

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 928**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014 PCT/EP2014/073986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071177**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14798760 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3068791**

54 Título: **Eliminación de impurezas de cultivos celulares residuales**

30 Prioridad:

15.11.2013 US 201361904747 P

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

08.04.2021

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**NORMAN, CARNLEY;
SUDA, ERIC;
DOWLESS, KAYLA;
ASTIGARRAGA, RUIZ;
BASTEK, PATRICK y
YANNONE, VAISHALI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 817 928 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

Eliminación de impurezas de cultivos celulares residuales

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud de patente internacional reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/904.747 presentada el 15 de noviembre de 2013 y la Solicitud Europea 13199257.0 presentada el 20 de diciembre de 2013.

10

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a la producción de proteínas en células huésped y a métodos de purificación mejorados de las mismas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Con anterioridad se han descrito varios métodos para producir vacunas y otros productos biológicos en cultivos celulares. Si se usan líneas celulares continuas para la producción, hay riesgo de que el ADN residual de la línea celular pueda ser oncogénico. Por lo tanto, se requiere destruir y eliminar el ADN residual de las proteínas terapéuticas de interés. Para las vacunas virales, la FDA actualmente recomienda una cantidad de ADN de menos de 10 ng/dosis y un tamaño de fragmento de menos de 200 pares de bases ((Guidance of Industry. Characterization and Qualification of Cell Substrates and other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infections Disease Indications. FDA/CBER febrero de 2010; descargable de: <http://www.fda.gov/downloads/Mologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm202439.pdf>).

Se han descrito varios métodos para eliminar el ADN residual de las vacunas derivadas de cultivos celulares. La Patente de Estados Unidos 5.948.410 describe un método para producir vacunas contra la gripe derivadas del cultivo celular en el que un tratamiento de ADNsa se combina con un paso de división usando CTAB. La WO 2007/052163 describe un método para producir vacunas contra la gripe derivadas del cultivo celular en el que se usa beta propiolactona (BPL) para inactivar el virus y degradar el ADN residual. Posteriormente, el virus se divide, por ejemplo, por tratamiento con CTAB. El ADN fragmentado se elimina luego de la preparación del virus. Sin embargo, todavía existe la necesidad de mejorar aún más la eliminación del ADN celular residual de la preparación del virus de la gripe o de otros productos de interés producidos en líneas celulares continuas.

El uso de ácido caprílico en combinación con cromatografía de intercambio iónico para la eliminación de ADN celular de anticuerpos producidos en cultivo celular se ha divulgado en la US 2012-0101262. Sin embargo, la US 2012-0101262 requiere el uso de ácido caprílico en condiciones que inducen la precipitación de ADN residual y proteínas contaminantes (en particular a pH bajo). Posteriormente, el precipitado y la proteína de interés pueden separarse, y este último se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico.

En la técnica se han descrito varios otros métodos para eliminar impurezas y agregados derivados de cultivos celulares usando ácido caprílico o sales de caprilato. Steinbuch (Steinbuch, M. et al. Arch.Biochem.Biophys. 134:279-94 (1969) describe la recuperación de IgG del plasma humano mediante la precipitación por caprilato de virus no envueltos y envueltos en la misma. La patente de Estados Unidos 7.553.938 describe la purificación de anticuerpos a partir de una solución de partida mediante la adición de iones de caprilato o heptanoato a pH de 4,6 a aproximadamente 4,95 y filtrando la solución a través de por lo menos una resina de intercambio aniónico. La Patente de Estados Unidos 5.886.154 describe un proceso para la purificación de anticuerpos del plasma humano que implica la suspensión de anticuerpos a un pH de 3,8 a 4,5 seguido de la adición de ácido caprílico a un pH de 5,0 a 5,2 para precipitar proteínas y lípidos contaminantes mientras los anticuerpos permanecen en solución. El uso de ácido caprílico se emplea en la purificación de anticuerpos porque los ácidos grasos cortos forman complejos insolubles con alfa y beta globulinas y a pH ácido, mientras que las gammaglobulinas no se precipitan tan fácilmente (Chanutin et. Al., 1960). Por tanto, la gammaglobulina puede separarse fácilmente. Sin embargo, ninguna de estas divulgaciones enseña o sugiere usar un detergente aniónico para eliminar el ADN residual de las proteínas virales bajo condiciones que previenen la precipitación como se enseña en la presente.

La WO 2010/052214 A2 describe un método para degradar ácidos nucleicos de células huésped asociados con un virus o antígeno viral del mismo producidos por cultivo celular. La EP 0870508 A1 describe una vacuna contra la gripe con menos de 25 pg de ADN residual por dosis. La WO 2010/151632 A1 describe un método para purificar una proteína de interés a partir de uno o más contaminantes por precipitación de los contaminantes con ácido caprílico.

65

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la fabricación de proteínas y a métodos de purificación mejorados de las mismas.

5 Los inventores han descubierto sorprendentemente que la purificación de la muestra que comprende proteínas y ADN derivados del cultivo celular se mejora significativamente mediante la adición de un detergente aniónico, específicamente ácido caprílico, a una solución que comprende las proteínas y el ADN celular, seguido de un paso de purificación que comprende una matriz de intercambio iónico, en donde la matriz de intercambio iónico es Sartobind Q o Fractogel TMAE. Los inventores han descubierto inesperadamente que la presente invención elimina las nucleoproteínas de la gripe de preparaciones que comprenden proteínas del virus de la gripe de interés y que incluyen hemaglutinina. La eliminación eficiente de contaminantes como se logra mediante la presente invención permite mayores rendimientos de producto, debido a que los tiempos de incubación e infección pueden aumentarse para que se pueda obtener una mayor cantidad de la proteína de interés.

15 Sorprendentemente, los inventores también han descubierto que el proceso descrito en la presente elimina sustancialmente la nucleoproteína (NP) de la gripe. Ventajosamente, la invención no se limita al virus de la gripe derivado del cultivo celular, sino que también es aplicable a los virus de la gripe producidos en los huevos, si se desea la eliminación de NP.

20 A diferencia de los métodos descritos en la técnica anterior (ver "Antecedentes" anterior), la presente invención emplea un detergente aniónico en condiciones que no precipitan las proteínas de interés o el ADN. De acuerdo con la invención, la preparación de la proteína de interés se separa del ADN/proteínas contaminantes a través de cromatografía de intercambio iónico. Al usar el proceso descrito en la presente, la cantidad de impurezas (por ejemplo, ADN residual) en la muestra puede reducirse drásticamente. Esta invención puede usarse para eliminar el ADN celular residual de cualquier muestra que contenga una o más proteínas de interés producidas en las células huésped, como cultivo celular.

25 De acuerdo con la invención, un material de partida adecuado que puede someterse a los métodos proporcionados en la presente es una solución que comprende proteínas de la gripe de interés y que incluyen hemaglutinina. Dicha solución puede ser una preparación bruta de células o tejidos, una preparación parcialmente purificada, medios de cultivo en los que se cultivaron células o sobrenadante de cultivo celular, etc., pero es probable que contenga contaminantes celulares residuales que se desea eliminar.

30 La proteína de interés puede cultivarse en un sistema de células huésped adecuado y puede purificarse o aclararse a partir de impurezas celulares mediante técnicas de separación comunes conocidas en la técnica. Opcionalmente, pueden tomarse pasos adicionales antes del paso de la proteína a través de la matriz de intercambio iónico, preferiblemente antes de la adición del detergente aniónico. Por ejemplo, dicha proteína de interés puede purificarse primero de las impurezas del cultivo celular para producir una solución que se ha aclarado. El eluato o el flujo obtenido del método de la presente invención puede someterse a pasos de procesamiento adicionales, como purificar la proteína de interés y formularla en una vacuna. En algunas realizaciones de la invención, el detergente aniónico se añade a la solución aclarada poniendo en contacto la solución que comprende la proteína de interés y las impurezas del cultivo celular con una solución de detergente aniónico en condiciones no precipitantes y haciendo pasar la solución a través de una matriz de intercambio iónico. Las condiciones no precipitantes son condiciones en las que no se produce precipitación sustancial o proteínas o ADN.

