y clínicos tempranos en humanos. Sin embargo, un desafío que aún enfrenta el campo es hacer virus de grado farmacéutico a gran escala para suministrar a los pacientes. Los virus son una entidad biológica en lugar de un fármaco sintetizado, por lo que el proceso de fabricación implica la producción de virus dentro de las células y la posterior eliminación de los restos celulares contaminantes mientras se mantiene la potencia infecciosa. Hasta la fecha, la mayoría, si no toda, la fabricación comercial de productos de virus vaccinia para uso humano ha sido como vacunas en cultivos celulares no humanos. En general, para una aplicación de vacuna, los pacientes reciben dosis bajas de virus en un sitio local (a menudo intramuscular) donde las proteínas celulares contaminantes pueden, de hecho, servir como adyuvante para aumentar la inmunogenicidad de la preparación. Por el contrario, para la terapéutica del virus oncolítico, las dosis de virus necesarias son hasta un millón de veces mayores que para la aplicación de la vacuna y pueden administrarse por vía intravenosa, intracraneal, intraperitoneal o mediante inyecciones tumorales directas. En el caso de esto, es crítico poder fabricar grandes cantidades de virus que carecen de restos celulares no humanos contaminantes. Además, los virus vaccinia son virus envueltos que incorporan las proteínas de la célula huésped en las membranas virales. La incorporación de proteínas humanas en la envoltura del virus aumentará su capacidad de viajar sin ser detectado por el sistema inmune del huésped humano.

30 Existe aún la necesidad de métodos y composición adicionales para la producción de virus oncolíticos a gran escala.

Resumen

35 La invención proporciona un método para producir virus vaccinia de la cepa Wyeth o Western Reserve que comprende:

- (a) infectar las células HeLa adheridas a una superficie con un virus vaccinia al poner en contacto las células HeLa con el virus vaccinia en una multiplicidad de infección (m.o.i.) de entre 0,01 y 0,05 unidades formadoras de placa (pfu)/célula;
- 40 (b) cultivar las células infectadas en un medio de infección que comprende de 0 % - 10 % de suero y que tiene un pH de aproximadamente 7,2; o aproximadamente 7,3 o aproximadamente 7,4 durante un período de 40-80 horas a una temperatura entre 36 °C y 37,5 °C; y
- (c) recolectar el virus vaccinia del cultivo,
- 45 por lo que se producen al menos 50 pfu de virus vaccinia por célula HeLa, en donde las células HeLa se cultivan en una o más botellas giratorias o en un biorreactor que comprende un área de cultivo acumulativo de al menos 168 000 cm².

50 El virus vaccinia se ha producido en células HeLa cultivadas en cultivo en suspensión. Sin embargo, las condiciones de cultivo en suspensión actualmente no son adecuadas para la producción a gran escala de virus. Por lo tanto, la producción a gran escala o a escala comercial de virus vaccinia no se ha intentado con éxito mediante el uso de células HeLa. Además, no se esperaba que las líneas celulares HeLa adherentes produjeran un número suficiente de células para garantizar mediante el uso de células HeLa adherentes producir el virus vaccinia en las cantidades necesarias para la producción a gran escala. La solicitud actual describe un proceso a gran escala para la producción de virus vaccinia mediante el uso de células HeLa adherentes.

55 Ciertas modalidades de la divulgación están dirigidas a métodos para producir un virus vaccinia que incluyen uno o más de los siguientes pasos.

60 En ciertos aspectos de la divulgación, los métodos incluyen infectar células HeLa adheridas a una superficie con un virus vaccinia al poner en contacto las células HeLa adherentes con un virus vaccinia. Preferentemente, el virus vaccinia es un virus vaccinia recombinante tal como aquellos descritos en los párrafos [0028] a [0052] de la solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos número 2009/0004723. En ciertas modalidades, las células HeLa adheridas a una placa Petri se excluyen específicamente del alcance de la reivindicación. En varias modalidades, la presente divulgación proporciona un método para producir un virus vaccinia que comprende (a) infectar células HeLa adheridas a una superficie con virus vaccinia (b) cultivar las células infectadas en condiciones permisivas para la producción del virus progenie y (c) recolectar el virus vaccinia del cultivo.

En algunas modalidades de la divulgación, se proporcionan métodos para producir un virus vaccinia que comprenden (a) infectar células HeLa adheridas a una superficie con un virus vaccinia recombinante al poner en contacto al menos 1×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} , 5×10^{13} o más células HeLa adherentes, incluidos todos los valores y rangos entre ellos, con una composición de virus vaccinia; y (b) cultivar las células infectadas bajo condiciones permisivas para la producción de 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más virus vaccinia recombinante por célula, incluidos todos los valores y rangos entre ellos. Preferentemente, se producen al menos 50 unidades formadoras de placa (pfu) del virus vaccinia por célula HeLa de acuerdo con los métodos, más preferentemente se producen al menos 75 pfu del virus vaccinia por célula HeLa.

En otras modalidades de la divulgación, las células HeLa adheridas a una superficie se infectan con el virus vaccinia en una multiplicidad de infección (m.o.i.) de entre 0,001 y 1,0; preferentemente entre 0,005 y 0,5; más preferentemente entre 0,01 y 0,1. En una modalidad particularmente preferida de la invención, la m.o.i. está entre 0,01 y 0,05; incluidos todos los valores y rangos entre ellos. En otras modalidades preferidas, la m.o.i. está entre 0,015 y 0,03. El término "multiplicidad de infección" o "m.o.i." se refiere a la proporción de unidades formadoras de placa (pfu) de virus añadidas por célula HeLa durante la infección.

En modalidades relacionadas, las células HeLa adheridas, a una densidad de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 células HeLa/cm², preferentemente aproximadamente 10^5 células HeLa/cm² se infectan con virus vaccinia de acuerdo con los métodos, en donde la concentración del virus vaccinia está entre 10^3 y 10^5 pfu/ml, preferentemente aproximadamente 10^4 pfu/ml.

Cultivo de células HeLa adherentes. Las células HeLa adherentes para la infección con el virus vaccinia de acuerdo con los métodos se pueden cultivar mediante cualquier método adecuado, incluido (pero no se limita a) el crecimiento en recipientes de vidrio y plástico, por ejemplo, frascos de cultivo, biorreactores que incluyen, sin limitación, fábricas de células tales como Nunclon® Cell Factories™, cubos celulares tal como el CELLCUBE® System de Corning Life Sciences, bolsas de plástico suave (como bolsas de infusión) llenas de una matriz de soporte celular tal como bolsas de cultivo celular Gibco® o Lampire®; botellas giratorias; botellas agitadoras tales como Magna-Flex® Spinner Flasks; fermentadores o fibras huecas de diversos materiales, tales como los sistemas de cultivo celular de Cellex Biosciences (reactor de fibra hueca AcuSyst®), BioVest (Cell-Pharm® System 100 o System 2500) o Fibercell™. Se prefiere el cultivo en biorreactores ya que los biorreactores permiten un monitoreo y control precisos de variables tales como la temperatura y el pH. En ciertos aspectos, se puede usar el material plástico de CellBind™ (www.sigmaaldrich.com). Los cultivos celulares pueden estar en forma de grupos de células, tal como esferoides sobre una perla microportadora, o células en un andamiaje (por ejemplo, andamiajes biodegradables), tejido u organoides de tejido. En ciertos aspectos, las células HeLa adherentes se cultivan en un recipiente microportador, cubo celular, fábrica de células, frasco en T o botella giratoria. En una modalidad preferida, las células HeLa adherentes se cultivan en una o más botellas giratorias, por ejemplo, mediante el uso de un aparato RollerCell 40 (Cellon SA, Luxemburgo). El recipiente usado de acuerdo con la divulgación puede comprender, sin limitación, un área de cultivo acumulativa de aproximadamente, al menos, o como máximo 1700; 5000; 10 000; 25 000; 50 000; 100 000; 150 000; 200 000; 500 000 cm² incluidos todos los rangos y valores entre ellos. En ciertos aspectos de la invención, el recipiente tiene un área de cultivo acumulativa de al menos 168 000 cm².