35 Por tanto, la presente invención es adecuada para la purificación de proteínas de la gripe de interés y que incluyen hemaglutinina. Pueden producirse en un huésped adecuado (como células cultivadas) infectado con el virus. En algunas realizaciones, el proceso de producción de proteínas virales puede incluir la división de viriones, que típicamente implica el uso de un agente de división u otro detergente. En algunas realizaciones, el detergente aniónico usado en los métodos descritos en la presente no es el agente de división o el detergente usado en el proceso de división.

40 La presente invención es en particular aplicable para la preparación de proteínas virales para la producción de vacunas.

45 Un método de purificación particularmente eficaz para productos biológicos derivados del cultivo celular debería permitir eliminar de manera óptima las impurezas, como el ADN de la célula huésped, al mismo tiempo que se logra un rendimiento máximo del producto. Con este fin, la presente invención proporciona productos sustancialmente libres de impurezas y enriquecidos para la proteína inmunogénica. De acuerdo con la invención, el ADN residual y las impurezas derivadas de las células huésped, como la propagación del cultivo celular, pueden eliminarse del producto pretendido mediante el paso en una solución que comprende un detergente aniónico, que se procesa posteriormente a través de una matriz de intercambio iónico.

50 En particular, la invención proporciona un método para producir una composición de vacuna contra la gripe que comprende proteínas inmunogénicas que incluyen hemaglutinina derivadas de un virus derivado de cultivos celulares que comprende añadir un detergente ácido caprílico a una solución que comprende proteínas

5 inmunogénicas en condiciones no precipitantes y procesar las proteínas inmunogénicas en una matriz de intercambio iónico. Las proteínas inmunogénicas incluyen hemaglutinina, neuraminidasa y nucleoproteínas obtenidas de un virus de la gripe que ha sido sometido a agentes de inactivación y división. Pueden realizarse pasos adicionales antes de procesar la proteína inmunogénica en la matriz de intercambio iónico, preferiblemente antes de la adición de un detergente de ácido graso. Por ejemplo, el virus de la gripe puede dividirse primero con un agente de división seguido de la separación del virus dividido de los desechos del cultivo celular para producir una solución que se ha aclarado. El eluato o el flujo obtenido a partir de la matriz de intercambio iónico producida por la presente invención puede someterse a pasos de procesamiento adicionales como purificar adicionalmente la proteína viral y formularla en una vacuna. En un aspecto preferido, el detergente de ácido graso no es el agente de división u otro detergente usado en el proceso.

15 Como se ha mencionado anteriormente, el proceso descrito en la presente elimina sustancialmente la nucleoproteína (NP) de la gripe. Ventajosamente, la invención no está restringida al virus de la gripe derivado del cultivo celular, sino que también es aplicable a los virus de la gripe producidos en los huevos, si se desea la eliminación de NP.

20 Por tanto, la invención proporciona un método para eliminar nucleoproteínas virales de la gripe de proteínas virales de la gripe de interés y que incluyen hemaglutinina. Se añade ácido caprílico a una solución que comprende nucleoproteínas virales de la gripe en condiciones no precipitantes. En algunas realizaciones, el detergente aniónico no es el agente de división u otro detergente usado en el proceso. Las nucleoproteínas pueden luego unirse a una matriz de intercambio iónico para producir un eluato (o flujo) que comprende las proteínas de interés que están sustancialmente libres de nucleoproteínas virales y ADN celular. En algunas realizaciones, una solución de detergente aniónica adecuada usada para la presente invención no incluye desoxicolato, laurilsulfato de sodio, o una combinación de los mismos.

25 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para eliminar nucleoproteínas de la gripe de una preparación de virus de la gripe derivada de cultivo celular o huevos embrionados que comprende añadir ácido caprílico a la preparación de virus en condiciones no precipitantes, y procesar la preparación de virus a través de una matriz de intercambio aniónico de membrana Sartobind Q o resina Fractogel TMAE, por lo que la nucleoproteína se une a la matriz de intercambio aniónico. Pueden realizarse pasos adicionales antes de procesar la preparación del virus en la matriz de intercambio iónico, preferiblemente antes de la adición del ácido caprílico. Por ejemplo, el virus de la gripe puede dividirse primero con un agente de división seguido de separación del virus dividido de los desechos del cultivo celular para producir una solución que se ha aclarado. El eluato o el flujo obtenido a partir de la matriz de intercambio iónico producida por la presente invención puede someterse a pasos de procesamiento adicionales como purificar adicionalmente la proteína viral y formularla en una vacuna. En un aspecto preferido, el detergente aniónico no es el agente de división u otro detergente usado en el proceso.

35 El método proporciona una vacuna contra la gripe que está sustancialmente libre de ADN residual, y nucleoproteínas. La vacuna contra la gripe puede formularse en forma de partículas subviriónicas, por ejemplo, las proteínas de HA y NA pueden ser proteínas de subunidades purificadas o unirse a porciones de estructuras virales de la gripe.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 La FIG. 1 proporciona un gráfico de barras que compara el rendimiento porcentual de proteína HA procesada en TMAE y SARTOBIND Q usando diferentes agentes caotrópicos.
La FIG. 2 proporciona un gel desnaturalizante que compara muestras de series de cromatografía con y sin caprilato como detergente.
50 La FIG. 3 proporciona una relación de comparación de gráfico de barras de ADN/proteína recuperada de matrices de intercambio iónico ejecutadas con diferentes cantidades de caprilato.
La FIG. 4 proporciona un rendimiento porcentual de proteína recuperada de matrices de intercambio iónico ejecutadas con diferentes cantidades de caprilato.
La FIG. 5 proporciona el proceso en sentido descendente para obtener una vacuna contra la gripe de subunidad basada en cultivo celular, como se describe en Onions et al., 2010.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES

Proteína de interés

60 Los métodos descritos en la presente son útiles para la preparación de proteínas virales de la gripe producidas en un huésped adecuado. En algunas realizaciones, tales proteínas virales de la gripe son proteínas inmunogénicas virales (es decir, antígenos virales) adecuadas para la producción de vacunas, y en particular hemaglutinina.

65 Las proteínas inmunogénicas tratadas con el método de acuerdo con la invención pueden formularse como

virus inactivado (o muerto), virus atenuado, formulaciones de virus divididos, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas virales que están aisladas, purificadas o derivadas de un virus y partículas similares a virus (VLP).

5 Si durante la producción de la vacuna, se usa un paso de división, el agente de división puede ser diferente del detergente aniónico de los métodos descritos en la presente. Preferiblemente, el paso de división o el agente de división se añade antes de la cromatografía de intercambio iónico en la que el ADN celular residual se une o separa de la proteína de interés.

10 **Cultivo de virus**

15 La invención proporciona un método para eliminar nucleoproteínas de una preparación de virus de la gripe, en particular una que incluye hemaglutinina. El virus de la gripe puede cultivarse en un huésped y se realizan pasos de purificación para aislar y purificar las proteínas NA y HA. Por tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un método para eliminar la Proteína Nuclear (NP) de la gripe de una preparación que comprende proteínas virales de interés, que comprende dividir una preparación de virus obtenida de cultivo celular o huevos, poner en contacto la preparación de virus con un ácido caprílico bajo condiciones no precipitantes y procesar la preparación a través de una membrana de Sartobind Q o resina de Fractogel TMAE, mediante lo cual la proteína nuclear se une a la resina de intercambio aniónico, y opcionalmente purificar adicionalmente la proteína viral y formulándola en una vacuna.

20 El huésped de cultivo puede ser células o huevos de gallina embrionados, que son adecuados para producir una vacuna que puede usarse para la administración a humanos. Los ejemplos no limitativos de células adecuadas que han sido aprobadas para la fabricación de vacunas incluyen células MDCK, células CHO, células Vero y células PER.C6®. Para las realizaciones de las invenciones que implican el uso de huevos, los virus también pueden propagarse en los huevos. El método estándar actual para el crecimiento del virus de la gripe para las vacunas usa huevos de gallina embrionados con SPF, el virus purificándose del contenido del huevo (líquido alantoideo). También es posible pasar un virus a través de los huevos y posteriormente propagarlo en cultivo celular y viceversa. Los métodos para la purificación de productos de vacunas cultivados en huevos embrionados se describen, por ejemplo, en la GB 1498261.

30 Preferiblemente, las células se cultivan en ausencia de suero, para evitar una fuente común de contaminantes. Los expertos en la técnica conocen varios medios libres de suero para el cultivo de células eucariotas, por ejemplo, medio de Iscove, medio ultra CHO (BioWhittaker), EX-CELL (JRH Biosciences). Además, pueden usarse medios libres de proteínas, por ejemplo, PF-CHO (JRH Biosciences). De lo contrario, las células para la replicación también pueden cultivarse en los medios habituales que contienen suero (por ejemplo, medio MEM o DMEM con del 0,5% al 10% de suero de ternera fetal).

40 El virus puede cultivarse en células en cultivo adherente o en suspensión. Pueden usarse cultivos de microportadores. En algunas realizaciones, las células pueden por lo tanto adaptarse para el crecimiento en suspensión. La suspensión puede aclararse primero usando cualquier método conocido en la técnica. El paso de aclaración sirve para eliminar las células, desechos celulares e impurezas de las células huésped de la muestra. En algunas realizaciones, el aclarado puede realizarse a través de uno o más pasos de centrifugación. La centrifugación de la muestra puede realizarse mediante métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la centrifugación puede realizarse usando una carga normalizada de aproximadamente 1×10^{-8} m/s y una fuerza gravitacional de aproximadamente 5.000 x g a aproximadamente 15.000 x g.

Purificación

50 En otro aspecto, la suspensión puede aclararse mediante una o más técnicas de filtración en profundidad. La filtración en profundidad se refiere a un método para eliminar partículas de la solución usando una serie de filtros, dispuestos en secuencia, que tienen un tamaño de poro decreciente. Una matriz tridimensional de filtro de profundidad crea una ruta similar a un laberinto a través de la cual pasa la muestra. Los principales mecanismos de retención de los filtros de profundidad se basan en la adsorción aleatoria y el atrapamiento mecánico en toda la profundidad de la matriz. En varios aspectos, las membranas o laminas del filtro pueden ser de algodón enrollado, polipropileno, celulosa de rayón, fibra de vidrio, metal sinterizado, porcelana, tierra de diatomeas u otros componentes conocidos. En ciertos aspectos, las composiciones que comprenden las membranas de filtro de profundidad pueden tratarse químicamente para conferir una carga electropositiva, es decir, una carga catiónica, para permitir al filtro capturar cargadas negativamente, como ADN, proteínas de la célula huésped o agregados.

60 Los métodos de acuerdo con la invención también pueden incluir la recogida y el aislamiento de virus o las proteínas generadas a partir del cultivo celular. Durante el aislamiento de virus o proteínas, las células se separan del medio de cultivo mediante métodos estándar como separación, filtración o ultrafiltración. Los virus o las proteínas se concentran luego de acuerdo con métodos suficientemente conocidos por los expertos en la técnica, como centrifugación en gradiente, filtración, precipitación, cromatografía, etc., y luego se purifican. También se prefiere de acuerdo con la invención que los virus se inactiven durante o después de la purificación. La inactivación del virus

puede producirse, por ejemplo, por β -propiolactona o formaldehído en cualquier punto dentro del proceso de purificación.

Cualquier sistema de filtración en profundidad disponible para un experto en la técnica puede usarse a lo largo de los pasos de la presente invención. En una realización particular, el aclaramiento y la purificación por filtración en profundidad puede lograrse con un sistema de filtro de profundidad MILLISTAK+ Pod, medio X0HC, disponible de Millipore Corporation. En otro aspecto, el paso de filtración en profundidad puede lograrse con un filtro de profundidad ZETA PLUS, disponible de 3M Purification Inc.

Producción de vacunas

Las vacunas generalmente se basan en virus vivos o en virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden basarse en viriones completos, viriones 'divididos' o en antígenos de superficie purificados. Los antígenos también pueden presentarse en forma de virosomas. EL método de la invención es particularmente útil para para la fabricación de vacunas contra la gripe, que generalmente comprenden ADN residual y nucleoproteína en una cantidad detectable. Tales vacunas contra la gripe incluyen virus vivos, viriones completos o vacunas contra la gripe de viriones divididos. Cuando la vacuna se formula en forma de subvirión, los antígenos virales pueden encontrarse en forma de virus dividido, donde la envoltura lipídica viral se ha disuelto o alterado, o en forma de una o más proteínas virales purificadas.

El ADN residual puede inactivarse con un agente alquilante que escinde el ADN en porciones lo suficientemente pequeñas como para que no pueda codificar una proteína funcional. Preferiblemente, la longitud del ADN de cultivo celular residual degradado es inferior a 500 pares de bases. Más preferiblemente, la longitud del ADN de cultivo celular residual degradado es inferior a 200 pares de bases. Preferiblemente, el uso de un agente alquilante como betapropiolactona (BPL) en el método de la invención proporciona el beneficio adicional de reducir la agregación y los contaminantes. Las formulaciones de vacunas con agregados reducidos también pueden tener una inmunogenicidad mejorada. La US 2009-0304729 enseña el tratamiento del ADN residual funcional con agentes alquilantes. Antes del uso del detergente aniónico en combinación con cromatografía de intercambio iónico, partes del ADN residual fragmentado pueden eliminarse mediante precipitación con un detergente catiónico como CTAB como se describe en Onions et al. (2010; Biologicals, 38(5): 544-551). Todo el proceso en sentido descendente completo de Onions se muestra en la Figura 5. En algunas realizaciones, la presente invención puede aplicarse como parte del proceso de Onions.

Los métodos para dividir virus, como los virus de la gripe, son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ver las Publicaciones de Patente Internacional: WO 02/28422, WO 02/067983, WO 02/074336, WO 01/21151, etc. La división del virus se lleva a cabo interrumpiendo o fragmentando el virus completo, ya sea infeccioso (de tipo salvaje o atenuado) o no infeccioso (por ejemplo, inactivado), con una concentración disruptiva de un agente de división. Los agentes de división generalmente incluyen agentes capaces de romper y disolver las membranas lipídicas, típicamente con una cola hidrófoba unida a una cabeza hidrófila. Un agente de división preferido es el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). La interrupción resulta en una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Los agentes de división preferidos son surfactantes no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo, alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, azúcares de acilo, sulfobetaínas, betaínas, polioxietilentalquiléteres, N,N-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTAB (bromuros de cetil trimetil amonio), fosfato de tri-N-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (por ejemplo, los surfactantes Triton, como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietileno sorbitán (los surfactantes Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, etc.

Un procedimiento de división útil usa los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y el formaldehído, y la división puede tener lugar durante la purificación inicial del virión (por ejemplo, en una solución de gradiente de densidad de sacarosa). Por tanto, un proceso de división puede implicar el aclarado del material que contiene viriones (para eliminar el material que no es virión), la concentración de los viriones recogidos (por ejemplo, usando un método de adsorción, como adsorción CaHPO_4), separación de viriones enteros de material no viriónico, división de viriones usando un agente de división en un paso de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de división como desoxicolato de sodio), y luego filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar materiales no deseados. Los viriones divididos pueden resuspenderse de manera útil en solución de cloruro de sodio isotónica tamponada con fosfato de sodio.

Una composición (como una vacuna) que está "sustancialmente libre de ADN residual" se refiere a una composición o formulación, en la que los fragmentos residuales de ADN de menos de 200 pares de bases son detectables a menos de 10 ng por 0,5 ml, según se determina por electroforesis capilar (ver, por ejemplo, la WO 2009/118420). La cantidad total de ADN residual en las composiciones de la invención es preferiblemente inferior a 20 ng/ml, por ejemplo, ≤ 10 ng/ml, ≤ 5 ng/ml, ≤ 1 ng/ml, ≤ 100 pg/ml, ≤ 10 pg/ml, etc.