Las células HeLa adherentes que se infectarán con el virus vaccinia pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo adecuado que apoye el crecimiento, el mantenimiento y la fijación a la superficie de soporte celular, incluidos, sin limitación, BME (medio de Eagle basal), MEM (medio esencial mínimo de Eagle), medio 199, DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), GMEM (medio de Eagle modificado por Glasgow), DMEM-HamF12 y Ham-F10, medio Dulbecco modificado por Isocove, medio 5A de MacCoy o RPMI 1640. Preferentemente, el medio de cultivo es un medio de cultivo definido. En un aspecto, el medio de cultivo está sustancialmente libre de suero. Los ejemplos de medios libres de suero optimizados para usar con células HeLa incluyen, sin limitación, VP-SFM (Gibco BRL/Life Technologies), medio libre de suero (SFM) Ex-Cell® HeLa (Sigma Aldrich) y Quantum 101 (GE Healthcare). En otras modalidades, el medio de cultivo también puede comprender suero animal tal como suero fetal bovino (FBS). Por ejemplo, el medio de cultivo puede comprender de 5 % a 10 % de suero (por ejemplo, FBS) o puede contener menos del 5 % de suero (por ejemplo, FBS), o cualquier rango o valor entre ellos. En una modalidad, el medio de cultivo es DMEM suplementado con 5 % a 10 % de FBS, tal como 10 % de FBS.

El término "microportador" significa una pequeña partícula discreta para usar en el cultivo de células y a la que se pueden unir las células. Los microportadores pueden ser de cualquier forma adecuada, tal como varillas, esferas y similares. En muchas modalidades, un microportador incluye una base de microportador que está recubierta para proporcionar una superficie adecuada para el cultivo celular. Un polipéptido se puede enlazar, injertar o unir de otro modo al recubrimiento de la superficie. Se han empleado microportadores en cultivo celular con el fin de proporcionar altos rendimientos de células dependientes de la unión. Los microportadores se agitan o remueven típicamente en medios de cultivo celular y proporcionan una relación muy grande de área superficial de unión y crecimiento a volumen en relación con el equipo de cultivo más tradicional. Véase la publicación de patente de Estados Unidos 2011/0027889 para un ejemplo detallado de un microportador.

En ciertas modalidades de la divulgación, el virus vaccinia es una cepa de virus vaccinia IHD-J, Wyeth, Western Reserve o Copenhagen. El virus vaccinia de acuerdo con la invención es un virus vaccinia de la cepa Wyeth o Western Reserve. En ciertos aspectos, el virus vaccinia es un virus vaccinia recombinante. El virus vaccinia recombinante puede comprender una región codificante heteróloga. Como se usa en la presente descripción, una región codificante heteróloga es una región codificante que no se encuentra naturalmente en el genoma del virus vaccinia. En ciertos aspectos, la región codificante heteróloga puede codificar un polipéptido inmunoestimulador. Un polipéptido inmunoestimulador puede ser una citoquina, tal como, pero no se limita a, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

En ciertos aspectos, el virus vaccinia recombinante se replica selectivamente en una célula tumoral. El virus vaccinia recombinante puede comprender una mutación en un gen endógeno. Una mutación puede ser una delección de la secuencia de ácido nucleico, sustitución de residuos de ácido nucleico o inserción de uno o más residuos de ácido nucleico que afectan la función o expresión de un virus vaccinia. La mutación puede dar como resultado un crecimiento selectivo en una célula tumoral o un crecimiento atenuado en una célula no tumoral, o un crecimiento mejorado en una célula tumoral o una combinación de las mismas. Un virus vaccinia recombinante que comprende una mutación en un gen endógeno puede ser un virus vaccinia deficiente en timidina quinasa (TK⁻) (es decir, un virus vaccinia que tiene una mutación en un gen que codifica la timidina quinasa que rinde el polipéptido codificado no funcional). En ciertos aspectos de la divulgación, el virus vaccinia recombinante que comprende una mutación en un gen endógeno es una cepa de virus vaccinia IHD-J, Wyeth, Western Reserve o Copenhagen; y/o comprende una región codificante heteróloga. El virus vaccinia recombinante que comprende una mutación en un gen endógeno de acuerdo con la invención es un virus vaccinia de la cepa Wyeth o Western Reserve; y/o comprende una región codificante heteróloga. En una modalidad adicional, un virus vaccinia que comprende una mutación en un gen endógeno también comprende una región codificante heteróloga, tal como, pero no se limita a, una región codificante del polipéptido del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

Cultivo de las células HeLa infectadas. Las células HeLa adheridas que se han puesto en contacto con el virus vaccinia se cultivan en condiciones permisivas para la producción del virus vaccinia progenie. Las condiciones de cultivo pueden comprender, pero no se limitan a un medio de infección definido, pH definido, recipiente de cultivo definido, temperatura o rango de temperatura definidos, número de células definido, confluencia de células definida, manipulación física definida (por ejemplo, tratamiento enzimático o químico, frecuencia de rotación, velocidad de agitación, etc.), condiciones de fase gaseosa definidas, tiempo de cultivo definido, densidad de siembra celular definida y número de pases celulares definido. En un aspecto, el virus puede simplemente añadirse al medio de cultivo de células HeLa usado para preparar las células HeLa adherentes, en cuyo caso el medio de cultivo y el medio de infección son los mismos. En otros aspectos, el medio de cultivo usado para preparar las células HeLa adherentes se elimina en el paso de infección y las células HeLa que se han puesto en contacto con el virus vaccinia se cultivan con un medio de infección que puede comprender suero o que puede estar sustancialmente libre de suero, hasta que se produzca el virus progenie. Los medios de infección adecuados incluyen, sin limitación, BME, MEM, medio 199, DMEM, GMEM, DMEM-HamF12 y Ham-F10 medio Dulbecco modificado por Isocove, medio 5A de MacCoy o RPMI 1640, cualquiera de los cuales puede opcionalmente ser suplementado con suero. Los medios libres de suero, tales como VP-SFM, medio libre de suero (SFM) Ex-Cell® HeLa y Quantum 101 también son adecuados para usar como medio de infección.

De acuerdo con la invención, las células infectadas se cultivan en un medio de infección que comprende de 0 % - 10 % de suero y que tiene un pH de aproximadamente 7,2; o aproximadamente 7,3 o aproximadamente 7,4. En ciertos aspectos de la divulgación, las células infectadas se cultivan en un medio de infección que comprende del 5-10 % de suero (por ejemplo, suero fetal bovino (FBS)) a un pH de aproximadamente 7; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5. 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 u 8, preferentemente a un pH por encima de 7,1; más preferentemente a un pH por encima de 7,2; lo más preferentemente a un pH de aproximadamente 7,3. En otros aspectos de la divulgación, las células se cultivan en un medio de infección que comprende menos del 5 % de suero (por ejemplo, FBS) tal como 0 % de suero (por ejemplo, FBS), a un pH de aproximadamente 7, 7,2; 7,3; 7,4; 7,5. 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 u 8, preferentemente a un pH por encima de 7,1; más preferentemente a un pH por encima de 7,2; lo más preferentemente a un pH de aproximadamente 7,3. En aspectos relacionados, las células se cultivan a un pH de aproximadamente 7,3 en un medio de infección que comprende entre 0 % y 10 % de suero (por ejemplo, FBS). En otras modalidades de la divulgación, las células se cultivan a un pH superior a 7,2 e inferior a 7,6 en un medio de infección que comprende entre 0 % y 10 % de suero (por ejemplo, FBS).

En una modalidad preferida, el medio de infección comprende DMEM y opcionalmente glutamina 100-300 mM. Las células se pueden cultivar de acuerdo con la divulgación a una temperatura de aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 °C. En una modalidad preferida de la invención, las células se cultivan a una temperatura entre 36 °C y 37,5 °C, preferentemente a 37 °C. En ciertos aspectos, el medio de infección excluirá específicamente uno o más de sulfato de dextrano, Pluronic F-68, Tween-80 y/o hidrolizado de proteína de soja. En modalidades preferidas, el medio de infección excluye específicamente sulfato de dextrano y al menos uno de los siguientes componentes: Pluronic F-68, Tween-80 e hidrolizado de proteína de soja. En otras modalidades preferidas, el medio de infección está sustancialmente libre de todos estos componentes.