Por consiguiente, un ensayo usado para medir el ADN residual será típicamente un ensayo validado

(Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mayo 2001; Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197). Pueden usarse tres técnicas principales para la cuantificación del ADN: métodos de hibridación, como transferencias Southern o transferencias de ranura (Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7); métodos de inmunoensayo, como el sistema THRESHOLD (Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12; y PCR cuantitativa (Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80). Estos métodos son todos familiares para los expertos en la técnica, aunque las características precisas de cada método pueden depender de varios factores como la elección de sondas para la hibridación, la elección de cebadores y/o sondas para la amplificación, etc.

Las composiciones de vacuna contra la gripe pueden tener niveles reducidos de nucleoproteínas (NP). Preferiblemente, las NP representan menos del 15% en masa de la proteína total del virus de la gripe en la vacuna, por ejemplo, <12%, <10%, <8%, <7%, <6%, <5%, <4%, <3%, <2% o <1%. La vacuna puede comprender menos de 3 µg de NP por 10 µg de HA, menos de 2,5 µg de NP por 10 µg de HA, menos de 2 µg de NP por 10 µg de HA, menos de 1,5 µg de NP por 10 µg de HA, menos de 1 µg de NP por 10 µg de HA, menos de 0,5 µg de NP por 10 µg de HA o menos de 0,1 µg de NP por 10 µg de HA. Lo más preferible, la vacuna está sustancialmente libre de NP. Esto se entiende como que tiene menos de 0,1 µg de NP por 10 µg de HA. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente pueden lograr por lo menos una reducción de 10 veces en la cantidad de NP en una preparación, por ejemplo, por lo menos 10 veces, por lo menos 12 veces, por lo menos 15 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 25 veces, por lo menos 30 veces, por lo menos 40 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 75 veces, o por lo menos 100 veces de reducción en la cantidad de NP en un flujo (o eluato) en comparación con el material de partida sometido a los métodos de purificación de la invención.

Los métodos para determinar la cantidad de proteína en una composición son conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, como NP y NA tienen virtualmente el mismo peso molecular (aproximadamente 60 kD), habitualmente migran conjuntamente en geles no reductores. Por lo tanto, la electroforesis en gel SDS clásica podría no ser una forma apropiada de determinar la cantidad de NP (ver Chaloupka et al., 1996, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 Feb; 15(2):121-7.). Una manera de determinar la cantidad de NP en el volumen de una vacuna podría ser una electroforesis bidimensional con una densitometría posterior. Sin embargo, se prefiere la espectrometría de masas de dilución isotópica usando un péptido sintético marcado isotópicamente como se describe, por ejemplo, en: Williams et al., *Vaccine* 30 (2012) 2475-2482. Dicho método usa cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) usando dilución de isótopos junto con monitorización de reacción múltiple (MRM). Este método cuantifica los péptidos objetivo liberados por digestión proteolítica de la muestra como un representante estequiométrico de la proteína analito. Un péptido de referencia marcado con isótopo estable se añade en la muestra como un estándar interno (IS). La cuantificación de NP se logra comparando el área del pico del péptido de referencia marcado isotópicamente con el del péptido objetivo endógeno. Este método permite la cuantificación simultánea de múltiples proteínas, siempre que se incluyan péptidos marcados para cada objetivo específico.

Alternativamente, se usa para la cuantificación la espectrometría de masas sin marcas (LC/MSE), preferiblemente en espectrómetros de masa de tiempo de vuelo cuadrupolo (Q-Tof) (Getie-Kehtie et al., (2013): *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7(4), 521-530). Para este método, se usan exploraciones alternas de baja energía de colisión y elevada energía de colisión durante el análisis LC/MS para obtener tanto la identidad como la cantidad de proteína en un único experimento. La cuantificación se basa en los datos experimentales que muestran que la intensidad de señal media medida por LC/MSE de los tres péptidos trípticos más intensos para cualquier proteína dada es constante a una concentración dada, independientemente del tipo y tamaño de la proteína. Como la intensidad de la señal es proporcional a la concentración, puede estimarse la cantidad de cualquier proteína en la mezcla.

Las vacunas contra la gripe basadas en virus cultivados en cultivo celular (preferiblemente células de mamíferos o aves), pueden tener una cantidad de ADN celular residual de menos de 5 ng/dosis (por ejemplo, menos de 4 ng, menos de 3 ng, menos de 2 ng o menos de 1 ng por dosis) en un tamaño de fragmento de menos de 200 pares de bases, y por lo cual la vacuna contiene menos de 1 µg de NP por 10 µg de HA, menos de 0,5 µg de NP por 10 µg de HA, o menos de 0,1 µg de NP por 10 µg de HA. Lo más preferible, la vacuna está sustancialmente libre de NP. Esto se entiende como que tiene menos de 0,1 µg de NP por 10 µg de HA. En particular, la vacuna contra la gripe contiene menos de 1 ng de ADN residual por dosis con un tamaño de fragmento de menos de 200 pares de bases y menos de 0,5 µg de NP por 10 µg de HA. Esta vacuna está más preferiblemente libre de conservantes y antibióticos que contienen mercurio. La vacuna es más preferiblemente una vacuna contra la gripe pandémica monovalente o estacional tetravalente con una cantidad de ADN celular residual de menos de 1 ng por dosis con un tamaño de fragmento de menos de 200 pares de bases y menos de 0,5 µg de NP por 10 µg de HA.

Tales preparaciones de vacuna pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el siguiente proceso, que es una realización particularmente preferida: Un método para producir una vacuna contra el virus de la gripe en el que se realizan los siguientes pasos: los virus de la gripe se cultivan en cultivo celular, por ejemplo, en células de suspensión MDCK (WO 1997/037000). Los virus se recogen, purifican y concentran por filtración de 0,45 micrómetros y cromatografía CS. Después de la adición de detergente (como polisorbatos, por ejemplo, Tween®

80), la preparación del virus se trata con BPL. Posteriormente, los virus se dividen con CTAB. Después de un paso de ultracentrifugación y adsorción, la preparación de proteína viral se somete a cromatografía de intercambio iónico, usando Fractogel, TMAE o Sartobind Q como una resina. La cromatografía se realiza en presencia de caprilato de sodio (aproximadamente 50 mM para Sartobind; 100 mM para TMAE) y cloruro de sodio (400 mM para Sartobind) y 200 mM para TMAE). Posteriormente, la preparación de proteínas se concentra mediante un medio adecuado, como ultrafiltración. Las proteínas pueden mezclarse opcionalmente con otra preparación de virus (en el caso de vacunas estacionales tri- o tetravalentes), y opcionalmente filtrarse, llenarse y envasarse estérilmente. La invención incluye por tanto la vacuna contra la gripe obtenible mediante este proceso.

Será evidente para los expertos en la técnica que la medida del contenido de ADN de la célula huésped residual no pretende ser una limitación o característica definitoria de esta metodología. En cambio, estos datos en los ejemplos apoyan la esencia de la presente invención: una metodología a gran escala para la generación de partículas de virus que da como resultado un producto altamente purificado que puede utilizarse en entornos clínicos y comerciales. Cabe señalar que la importancia de alcanzar niveles de ADN particulares en el producto final es específica del producto. Los productos virales producidos usando líneas celulares continuas para uso parenteral en humanos requerirán los estándares de pureza más estrictos pero, incluso en ese caso, los objetivos pueden variar de 100 pg por dosis hasta 10 ng por dosis (WHO Requirements for the Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals Requirements for Biological Substances No. 50), WHO Technical Report Series, No. 878, 1998) o más, y es probable que se ajusten dependiendo de la indicación del producto.

Detergentes

El detergente aniónico usado en la presente invención es ácido caprílico que se añade como una sustancia adicional para llevar a cabo el intercambio iónico. Por consiguiente, el propio detergente no se elimina mediante el proceso de intercambio iónico ni precipita las sustancias procesadas a través de la matriz, sino que sirve para interactuar con las regiones hidrófobas del ADN residual y/o el virus o las proteínas virales, particularmente la subunidad HA.