Los métodos pueden comprender además expandir el cultivo de células HeLa antes a durante o después de la infección. Las células HeLa pueden pasarse a través de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más recipientes de cultivo, por ejemplo, recipientes de cultivo de botella giratoria. En ciertos aspectos, las células se desprenden de una superficie mediante

tratamiento con una solución de desprendimiento que comprende proteasas y/o enzimas colagenolíticas, por ejemplo, HyQtase®. Cada recipiente puede tener un área de cultivo aumentada en comparación con el recipiente de cultivo anterior. En cierto aspecto, el recipiente de cultivo tiene un área de cultivo total de al menos 84 000 cm² a 1 000 000 cm². En ciertos aspectos, el pase final es a un recipiente de cultivo que tiene un área de cultivo de al menos 168 000 cm².

En ciertas modalidades, el intervalo de tiempo entre la siembra de un recipiente de cultivo y la infección es de 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 o más horas, incluidos todos los valores y rangos entre ellos. En ciertos aspectos, las células HeLa adherentes se ponen en contacto con 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 pfu/ml, incluidos todos los valores y rangos entre ellos, del virus vaccinia. En una modalidad preferida, las células HeLa adherentes, a una densidad de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 células HeLa/cm², preferentemente aproximadamente 10^5 células HeLa/cm² se ponen en contacto con entre 10^3 y 10^5 pfu/ml de virus vaccinia, más preferentemente aproximadamente 10^4 pfu/ml de virus vaccinia.

En ciertos aspectos, los métodos incluyen aislar el virus vaccinia producido por las células HeLa adherentes. El virus vaccinia recolectado puede concentrarse y purificarse de acuerdo con los métodos conocidos por el experto en la técnica. Otras modalidades de la divulgación están dirigidas a una composición del virus vaccinia producida por los métodos descritos en la presente descripción, tales como los descritos en los párrafos [0295] a [0303] de la solicitud de publicación de patente de los Estados Unidos número 2009/0004723.

Otras modalidades de la divulgación se discuten a lo largo de esta solicitud. Cualquier modalidad discutida con respecto a un aspecto de la divulgación se aplica también a otros aspectos de la divulgación y viceversa. Las modalidades en la sección de ejemplos se entienden son modalidades de la divulgación que son aplicables a todos los aspectos de la divulgación.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno," pero también es consistente con el significado de "uno o más," "al menos uno" y "uno o más de uno."

Se contempla que cualquier modalidad discutida en la presente descripción puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la divulgación, y viceversa. Además, las composiciones y estuches de la divulgación se pueden usar para lograr los métodos de la divulgación.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que es empleado para determinar el valor.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o." También se contempla que todo lo que aparece en la lista mediante el uso del término "o" también puede excluirse específicamente.

Como se usa en esta especificación y reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos adicionales no recitados o pasos del método.

Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modalidades específicas de la divulgación, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y están destinados a demostrar aún más ciertos aspectos de la presente divulgación. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de modalidades específicas presentadas en la presente descripción.

La figura 1 ilustra la producción de la cepa de virus vaccinia recombinante JX-594 (pfu/célula) en varias líneas celulares humanas. Las células se infectaron a una multiplicidad de infección de 0,1 y a las 72 horas después de la infección, se recogieron los lisados y se determinó el título en células U-2 OS.

La figura 2 ilustra el efecto del pH del medio de infección sobre la productividad de la cepa de virus vaccinia recombinante JX-594 en células HeLa adherentes. Las células se infectaron a una multiplicidad de infección de 0,1 en

medios del pH indicado y a las 72 horas después de la infección, se recogieron los lisados y se determinó el título del virus en células U-2 OS.

Descripción detallada

5 Los virus vaccinia son virus envueltos que producen cuatro formas infecciosas que difieren en sus membranas externas: virión maduro intracelular (IMV), virión envuelto intracelular (IEV), virión envuelto asociado a células (CEV) y virión envuelto extracelular (EEV). La forma EEV es resistente al complemento debido a la incorporación de reguladores del complemento de activación del huésped en la membrana externa del EEV (Vanderplasschen y otros, 10 (1997) PNAS 95:7544-7549). La capacidad de evadir la inactivación del complemento y la capacidad general de evadir el reconocimiento por parte del sistema inmune del huésped son características importantes para la eficacia en el suministro sistémico en pacientes.

15 La membrana plasmática del IMV incorpora numerosas proteínas de la célula huésped durante su ensamblaje. Ya que el IMV representa la mayoría de la progenie infecciosa, las células productoras de la misma especie que los pacientes objetivo para la viroterapia oncolítica pueden ser ventajosas para la diseminación sistémica dentro del paciente, ya que los virus serán menos inmunogénicos. Estas proteínas de la célula huésped en las membranas plasmáticas del IMV también pueden proporcionar ciertas ventajas en el proceso de infección.

20 Aunque el IMV es la mayoría de la progenie infecciosa, no se ha establecido definitivamente que la forma EEV del virus no esté contenida en las preparaciones del cultivo celular. La activación del complemento que regula las proteínas de la misma especie que los pacientes objetivo puede desempeñar un papel importante en la inhibición de la activación del complemento y, por lo tanto, evadir el aclaramiento inmune por parte del sistema inmune del huésped. Por lo tanto, los inventores desarrollaron un sistema para producir grandes cantidades de un virus vaccinia con un componente 25 celular humano.

Históricamente, el virus vaccinia para uso como vacuna se produjo a partir de costras humanas, sin embargo, posteriormente se cultivó en la piel de terneros, ovejas y búfalos de agua, en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo o en fibroblastos primarios de embriones bovinos (Ellner, 1998). Para el esfuerzo concertado a nivel mundial en la erradicación de la viruela, las reservas se produjeron por infección a través de la escarificación de la piel de terneros (Fenner, 1977). Las reservas de virus se prepararon a partir de linfa de ternera y esta formulación es la única vacuna disponible y con licencia, conocida como DRYVAX® (Wyeth). La preparación del virus se concentró y liofilizó, lo que explica su estabilidad (Fenner, 1977). Se produjo a una concentración de al menos 10^8 pfu/ml de material liofilizado. Se reconstituyó en glicerina al 50 % y fenol al 0,25 % en agua estéril para inyección y se suministró 35 como mucho a 400 vacunados por vía intradérmica a través del uso de la aguja bifurcada (Fenner, 1977) con una dosis de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ pfu - esto es al menos 10^4 veces menor que la dosis de virus vaccinia estándar de 10^9 pfu (o superior) como un virus oncolítico.

40 Un candidato clínico líder para el virus vaccinia oncolítico es el virus vaccinia inactivado por timidina quinasa que expresa GM-CSF (Jennerex, JX-594). Sin embargo, también se pueden producir otras variantes y cepas de virus vaccinia mediante los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, JX-963 es un virus vaccinia recombinante que, junto con la eliminación del gen TK, tiene una delección adicional del gen del factor de crecimiento vacunal (VGF) construido en un esqueleto vacunal de Western Reserve. Este virus vaccinia de doble delección (vvDD) ha demostrado ser tumor específico y tiene actividad antitumoral en modelos de animales (McCart y otros, 2001; 45 Thorne y otros, 2007; Naik y otros, 2006). Una segunda variante de vvDD es el puerto JX-929 y expresa el receptor de somatostatina humana (SSTR2) en células infectadas, lo que facilita imágenes moleculares después del suministro sistémico mediante el uso de ^{111}In -pentetreotida (McCart y otros, 2004).

I. Cultivo celular

50 La producción viral basada en células se ha examinado para alternativas a la vacunación DRYVAX® y para la producción del uso del virus vaccinia en el campo de la inmunoterapia viral y la terapia génica. Se ha desarrollado una cepa de vacuna de virus vaccinia de segunda generación cultivada en la línea celular Vero de riñón de mono llamada ACAM2000. En estos estudios, el virus se purificó eficazmente a partir de cultivos celulares. Además, las vacunas 55 contra el cáncer que emplean virus vaccinia en combinación con antígenos tumor específicos (*es decir*, PSA, CEA) y moléculas inmunoestimuladoras (*es decir*, B7.1, ICAM-1 y LFA-1) también se han producido en células y se han administrado a pacientes en ensayos clínicos de fase I y II (Li, y otros, 2005; Guo y Bartlett, 2004). Sin embargo, en los dos casos anteriores, los pacientes recibieron administración local en lugar de sistémicas de preparaciones virales, y a menudo recibieron una fracción de la dosis total de virus que se requiere para la eficacia oncolítica *in vivo*.

60 En comparación con otros virus que se han presentado como candidatos de virus oncolíticos, los poxvirus tales como vaccinia representan algunos desafíos únicos en la fabricación y purificación a gran escala. Como algunos de los virus más grandes en la naturaleza, los poxvirus son visibles por microscopía de luz y miden de 200-400 nm de longitud (Moss, en Fields' virology B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, Eds. (Lippincott Williams & Wilkins, 65 Filadelfia, 2001) pp. 2849-2883). Debido a su gran tamaño, el virus vaccinia no se puede esterilizar por filtración y, por lo tanto, cualquier proceso de fabricación generalmente se cierra.

Dado que su ciclo de vida completo ocurre dentro del citoplasma de la célula huésped, la mayor parte de las partículas infecciosas no se liberan en el medio celular, sino que se retienen dentro de la célula infectada, por lo tanto, la purificación requiere la lisis de la célula infectada y la purificación de las partículas virales a partir de los restos celulares.

En la morfogénesis de los poxvirus, adquieren membranas a partir de síntesis de membrana *de novo* al principio en la morfogénesis, y luego adquieren membranas adicionales a partir del golgi del huésped (Moss, en Fields' virology B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, Eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2001) pp. 2849-2883).

Los métodos actuales de acuerdo con la divulgación están dirigidos a un proceso de célula adherente desarrollado para producir virus de grado GMP para ensayos de cáncer. El proceso de célula adherente puede realizarse en condiciones libres de suero o en presencia de suero. Los objetivos de productividad para la plataforma de fabricación descrita en la presente descripción son al menos 30, 100, 125, 150, 200 o más pfu/célula - la concentración de virus estimada por dosis es de aproximadamente 10⁹ pfu/ml.

Una modalidad de la divulgación está dirigida a procedimientos para la producción de JX-594 de alto título en cultivo celular. Se probó una variedad de líneas celulares humanas y se descubrió que HeLa, una línea celular de cáncer cervical humano, apoyaba la replicación robusta del virus en cultivos adherentes. Los presentes métodos de la divulgación no se limitan a las células HeLa y se pueden usar otras células adherentes en el proceso de producción, pero actualmente las células HeLa proporcionan el mejor modo de línea celular para la producción del virus vaccinia.

El enfoque típico para evaluar la productividad del virus es realizar un ensayo de placa estándar, que implica una serie de diluciones seguida de un período de 2-3 días de espera a que se formen las placas y luego el cálculo del título. Como alternativa, se ha estandarizado un enfoque de PCR cuantitativo (Q-PCR) que permite la determinación del número de genomas virales producidos después de la infección. Se han optimizado los cebadores de amplificación que nos permiten cuantificar el número de copias del gen viral E9L en células infectadas y se han correlacionado estos resultados con los datos de nuestro ensayo de placa estándar. La ventaja de este enfoque es que se puede adaptar a un formato de 96 pocillos y los datos están disponibles en cuestión de horas en lugar de días. Por lo tanto, el tamiz estándar inicial de medios y suplementos, tiempo de recolección y los efectos de la concentración del virus de entrada se pueden realizar y analizar rápidamente en placas de 96 pocillos. Después de este tamiz inicial, todos los "aciertos" positivos se confirmaron con el ensayo clásico de placa.

Los componentes que se encuentran en medios libres de suero comerciales se probaron por su efecto en la productividad del virus. La línea celular HeLa S3 se ha adaptado para crecer en suspensión y en nuestras manos estas células crecen también en medio en suspensión libre de suero EX-CELL™ HeLa (SAFC Biosciences) al igual que las células adherentes en medios que contienen suero. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, a pesar de las excelentes características de crecimiento celular, los inventores observaron un crecimiento de virus muy pobre en este medio (menos de una partícula de virus por célula infectada). Aunque la formulación exacta del medio libre de suero EX-CELL™ HeLa está patentada, un componente conocido de este medio libre de suero es el polisacárido sulfatado, sulfato de dextrano, aparentemente añadido para ayudar a prevenir la aglomeración de células. Sin embargo, también se sabe que el sulfato de dextrano inhibe la replicación de una amplia variedad de virus envueltos, incluidos retrovirus, herpesvirus, rabdovirus y aeronavirus (De Clercq, 1993). Hay aproximadamente 20 mg/L de sulfato de dextrano en el medio EX-CELL. Se usaron y evaluaron una variedad de concentraciones de sulfato de dextrano en el ensayo rápido descrito anteriormente. Se descubrió que el sulfato de dextrano tuvo un impacto negativo dependiente de la dosis en la productividad del virus, un hallazgo confirmado posteriormente mediante el uso de los ensayos de titulación clásicos. Si bien la eliminación del sulfato de dextrano mejora la productividad del virus, todavía está por debajo de la productividad que se logra habitualmente con células HeLa adherentes en medios que contienen suero. Otros componentes de los medios que afectan la productividad del virus incluyen Pluronic F-68, un tensioactivo de copolímero de bloque difuncional que generalmente no es tóxico para las células; Tween-80, un detergente de uso común; e hidrolizado de soja. En ciertos aspectos de la invención, el medio carecerá de uno o más de sulfato de dextrano, Pluronic F-68, Tween-80 e hidrolizado de proteína de soja. Ejemplos de algunas de estas formulaciones de medios y suplementos de suero se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones y suplementos de medio de cultivo

Nombre de los medios	Proveedor
ExCell HeLa SFM	SAFC
ExCell 293 SFM	SAFC
OPTIPRO SFM	Invitrogen
UltraCulture	Cambrex
CHO-S-SFM II	Invitrogen

(continuación)

5

10

Nombre de los medios	Proveedor
293 SFM II	Invitrogen
VP-SFM	Invitrogen
IS-293-V	Irvine Scientific
BD Nu Serum replacements	BD Biosciences

15

Ya que el virus vaccinia prefiere el contacto de célula a célula para una diseminación eficiente, es posible que los cultivos de células en suspensión puedan estar limitados por una deficiente transmisión del virus de célula a célula. En ciertos aspectos, se puede promover la aglomeración de las células o se pueden cultivar células en microportadores o el cultivo adherente puede ser suficiente para la producción viral.

20

25

En un ejemplo no limitante, se usaron las siguientes condiciones para el crecimiento de JX-594, que consistentemente resultan en títulos de más de 100 pfu/célula. Las células se establecieron en botellas giratorias a 4×10^4 células/cm² y se cultivaron durante 2 días en cultivo. A ese tiempo, se elimina el medio de crecimiento y se añade medio fresco que contiene 10⁴ pfu/ml de JX-594. Las células se mantienen durante 60-70 horas adicionales, tiempo en el que se recolectan las células y se recolectan los virus. Esta configuración puede producir aproximadamente 170 dosis (10⁹ pfu/dosis) de JX-594. Durante este proceso, los inventores descubrieron factores que no anticipan que hayan tenido un efecto dramático en la producción viral. Por ejemplo, el pH de los medios tiene un efecto en la replicación de JX-594. La producción viral se optimizó en un medio bien tamponado a un pH de 7,3. La productividad de los cultivos adherentes es significativamente mejor que todos los intentos de cultivos en suspensión.

30

Para garantizar la producción de preparaciones virales de alta calidad que estén suficientemente libres de productos contaminantes, se pueden usar varios ensayos para el análisis de la pureza y/o calidad del virus. Estos ensayos garantizarán que las preparaciones virales sean comparables con otros lotes confirmados de preparación de virus y garantizarán que el proceso sea exitoso.