En un aspecto, una solución detergente aniónico se añade a una solución que tiene las proteínas de interés. Si se usa para preparaciones virales, el detergente aniónico se añade preferiblemente después de la inactivación o división de los virus, por lo que la inactivación puede realizarse antes o después de los pasos de división. En un aspecto, el detergente aniónico se añade durante o antes de un paso de intercambio iónico. La adición de un detergente aniónico mejora significativamente la depuración del ADN residual en por lo menos un 10%, 20%, 30%, 40% o 50% en comparación con la depuración del ADN residual sin tratamiento. Puede encontrar una lista de detergentes aniónicos disponibles comercialmente, por ejemplo, en: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=14572921>.

En algunas realizaciones, el detergente de ácido graso adecuado es el caprilato de sodio o una sal similar de ácido caprílico. Como se describe en la presente, se ha demostrado que la adición de caprilato (caprilato de sodio) (C8) a pH neutro mejora la recuperación de proteínas y evita la agregación de proteínas o la unión no específica. En ciertas realizaciones, la concentración final de la solución de ácido de caprilato que comprende una proteína o proteínas de interés (como anticuerpos o fragmentos de los mismos, antígenos, proteínas terapéuticas, toxinas, péptidos, etc.) tiene una concentración adecuada de detergente de entre 25 mM y 300 mM, se prefiere entre 50 mM y 250 mM, se prefiere particularmente entre 75 mM y 200 mM. La concentración puede ser de aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, 200 mM, aproximadamente 250 mM o aproximadamente 300 mM, dependiendo de la resina de intercambio iónico o las condiciones de cromatografía. Un experto en la técnica podrá dilucidar empíricamente la concentración de detergentes de ácido graso para elaborar una solución. Típicamente, se ve que la concentración de detergente más alta proporciona un proceso más robusto a través de las diferentes cepas de gripe, debido a la interrupción de cualquier interacción hidrófoba y la reducción más alta de impurezas como se ilustra en la Figura 2. Sin embargo, es importante que la cantidad de detergentes de ácido graso esté presente en una cantidad y un pH para evitar la precipitación de las proteínas y el ADN residual en la solución.

En otro aspecto, el pH de la solución que comprende proteínas se mantiene a un pH al que no se produce (o se produce una cantidad insignificante) de precipitación de las proteínas, nucleoproteínas y ADN residual. Por ejemplo, para el ácido caprílico, este es un pH neutro. El experto en la técnica puede determinar fácilmente el pH óptimo requerido para evitar la precipitación de proteínas. Preferiblemente, el pH final de la mezcla debe mantenerse entre aproximadamente 7,0 y 9,0. En algunas realizaciones, el pH final de la mezcla se mantiene entre aproximadamente 7,2 y 7,5, por ejemplo, entre aproximadamente 7,2-7,4, entre aproximadamente 7,2-7,3, entre aproximadamente 7,3-7,5, entre aproximadamente 7,4-7,5. En algunas realizaciones, el pH final de la mezcla se mantiene a más de o igual a aproximadamente 7 (como entre aproximadamente 7-9, por ejemplo, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, etc.). En algunas realizaciones, el pH de la solución que comprende las proteínas, el ADN residual y el caprilato no debe reducirse a aproximadamente 6,0 o menos (por ejemplo, aproximadamente 5, 4 y 3). El pH puede ajustarse antes y/o después

de la adición de un detergente aniónico (por ejemplo, caprilato) a la muestra. En algunas realizaciones, el pH de la mezcla podría ajustarse antes de la adición de un detergente aniónico (por ejemplo, caprilato). En general, cualquier ácido o tampón reconocido en la técnica puede usarse para alterar o ajustar el pH de una mezcla incluyendo, por ejemplo, tampones que contienen fosfato y tris.

El método de la presente invención también puede aplicarse a muestras de proteínas parcialmente purificadas para eliminar aún más las impurezas no deseadas poniendo en contacto la mezcla con una solución de detergente aniónico en condiciones que eviten la precipitación de las proteínas en la mezcla y haciendo pasar la mezcla a través de una matriz de intercambio iónico. Los métodos de la invención eliminan eficazmente la nucleoproteína a una concentración de menos de 0,5 µg de NP por 10 µg de HA. En un aspecto particular, la cantidad de nucleoproteína eliminada por la presente invención es por lo menos del 10%, 15%, 20%, 25% o, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90% como se determina por SDS-PAGE.

La composición que comprende proteínas y ADN residual en una solución de un detergente aniónico se procesa adicionalmente para recuperar el producto deseado. Sorprendentemente, las nucleoproteínas de la gripe se capturan en la membrana de intercambio aniónico según lo identificado por los inventores por análisis electroforético de los grupos de adsorción. Los inventores identificaron que las nucleoproteínas corren con el ADN residual cuando se ponen en contacto con una solución de detergente aniónico. Este descubrimiento no se ha mostrado antes y da como resultado un producto de gripe enriquecido que está sustancialmente libre de ADN residual.

Por consiguiente, después de eliminar los contaminantes residuales de la célula huésped mediante el tratamiento de la muestra que contiene el contaminante (por ejemplo, cultivo celular y mezclas a granel aclaradas) con un detergente aniónico y el paso posterior de purificación de acuerdo con los métodos descritos en la presente, dicha muestra puede contener no más de aproximadamente 10000 ng/mg (por ejemplo, no más de aproximadamente 10000, 5000, 1000, 500, 200, 100, 50, 25 o 10 ng/mg) de contaminantes proteicos. En algunas realizaciones, dichos contaminantes proteicos incluyen no más de aproximadamente 10000 ng/mg de nucleoproteínas, por ejemplo, no más de aproximadamente 10000, 5000, 1000, 500, 200, 100, 50, 25 o 10 ng/mg de nucleoproteínas.

Por tanto, cualquier producto de gripe que comprenda ADN residual y nucleoproteína puede enriquecerse para las proteínas HA y NA por contacto con una solución de detergente aniónico y procesarse a través de una matriz de intercambio iónico. Los expertos en la técnica podrán aplicar los métodos de la presente invención a productos de la gripe generados a partir de cultivos celulares o cultivos de huevos.

Cromatografía

La invención usa una matriz de intercambio aniónico seleccionada de SARTOBIND Q(una membrana intercambiadora aniónica fuertemente básica, disponible de Sartorius Stedim Biotech GmbH) o FRACTOGEL TAME (EMD Milipore), para la eliminación de la proteína nuclear de la gripe de una preparación de virus de la gripe.

La separación cromatográfica sobre la matriz de intercambio iónico se maneja en modo de flujo continuo. Los métodos específicos usados para el paso de captura de la cromatografía, incluyendo el flujo de la muestra a través de la columna, el lavado y la elución, dependen de la columna y la resina específicas usadas y, típicamente son proporcionadas por los fabricantes o son conocidas en la técnica.

En un aspecto alternativo, la modulación de la fuerza iónica también puede emplearse durante el paso de cromatografía. La fuerza iónica de la solución tampón puede determinarse a partir de tanto la concentración molar como los números de carga de todos los iones presentes en la solución. La fuerza iónica, I , puede calcularse usando la siguiente fórmula:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

donde c_i es la concentración molar de ion i ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), z_i es el número de carga de ese ion, y la suma se toma sobre todos los iones en la solución. Generalmente un electrolito 1:1 como NaCl, la fuerza iónica es igual a su concentración molar, mientras que los iones multivalentes contribuyen más a la fuerza iónica en la solución, por ejemplo, la fuerza iónica del electrolito 2:2 MgSO_4 es cuatro veces la del NaCl.

La fuerza iónica preferida optimizará el equilibrio entre la eliminación del ADN residual no deseado a la vez que mantiene un alto rendimiento viral o proteico que retiene la antigenicidad del virus de manera rentable.