35

40

45

Característica	Método
Título de infectividad	Ensayo de placa
Potencia: citotoxicidad	DE ₅₀ en células U2OS
Título del genoma	qPCR para E9L
ADN total	pico green
ADN de la célula huésped, cantidad	qDNA-PCR
Proteína total (ug/ml)	BCA
Proteína de la célula huésped (integral)	ELISA (Cygnus)

50

En ciertas modalidades, el virus vaccinia puede aislarse y purificarse. El método para la purificación del virus vaccinia puede incluir: a. cargar una matriz en fase sólida con un virus vaccinia contenido en una fase líquida; b. lavar la matriz, y c. eluir el virus vaccinia.

55

En ciertos aspectos, la matriz puede comprender un ligando que se une a vaccinia. El ligando puede unirse a la matriz en fase sólida al unirse o acoplarse a la matriz. La interacción entre el ligando y el virus forma un complejo reversible, por lo tanto, el virus está retenido reversiblemente por la matriz. En ciertos aspectos, la glucosamina glicano (GAG), en particular heparán sulfato o heparina, o una sustancia similar a GAG se usa como ligando. Como se usa en la presente descripción, los "glicosaminoglicanos" (GAG) son polisacáridos largos no ramificados que consisten en una unidad de disacárido repetitiva.

60

El ligando puede ser una molécula biológica como, por ejemplo, un péptido y/o una lectina y/o un anticuerpo y/o, preferentemente, un carbohidrato. El ligando también puede comprender o consistir en sulfato. En una modalidad adicional, el ligando comprende uno o más grupos sulfato cargados negativamente.

65

En ciertos aspectos, el ligando es una molécula hidrofóbica como, por ejemplo, un grupo fenilo aromático, un grupo PPG, un grupo butilo o un grupo hexilo.

- 5 En un aspecto, el método comprende la purificación del virus vaccinia con cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). En una modalidad adicional, el método comprende la purificación del virus vaccinia con HIC junto con cromatografía de afinidad. El uso de HIC puede proporcionar altos rendimientos de virus con grandes reducciones en contaminantes de ADN y proteínas. El nivel de contaminación de ADN se puede reducir a 0,01 % del material de partida inicial y el nivel de contaminación de proteínas se puede reducir a menos de 0,1 %.
- En ciertos aspectos, la celulosa sulfatada se puede usar con cromatografía HIC de columna de fenilo para rendir partículas de virus con altos rendimientos y niveles de pureza.
- 10 En ciertos aspectos, el ADN se degrada o elimina antes o después de la purificación del virus vaccinia. El ADN puede eliminarse mediante tratamiento con nucleasa, tal como un tratamiento con Benzonase®. El tratamiento con nucleasa reduce la probabilidad de que las vacunas o los vectores virales contengan oncogenes intactos o secuencias de ADN funcional adicionales.
- 15 En aspectos relacionados, las proteínas se degradan o eliminan antes o después de la purificación del virus vaccinia. Las proteínas pueden eliminarse mediante un tratamiento con proteasa, tal como tratamiento de TrypLE™ Select. Preferentemente, se emplea una combinación de tratamiento con nucleasa y proteasa para reducir o eliminar el ADN y las proteínas contaminantes de HeLa.
- 20 La matriz puede ser un gel, perla, pocillo, membrana, columna, etc. En una modalidad preferida de la invención, la fase sólida es una membrana, en particular una membrana de celulosa. Se puede usar una amplia gama de polímeros modificados capaces de unirse al virus. Ejemplos de tales polímeros son los derivados de celulosa (ésteres de celulosa, hidrato de celulosa, acetato de celulosa, nitrato de celulosa); agarosa y sus derivados; polisacáridos tales como quitina o quitosano; poliolefinas (polipropileno); polisulfona; polietersulfona; poliestireno; poliamidas aromáticas y alifáticas; polisulfonamidas; polímeros halogenados (cloruro de polivinilo, fluoruro de polivinilo, fluoruro de polivinilideno); poliésteres; homo y copolímeros de acrilnitrilo.
- 25 El virus vaccinia se puede purificar bajo condiciones asépticas para obtener una preparación de virus activo, estable y altamente puro. Los virus vaccinia pueden ser nativos o recombinantes.
- 30 Como se usa en la presente descripción, los "contaminantes" cubren cualquier sustancia no deseada que pueda originarse de las células huésped usadas para el crecimiento del virus (por ejemplo, ADN o proteínas de la célula huésped) o de cualquier aditivo usado durante el proceso de fabricación que incluye corriente arriba (por ejemplo, gentamicina) y corriente abajo (por ejemplo, benzonasa).
- 35 Como se usa en la presente descripción, la fabricación a "escala industrial" o "gran escala" del virus vaccinia o el virus vaccinia recombinante comprende métodos capaces de proporcionar un mínimo de 50 000 dosis de $1,0 \times 10^8$ partículas de virus (mínimo total $5,0 \times 10^{12}$ partículas de virus) por lote (corrida de producción).
- 40 Como se usa en la presente descripción, se investiga la "pureza" de la preparación o vacuna del virus vaccinia en relación con el contenido de impurezas de ADN, proteína, benzonasa y gentamicina. La pureza se expresa como impureza específica, que es la cantidad de cada impureza por dosis (por ejemplo, ng de ADN/dosis).
- 45 Como se usa en la presente descripción, "estabilidad" significa una medida de cómo la calidad de la preparación del virus (Sustancia Farmacológica a Granel (BDS) o Producto Farmacológico Final (FDP)) varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores ambientales como la temperatura, humedad y luces, y establece un período de prueba para la BDS o una vida útil para el FDP en las condiciones de almacenamiento recomendadas.
- 50 El ligando hace posible la elución del virus vaccinia unido bajo condiciones tan leves que el virus vaccinia retiene completamente su actividad biológica. Esto significa que el virus es infeccioso. La infectividad del virus vaccinia se puede preservar durante la purificación de manera que al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la TCID₅₀ inicial (dosis media infectiva en cultivo de tejidos) se retiene durante la purificación. Preferentemente, al menos el 30 % de la TCID₅₀ inicial se retiene durante la purificación.
- 55 En una modalidad, la matriz de fase sólida es un gel o membrana con un tamaño de poro de 0,25 µm, preferentemente de más de 0,25 µm, más preferentemente de 1,0-3,0 µm lo que demuestra una velocidad de flujo lineal bajo condiciones de purificación reales de 10 cm/min a 20 cm/min. El tamaño de poro de la matriz puede ser de 0,25-0,5 µm; 0,5-0,75 µm; 0,75-1,0 µm; 1,0-2,0 µm; 2,0-3,0 µm; o mayor que 3,0 µm.
- 60 La carga de la fase sólida con un ligando puede realizarse mediante un enfoque por lotes, columna o membrana.
- El enfoque de membrana puede tener algunos beneficios para la purificación de virus grandes como los virus vaccinia. Los grandes tamaños de poro y la disponibilidad del ligando en la superficie de la membrana permiten altas capacidades de unión de incluso partículas virales grandes.
- 65

En una modalidad, el virus se une al ligando en sulfato de amonio, por ejemplo, a 0,2 M; 0,4 M; 0,6 M; 0,8 M; 1,0 M; 1,2 M; 1,4 M; 1,6 M; 1,8 M o 2,0 M.

5 Cuando la unión de los virus vaccinia o los virus recombinantes al ligando o matriz se ha producido de manera suficiente, los contaminantes de la célula huésped (en particular, el ADN y las proteínas de la célula huésped) que permanecen en la fase líquida pueden eliminarse por lavado de la matriz a la que se une el virus vaccinia, con un medio de lavado apropiado. En un aspecto, la matriz se lava con sulfato de amonio a 0,2 M; 0,4 M; 0,6 M; 0,8 M; 1,0 M; 1,2 M; 1,4 M; 1,6 M; 1,8 M o 2,0 M.

10 Los virus vaccinia o los virus recombinantes unidos pueden eluirse de la matriz. La elución del virus vaccinia capturado puede realizarse mediante agentes que interrumpen específicamente la interacción específica entre el ligando o la matriz y el virus vaccinia, o mediante agentes que interrumpen de forma no específica la interacción electrostática entre el ligando o la matriz y la proteína de la superficie. En un aspecto, el agente es sulfato de amonio. En otro aspecto, el virus vaccinia puede eluirse con GAG o un ligando similar a GAG. En otro aspecto, el agente es cloruro de sodio, más preferentemente, un gradiente de concentración creciente de NaCl que varía de 0,15 M a 2,0 M.