Los expertos en la técnica podrán diseñar un programa de separación cromatográfica dependiendo, por ejemplo, de las características de la muestra, las propiedades de la matriz del cromatógrafo y la eficiencia del

fraccionamiento. Se proporciona preferiblemente un tampón salino a un pH neutro o cercano como aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 y 7,8. El pH no debe reducirse por debajo de aproximadamente 6 ya que las proteínas de interés pueden perder su actividad, agregarse o precipitarse en presencia de un detergente aniónico (por ejemplo, detergentes de ácidos grasos). Las concentraciones adecuadas de tampón (por ejemplo, tampón de cloruro de sodio) pueden estar entre aproximadamente 100 mM y 1 M, como 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM y 1M. La concentración óptima de sal depende de la resina de cromatografía de intercambio iónico que se use. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la concentración óptima de sal mediante pruebas rutinarias. Para una resina TMAE, la mejor concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 300 mM, para SARTOBIND Q es mayor de 400 mM (para el uso de caprilato como detergente; ver los Ejemplos a continuación).

Como se usa en la presente, el término "cromatografía" se refiere al proceso mediante el cual un soluto de interés, por ejemplo, una proteína de interés, en una mezcla se separa de otros solutos en la mezcla por percolación de la mezcla a través de un adsorbente, que adsorbe o retiene un soluto más o menos fuertemente debido a las propiedades del soluto, como pl, hidrofobicidad, tamaño y estructura, en condiciones particulares de tamponamiento del proceso. En un método de la presente invención, puede usarse cromatografía para eliminar contaminantes después de eliminar el precipitado de una mezcla incluyendo, sin limitación, un cultivo celular o un sobrenadante de cultivo celular aclarado.

El término "impurezas", como se usa en la presente, se refiere generalmente al ADN residual de la célula huésped, partículas virales vacías, proteínas agregadas o materia distinta de los componentes deseados de un producto.

"Procesamiento" o "procesado" usado en el contexto de la invención se refiere a una paso o pasos en sentido descendente realizados después del aclarado o los materiales de partida iniciales que comprenden subproductos celulares y desechos, partículas coloidales, biomasa grande y altas densidades celulares. Las técnicas usadas en los pasos de procesamiento incluyen aislamiento, purificación, concentración, centrifugación, filtración, formulación, inactivación, división y varias operaciones analíticas realizadas para productos biológicos estériles. "Procesado" también puede describir los pasos de hacer fluir o pasar una muestra a través de una columna de cromatografía, resina, membrana, filtro u otro mecanismo, y puede incluir un flujo continuo a través de cada mecanismo, así como un flujo que se pausa o detiene entre cada mecanismo.

Ausencia de enseñanza explícita, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y luego la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

La frase "material de intercambio iónico" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente (por ejemplo, una resina de intercambio catiónico) o cargada positivamente (por ejemplo, una resina de intercambio aniónico). En una realización, la carga puede proporcionarse uniendo uno o más ligandos cargados (o adsorbentes) a la fase sólida, por ejemplo, mediante enlace covalente. Alternativa o adicionalmente, la carga puede ser una propiedad inherente de la fase sólida (por ejemplo, como es el caso de la sílice, que tiene una carga negativa general).

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

EJEMPLOS

Se propagó un virus H5N1 en células en suspensión MDCK, se recogió y procesó como se describe en Onions et al., 2010. La preparación del virus dividido se sometió a cromatografía de intercambio iónico usando una membrana SARTOBIND Q (Sartorius) o FRACTOGEL TMAE (EMD Millipore). Se determinó que la concentración óptima de sal encontrada para TMAE era de aproximadamente 300 mM, mientras que la concentración óptima encontrada para SARTOBIND Q fue mayor de 400 mM. Se realizaron preparaciones con diferentes detergentes y reactivos caotrópicos. El pH de las composiciones finales fue de 7,5, a excepción de las composiciones de arginina, que tenían un pH de 7,2. La reducción de ADN se evaluó mediante Picogreen y el rendimiento de proteínas se evaluó mediante el ensayo BCA. En general, SARTOBINDQ funcionó mejor que TMAE en la reducción de ADN; sin embargo, todas las series que utilizan caprilato de sodio mostraron un aumento significativo en la reducción de ADN en comparación con solo NaCl. Pueden obtenerse resultados sólidos con capilarilato 50 mM y NaCl 400 mM en una membrana SARTOBINDQ. Los valores de BCA para la arginina podrían no ser exactos debido a la interferencia de la arginina con el ensayo de BCA. No se investigó más el rendimiento de la arginina debido a la eliminación insuficiente del ADN. Los datos de BCA y ADN para estas condiciones se muestran en las Figuras 3 y 4.

Se examinaron adicionalmente las muestras de las siguientes tres pruebas por RP-HPLC para determinar el contenido de HA: (i) Control: fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5; (ii) fosfato 50 mM, caprilato de sodio 100 mM,

NaCl 200 mM, pH 7,5; (iii) fosfato 50 mM, caprilato de sodio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5. Se consideró que estas series eran el mejor caso para las condiciones examinadas. Se considera que una concentración más alta de caprilato proporciona un proceso más robusto a través de las cepas en base a la idea de que una concentración más alta de caprilato interrumpiría más efectivamente cualquier interacción hidrófoba y, en general, llevaría a una mayor reducción de impurezas. Los rendimientos por RP-HPLC se calcularon y se representaron en la Figura 1.

El material de estas tres series también se analizó mediante SDS-PAGE y puede verse en la Figura 2. Las muestras requirieron preparación de la muestra antes de la ejecución en geles debido a la baja concentración de proteínas. Las muestras se concentraron 2,5 veces para asegurar concentraciones de proteína lo suficientemente altas como para ser visualizadas por SDS-PAGE. Las muestras se concentraron usando un tubo Amicon ULTRA SPIN de 15 ml con membrana de 10.000 MWCO. El grupo de adsorción también se diluyó en tampón y se concentró 2,5 veces para garantizar que no se perdieran contaminantes de bajo peso molecular durante el proceso de concentración. Esto se demuestra mediante la comparación de carriles marcados como Adsorción y Adsorción, Concentrada. Puede verse una diferencia dramática en la pureza comparando las series de control y las series que contienen caprilato. La nucleoproteína en las series de caprilato se disminuye significativamente en comparación con las series que solo usan NaCl para optimizar el rendimiento.

Estos experimentos han demostrado con éxito que las interacciones secundarias, probablemente de naturaleza hidrófoba, están desempeñando un papel en la capacidad disminuida de la cromatografía AEX para adsorber el ADN de impureza cargado negativamente. Sin desear limitarse a la teoría, la adición de caprilato al grupo de adsorción probablemente interrumpe esta interacción hidrófoba y permite la unión del ADN y la nucleoproteína a la membrana o la resina.

Debe entenderse que la invención se ha descrito solo a modo de ejemplo y que pueden realizarse modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

A lo largo de la especificación, incluyendo las reivindicaciones, cuando el contexto lo permite, debe interpretarse que el término "que comprende" y sus variantes, como "comprende" o "que comprende", incluye el elemento indicado (por ejemplo, número entero) o elementos (por ejemplo, números enteros) sin excluir necesariamente cualquier otro elemento (por ejemplo, números enteros).

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para eliminar la Proteína Nuclear (NP) de la Gripe de una preparación que comprende proteínas del virus de la gripe de interés que incluyen hemaglutinina (HA), el método comprendiendo los pasos de:
- 10 a. dividir una preparación del virus de la gripe derivada de cultivos celulares o huevos,
 b. añadir ácido caprílico (8) a la preparación del virus en donde el ácido caprílico (8) está presente a una concentración de 25 mM-500 mM, de tal manera que no se produzca una precipitación sustancial de proteínas o ADN, y
 c. procesar la preparación del virus a través de una matriz de intercambio iónico, en donde la membrana es Sartobind Q, o en donde la resina es Fractogel TMAE, por lo que la proteína nuclear se une a la matriz de intercambio iónico.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- 20 a) un paso de aclarado;
 b) un paso de concentración;
 c) un paso de filtración en profundidad; y/o
 d) un paso de división antes del paso de intercambio iónico.
- 3.** El método de la reivindicación 1, en el que el ácido caprílico (8) comprende caprilato de sodio.
- 25 **4.** El método de la reivindicación 2, en el que el paso de inactivación comprende inactivación con BPL.
- 5.** El uso de un método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para producir una composición farmacéutica.