15 Antes de cargar en la matriz, se puede realizar un pretratamiento de la suspensión del virus, específicamente para eliminar los contaminantes del virus vaccinia en el cultivo en fase líquida. El pretratamiento puede ser uno o más de los siguientes pasos, ya sea solo o en combinación: homogeneización de las células huésped, tratamiento con ultrasonido, congelación/descongelación, lisis hipoosmótica, tratamiento de alta presión, centrifugación, filtración, tratamiento con nucleasa, tratamiento con proteasa, intercambio catiónico, precipitación selectiva.

20 En dependencia del agente usado para la elución del virus vaccinia o el virus recombinante, se puede realizar un tratamiento posterior para mejorar la pureza de la preparación del virus. El tratamiento posterior podría ser ultra/diafiltración para la eliminación adicional de impurezas y/o agentes específicos o no específicos usados para la elución.

25 Típicamente, el valor de pH aumenta después de la elución del virus, en particular a un valor de pH de hasta 9 o más, en particular a pH 7,5; 7,6; 7,8; 8,0; 8,2; 8,4; 8,5; 8,6; 8,8; 9,0; 9,2; 9,4; 9,5; 9,6; 9,8; 10,0; 10,2; 10,4 o 10,5.

30 La práctica de la invención emplea técnicas en biología molecular, análisis de proteínas y microbiología, que están dentro del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en, por ejemplo, Ausubel y otros 1995, eds, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York.

35 II. Ejemplos de referencia

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar diversas modalidades de la divulgación y no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos objetos, fines y ventajas inherentes a la presente descripción. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en la presente descripción, son actualmente representativos de las modalidades preferidas de la divulgación, son ejemplares y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la invención. Los cambios en el mismo y otros usos que están abarcados dentro de la invención, como se define por el alcance de las reivindicaciones, se les ocurrirán a aquellos expertos en la técnica.

40 Se probó una variedad de líneas celulares humanas para la producción de JX-594. Brevemente, las células HeLa adherentes, las células A549, las células MCF-7, las células M14, las células U-2 OS, las células HeLa S3 suspendidas y las células HeLa S3 adherentes se infectaron con JX-594 a una multiplicidad de infección de 0,1 y los lisados se colectaron a 72 horas después de la infección y el título del virus se determinó en células U-2 OS. Los resultados se ilustran en la figura 1. Se obtuvieron resultados sorprendentemente buenos en células HeLa adherentes.

45 Se examinaron diversos parámetros en un esfuerzo por optimizar la producción de virus en células HeLa adherentes. Se descubrió que el pH del medio de infección tiene un efecto inesperadamente dramático en la producción viral (véase la figura 2). La producción de JX-594 aumentó de aproximadamente 12 pfu/célula a un pH medio de infección de 7,1 a aproximadamente 60 pfu/célula a un pH medio de infección de 7,3 en condiciones idénticas. Cuando el pH del medio de infección era inferior a 7,1; la producción de virus era casi inexistente. Se observaron mejoras adicionales en la producción viral cuando la multiplicidad de infección estaba dentro del rango de 0,005 y 0,05; particularmente entre 0,01 y 0,03 y cuando la temperatura se mantuvo entre 36 °C y 37,5 °C durante y después de la infección. El uso de botellas giratorias de plástico como superficie adherente también contribuyó al alto rendimiento del virus.

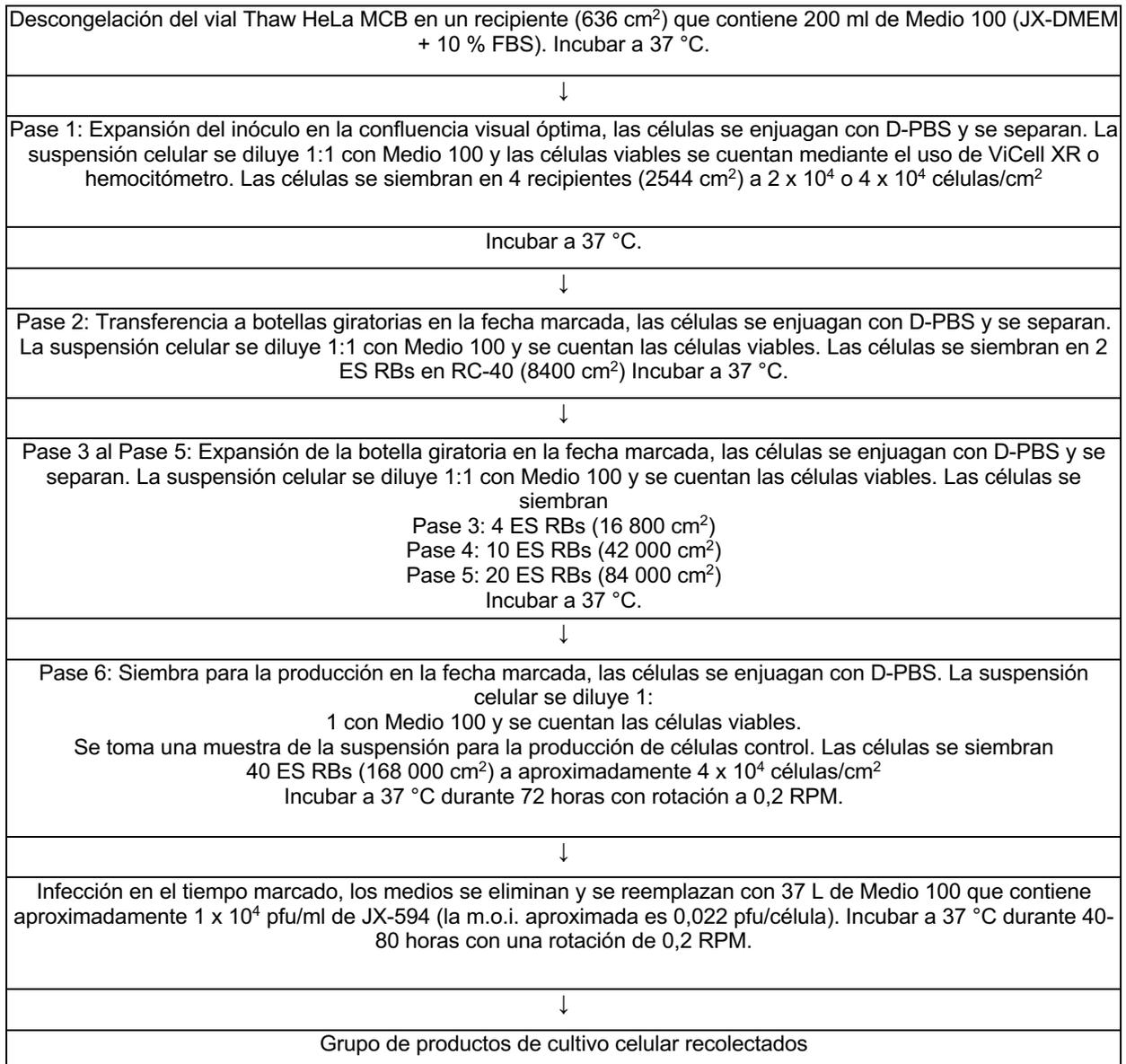
50 La presencia y la cantidad de suero en el medio usado para cultivar las células HeLa adherentes antes de la infección también se determinó que afecta el rendimiento del virus. Se obtuvo un rendimiento óptimo cuando el medio contenía FBS al 10 % - la disminución de la cantidad de suero en el medio dio como resultado una pérdida correspondiente del rendimiento del virus. No obstante, la optimización de otros parámetros (por ejemplo, pH, multiplicidad de infección, superficie adherente) contrarresta la pérdida de rendimiento atribuible a la disminución de las concentraciones de suero en cierto grado.

ES 2 813 413 T3

La presencia y cantidad de suero en el medio de infección, sin embargo, no afectó sustancialmente el rendimiento del virus. Por lo tanto, para obtener un rendimiento sorprendentemente bueno de virus vaccinia en células HeLa adherentes de acuerdo con la presente invención, el medio de infección puede comprender suero o puede estar sustancialmente libre de suero.