30

FIG. 1
Porcentaje Producido por RP-HPLC

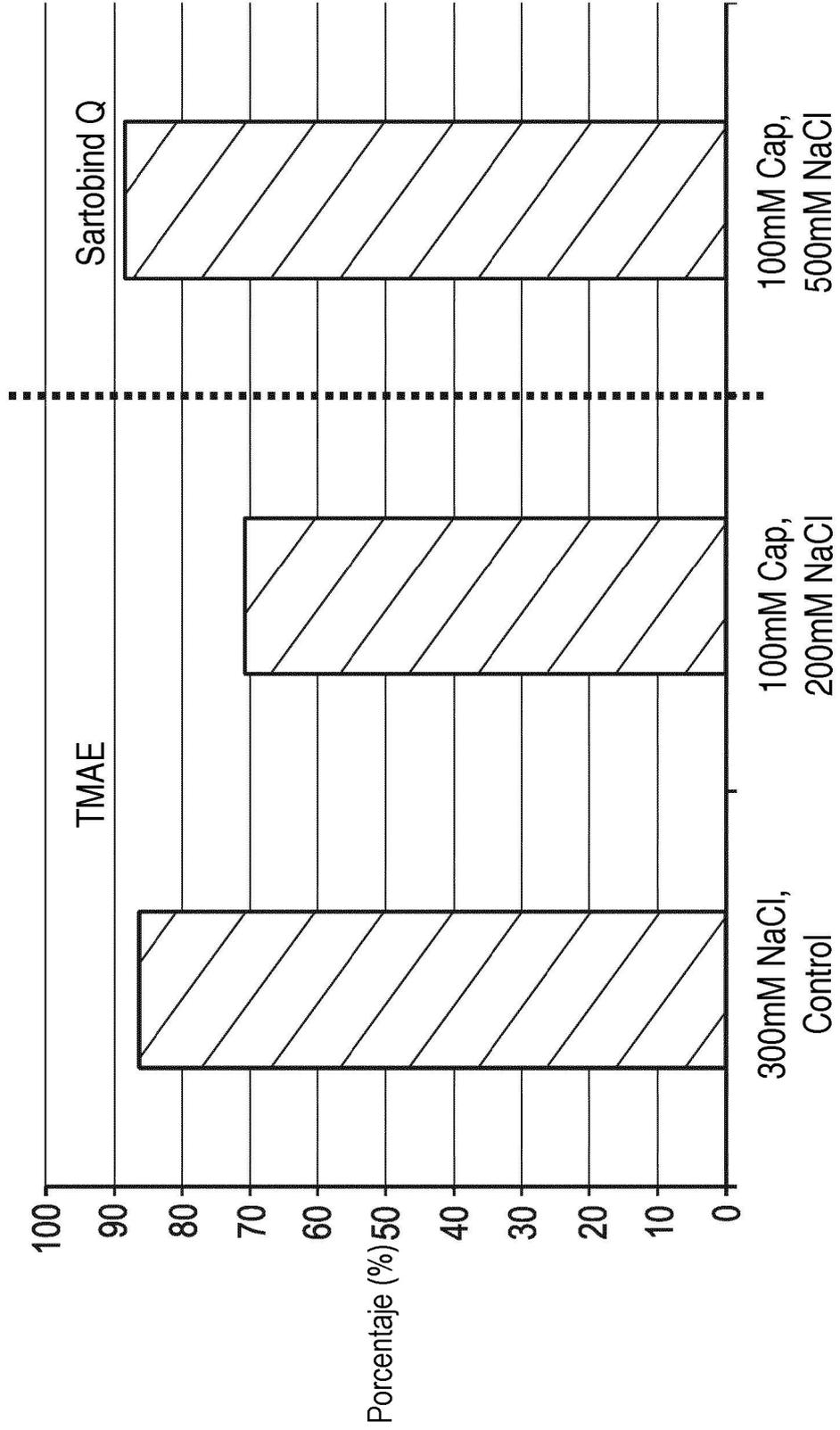
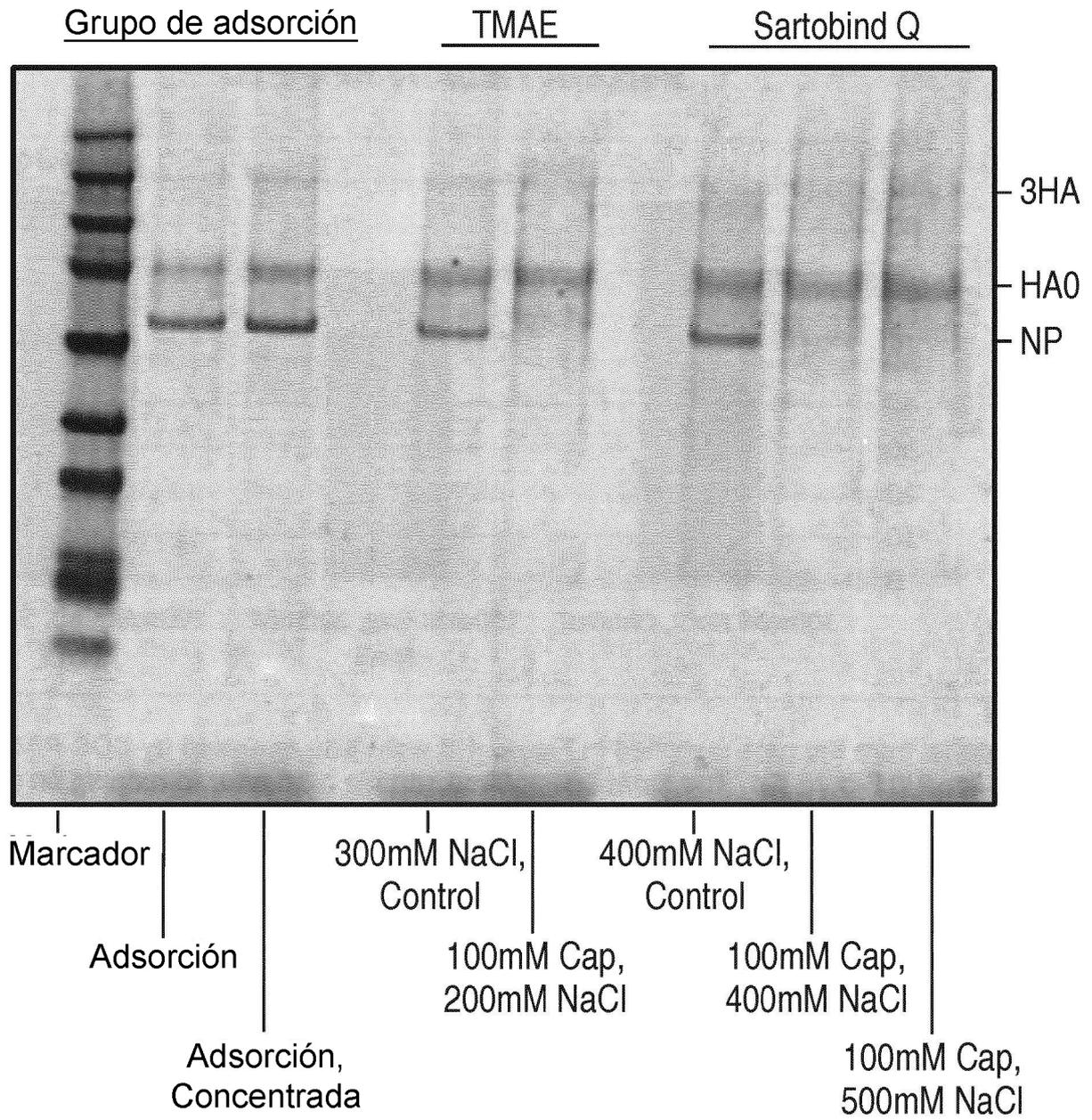