Un diagrama de flujo que describe un ejemplo no limitante del proceso corriente arriba optimizado se muestra a continuación:

Proceso corriente arriba de JX-594



Descongelación del vial y expansión del inóculo. El proceso corriente arriba se inicia por descongelación de un número suficiente de viales de un banco de células. La suspensión celular resultante se incuba en un recipiente de cultivo celular de poliestireno (636 cm²) (Nunc Nalgene). Las células se cultivan mediante el uso de protocolos de cultivo celular generalmente aplicados a una cierta confluencia (aproximadamente 80-95 %) determinada por evaluación visual

En el Pase 1, se eliminan los medios, las células se enjuagan con PBS y se separan del recipiente de cultivo. Las células viables se cuentan mediante el uso de un Vi-Cell XR (Beckman Coulter) o un hemocitómetro y luego se siembran a una densidad de 1x10⁴ a 6x10⁴ células/cm² en cuatro recipientes de cultivo de poliestireno (área total 2544 cm²), cada uno con 200 ml de Medio-100. El cultivo se incuba a 37 °C.

Si el cultivo se siembra a 2×10^4 , entonces la fecha marcada para el próximo pase es 4 días después de la siembra. Si el cultivo se siembra a 4×10^4 , entonces la fecha marcada para el próximo pase es 3 días después de la siembra. El proceso se define para proporcionar aproximadamente 1×10^5 células/cm² en el momento de cada pase.

- 5 Expansión del cultivo celular de la botella giratoria. En la fecha marcada para el Pase 2, se eliminan los medios, las células se enjuagan con PBS y se separan de los recipientes de cultivo de poliestireno.

10 Las células se siembran a una densidad de 1×10^4 a 6×10^4 células/cm² en dos superficies extendidas (ES) de botellas giratorias de poliestireno (RBs, Cellon) en el aparato de botella giratoria RC-40 (Synthecon, superficie total 8400 cm²). Cada botella se cultiva con 900 ml de Medio 100 y el cultivo celular se incuba a 37 °C en una incubadora RC-40 (Sanyo).

15 En la fecha marcada para el Pase 3, se eliminan los medios de cultivo celular, las células se enjuagan con PBS y se separan. La suspensión celular se recoge de las botellas de ES, se mezcla 1:1 con Medio 100 y se cuentan las células viables. La cantidad apropiada de suspensión celular se siembra luego en 4 ES RBs (área de superficie total 16 800 cm²) de 1×10^4 a 6×10^4 células/cm². El cultivo celular se incuba a 37 °C con 900 ml de medio en cada botella.

20 Durante el Pase 4, el cultivo celular se transfiere a 10 RBs (área de superficie total 42 000 cm²) y durante el Pase 5, el cultivo celular se expande a 20 RBs (área de superficie total 84 000 cm²). El Pase 6 es el primer paso crítico del proceso de producción de JX-594 como el cultivo celular se expande la densidad celular no se cuenta en el momento de la infección, pero se espera que sea a 1×10^5 células/cm² en base al historial de pases. La duración de la infección se controla dentro del rango de 40-80 horas, y preferentemente es de aproximadamente 44 horas. La temperatura del cultivo celular durante la infección es un parámetro crítico del proceso y se controla a 37 °C.

25 Los títulos de virus de hasta e incluso más de 100 pfu/célula se obtienen regularmente de acuerdo con el proceso.

30 Proceso corriente abajo de JX-594. Los métodos clásicos para la preparación a pequeña escala de poxvirus a partir de células han incluido la lisis hipotónica, seguida de rondas de congelación, descongelación y sonicación. Los presentes inventores han descubierto que tanto la congelación/descongelación como la sonicación son pasos en gran medida innecesarios que a menudo resultan en títulos de virus disminuidos. En consecuencia, el procesamiento corriente abajo de JX-594 emplea tratamiento con nucleasa (Benzonase) para digerir el ADN de HeLa y proteasa (TrypLE™ Select) para digerir las proteínas de HeLa, seguido de filtración de flujo tangencial (TFF). El tratamiento del cultivo crudo (que contiene virus y restos celulares en el tampón de lisis hipotónica) con benzonasa dio como resultado un ADN del huésped (HeLa) significativamente menos contaminante en la preparación. Por lo tanto, el tratamiento con nucleasa combinado con TFF proporciona una preparación de virus significativamente pura con ADN y proteínas del huésped significativamente menos contaminantes en la preparación mientras retiene el título infeccioso del virus. En particular, la reducción en la contaminación de ADN de 40 µg de ADN/dosis a 3 µg de ADN/dosis y la reducción de la contaminación de proteínas de 12 mg de proteína/dosis a 4 mg de proteína/dosis (dosis = 1×10^9 pfu de JX-594) se han logrado mediante el uso de una combinación de tratamiento con nucleasa/proteasa y TFF. Se pueden lograr reducciones adicionales al emplear uno o más pasos cromatográficos. En un aspecto, el uno o más pasos cromatográficos comprenden cromatografía de intercambio iónico. En otro aspecto, el uno o más pasos cromatográficos comprende cromatografía de pseudoafinidad basada preferentemente en heparina (o moléculas similares a heparina) o celulosa sulfatada, al aprovechar la capacidad de unión a heparina de la proteína A27L del virus vaccinia. En otro aspecto más, el uno o más pasos cromatográficos comprenden cromatografía de adsorción de membrana, por ejemplo, cromatografía de afinidad de membrana. Las membranas preferidas tendrán una estructura microporosa con un tamaño de poro de al menos 3 µm de pasos cromatográficos. En un aspecto, el uno o más pasos cromatográficos comprenden cromatografía de intercambio iónico. En otro aspecto, el uno o más pasos cromatográficos comprenden cromatografía de pseudoafinidad preferentemente basada en heparina (o moléculas similares a heparina) o celulosa sulfatada, al aprovechar la capacidad de unión a heparina de la proteína A27L del virus vaccinia. En otro aspecto más, el uno o más pasos cromatográficos comprenden cromatografía de adsorción de membrana, por ejemplo, cromatografía de afinidad de membrana. Las membranas preferidas tendrán una estructura microporosa con un tamaño de poro de al menos 3 µm.

Referencias

- 55 1. B. Moss, in *Fields' virology* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, Eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2001) pp. 2849-2883.
 2. J. B. Johnston, G. McFadden, *Cell Microbiol* 6, 695 (agosto, 2004).
 3. C. J. Breitbach y otros, *Mol Ther* 15, 1686 (septiembre, 2007).
 60 4. J. H. Kim y otros, *Mol Ther* 14, 361 (septiembre, 2006).
 5. R. M. Buller, G. L. Smith, K. Cremer, A. L. Notkins, B. Moss, *Nature* 317, 813 (31 de octubre-6 de noviembre, 1985).
 6. R. M. Buller, G. J. Palumbo, *Microbiol Rev* 55, 80 (marzo, 1991).
 7. M. Hengstschlager y otros, *J Biol Chem* 269, 13836 (13 de mayo, 1994).
 65 8. T. C. Liu, E. Galanis, D. Kirn, *Nat Clin Pract Oncol* 4, 101 (febrero, 2007).
 9. C. Y. Li, Q. Huang, H. F. Kung, *Cell Mol Immunol* 2, 81 (abril, 2005).