FIG. 2



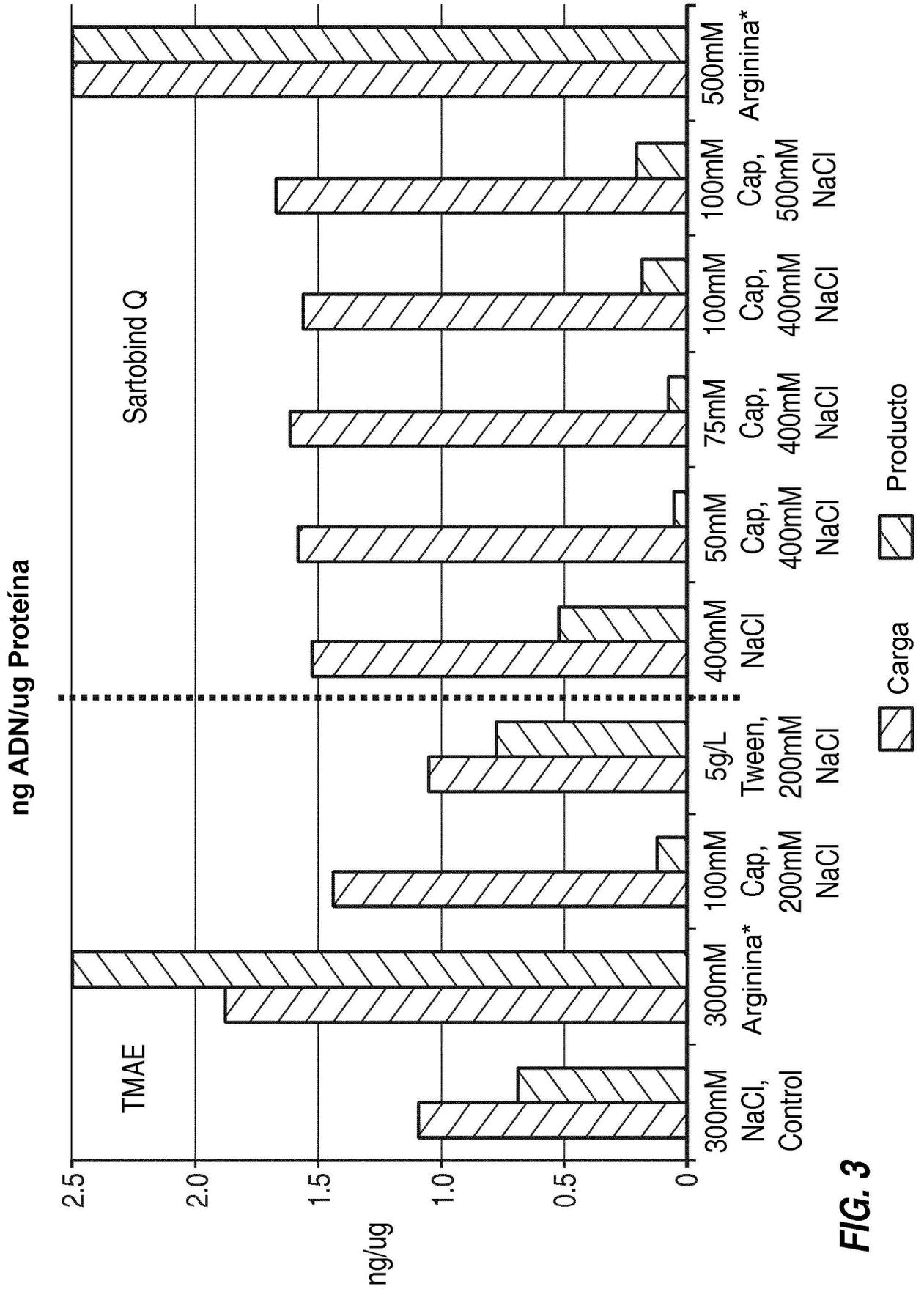


FIG. 4
Porcentaje Producido por BCA

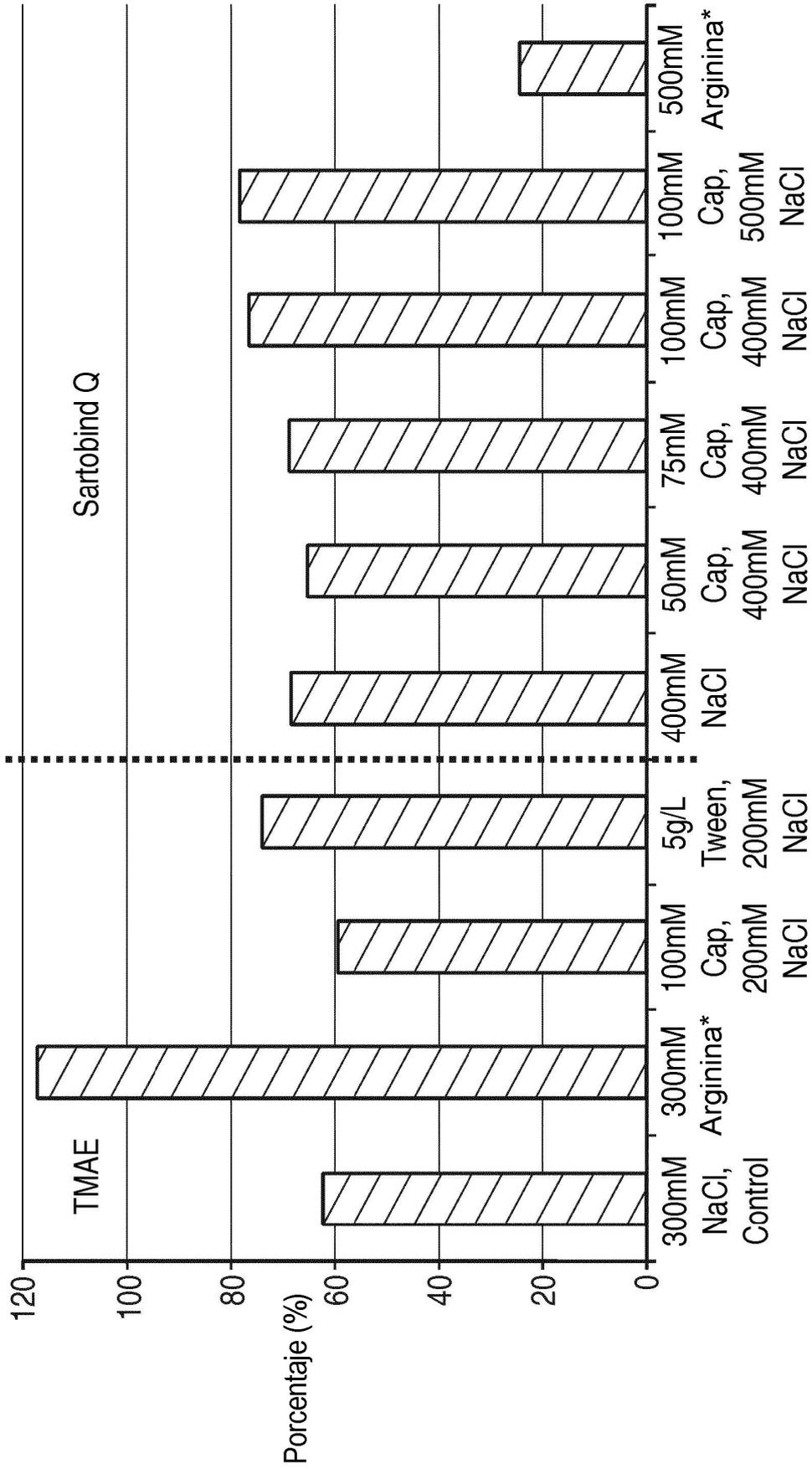


FIG. 5