10. J. W. Hodge y otros, *Front Biosci* 11, 788 (2006).
11. P. D. Ellner, *Infection* 26, 263 (septiembre-octubre, 1998).
12. F. Fenner, *Prog Med Virol* 23, 1 (1977).
- 5 13. A. W. Artenstein y otros, *Vaccine* 23, 3301 (9 de mayo, 2005).
14. T. P. Monath y otros, *Int J Infect Dis* 8 Suppl 2, S31 (octubre, 2004).
15. Z. S. Guo, D. L. Bartlett, *Expert Opin Biol Ther* 4, 901 (junio, 2004).
16. E. De Clercq, *Adv Virus Res* 42, 1 (1993).
17. L. A. Palomares, M. Gonzalez, O. T. Ramirez, *Enzyme Microb Technol* 26, 324 (1 de marzo, 2000).
- 10 18. B. Horowitz, M. E. Wiebe, A. Lippin, M. H. Stryker, *Transfusion* 25, 516 (noviembre-diciembre, 1985).
19. M. P. Piet y otros, *Transfusion* 30, 591 (septiembre, 1990).
20. B. H. Chun, Y. Kwon Lee, W. G. Bang, N. Chung, *Biotechnol Lett* 27, 243 (febrero, 2005).
21. B. H. Chun, Y. K. Lee, B. C. Lee, N. Chung, *Biotechnol Lett* 26, 807 (mayo, 2004).
22. J. A. McCart y otros, *Cancer Res* 61, 8751 (15 de diciembre, 2001).
- 15 23. S. H. Thorne y otros, *J Clin Invest* 117, 3350 (noviembre, 2007).
24. A. M. Naik y otros, *Hum Gene Ther* 17, 31 (enero, 2006).
25. J. A. McCart y otros, *Mol Ther* 10, 553 (septiembre, 2004).
26. A. Piccini, E. Paoletti, *Adv Virus Res* 34, 43 (1988).
27. C. S. Chung, J. C. Hsiao, Y. S. Chang, W. Chang, *J Virol* 72, 1577 (febrero, 1998).
- 20 28. A. Karger, B. Bettin, H. Granzow, T. C. Mettenleiter, *J Virol Methods* 70, 219 (febrero, 1998).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un virus vaccinia de la cepa Wyeth o Western Reserve que comprende:
 - (a) infectar las células HeLa adheridas a una superficie con un virus vaccinia al poner en contacto las células HeLa con el virus vaccinia en una multiplicidad de infección (m.o.i.) de entre 0,01 y 0,05 unidades formadoras de placa (pfu)/célula;
 - (b) cultivar las células infectadas en un medio de infección que comprende de 0 % - 10 % de suero y que tiene un pH, de aproximadamente 7,2; o aproximadamente 7,3 o aproximadamente 7,4 durante un período de 40-80 horas a una temperatura entre 36 °C y 37,5 °C; y
 - (c) recolectar el virus vaccinia del cultivo, por lo que se producen al menos 50 pfu de virus vaccinia por célula HeLa, en donde las células HeLa se cultivan en una o más botellas giratorias o en un biorreactor que comprende un área de cultivo acumulativo de al menos 168 000 cm².
2. El método de la reivindicación 1, en donde la densidad de las células HeLa adheridas está entre 10¹ y 10⁶, preferentemente aproximadamente de 10⁵ células HeLa/cm² durante el paso (a).
3. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la concentración del virus vaccinia durante el paso (a) está entre 10³ y 10⁵ pfu/ml, preferentemente aproximadamente 10⁴ pfu/ml.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el pH del medio de infección es aproximadamente 7,3.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde los pasos (a) y (b) se realizan a una temperatura de 37 °C.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el paso (b) se realiza durante un período de aproximadamente 44 horas.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde se produce al menos 75 pfu de virus vaccinia por célula HeLa.
8. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el medio:
 - no comprende uno o más de los siguientes: sulfato de dextrano, Pluronic® F-68, polisorbato 80 e hidrolizado de soja; y/o
 - comprende suero fetal bovino y preferentemente comprende menos del 10 % de suero fetal bovino, o no comprende suero.
9. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la m.o.i. del paso (a) es de aproximadamente 0,02 pfu/célula.
10. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el virus recolectado se somete a uno o más pasos de purificación que comprenden opcionalmente uno o más de los siguientes (a) tratamiento del virus recolectado con una nucleasa para eliminar los ácidos nucleicos de las células HeLa y/o una proteasa para eliminar las proteínas de las células HeLa (b) filtración de flujo tangencial (c) cromatografía de afinidad de heparina y (d) cromatografía de absorción de membrana.
11. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el virus vaccinia:
 - comprende una región codificante heteróloga que codifica un polipéptido inmunoestimulador tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y/o
 - carece de un gen funcional de timidina quinasa.
12. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la expansión del cultivo de HeLa antes de la infección.
13. El método de la reivindicación 12, en donde las células HeLa se pasan a través de al menos un recipiente de cultivo de botella giratoria que tiene un área de cultivo aumentada en comparación con el recipiente de cultivo anterior.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el intervalo entre la siembra del recipiente de cultivo de botella giratoria y la infección está entre 48 y 96 horas.

15. El método de la reivindicación 1, en donde el virus vaccinia es un virus vaccinia de la cepa Wyeth que carece de un gen funcional de timidina quinasa, y preferentemente en donde el virus vaccinia es JX-594.

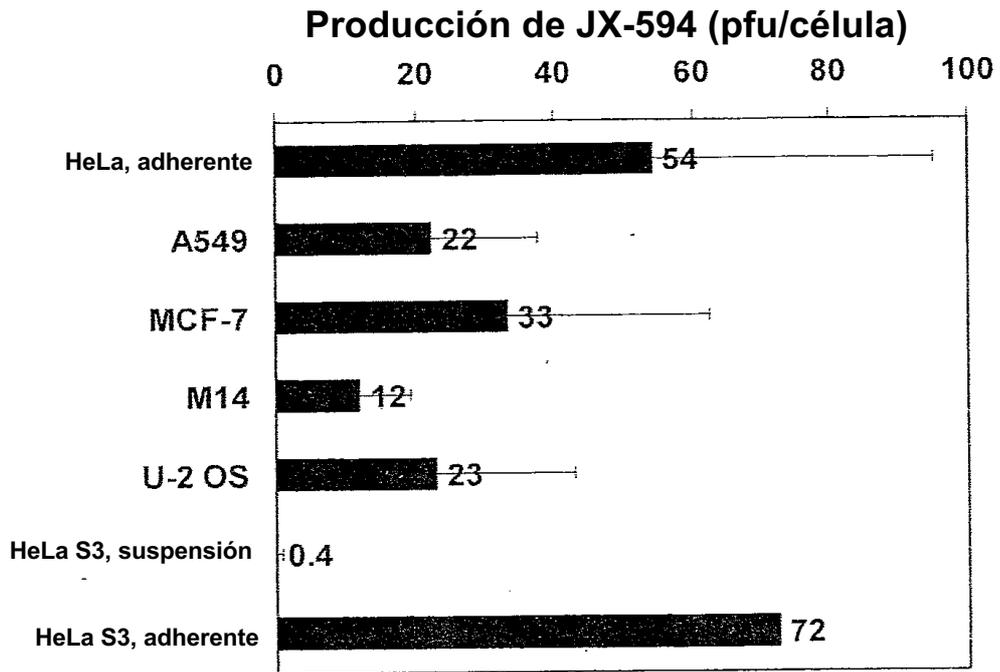


Figura 1

Efecto del pH en la producción de JX-594

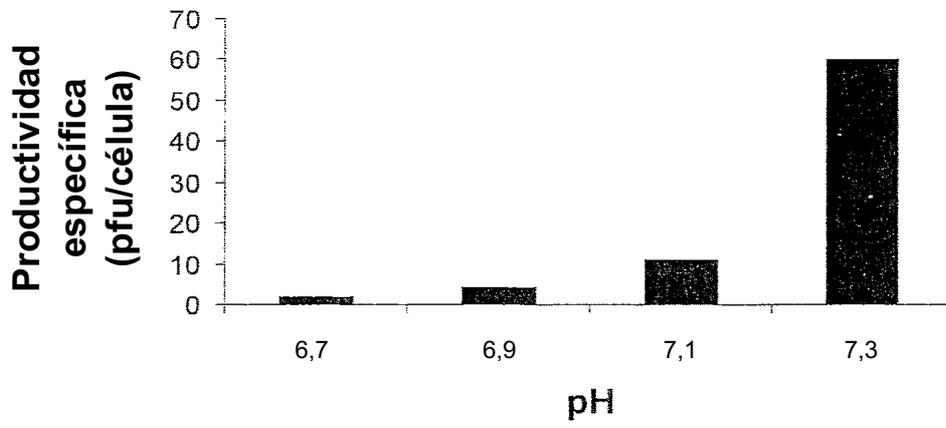


Figura 2