

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 199**

51 Int. Cl.:

B01D 15/34 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

B01D 15/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012 PCT/CA2012/000406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12145837**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12776970 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2702147**

54 Título: **Métodos de purificación de virus usando cromatografía por permeación en gel**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480561 P

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

29.04.2021

73 Titular/es:

**ONCOLYTICS BIOTECH INC. (100.0%)
Suite 210 1167 Kensington Crescent N. W.
Calgary, AB T2N 1X7, CA**

72 Inventor/es:

**COFFEY, MATTHEW C.;
HAGERMAN, ALLISON;
KAPADIA, ROXNA y
SERL, SARAH**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 822 199 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 de purificación de virus usando cromatografía por permeación en gel

5 Antecedentes

La fabricación viral incluye etapas de purificación de virus utilizando, por ejemplo, métodos cromatográficos tal como la cromatografía por permeación en gel. Si bien los métodos cromatográficos son formas efectivas de purificar virus, estos métodos pueden provocar pérdidas significativas de virus en la columna de cromatografía. Como resultado, los costes de fabricación viral usando tales métodos pueden ser sustanciales.

Huyghe y col., Hum. Gene Ther., 6(11), 1995, páginas 1403-1416 se refiere a la purificación de un p53 humano que codifica un adenovirus recombinante de tipo 5 por cromatografía en columna.

15 Resumen

La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se proporcionan reguladores de elución y métodos para purificar virus usando cromatografía por permeación en gel. Los métodos son útiles, por ejemplo, para aumentar la recuperación de un virus de una columna de cromatografía por permeación en gel durante la fabricación viral.

Los métodos de purificación de un virus descritos en el presente documento comprenden poner en contacto una columna de cromatografía por permeación en gel con una preparación viral que comprende un virus y un portador líquido, en donde el virus se retiene en la columna de cromatografía por permeación en gel y se recupera el virus de la columna de cromatografía por permeación en gel con un regulador de elución que comprende al menos un excipiente, un catión divalente y una solución salina regulada con fosfato. En los métodos descritos en el presente documento, el al menos un excipiente comprende histidina o sacarosa. En los métodos y sistemas reivindicados actualmente, el al menos un excipiente comprende histidina. El portador líquido es opcionalmente el regulador de elución. Opcionalmente, el al menos un excipiente comprende uno o más de manitol o sorbitol. El catión divalente es opcionalmente Mg^{2+} . Opcionalmente, Mg^{2+} está presente como cloruro de magnesio.

La solución salina regulada con fosfato puede incluir una combinación de una o más sales de fosfato y una o más sales de cloruro. Opcionalmente, la una o más sales de fosfato incluyen fosfato de sodio y/o dihidrógeno fosfato de potasio. Opcionalmente, la una o más sales de cloruro incluyen cloruro de sodio y/o cloruro de potasio.

El regulador de elución puede incluir además un detergente no iónico, tal como, por ejemplo, polisorbato 80. Opcionalmente, el regulador de elución incluye manitol, histidina, sorbitol, polisorbato 80 y $MgCl_2$, y la solución salina regulada con fosfato incluye fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio y cloruro de potasio. Opcionalmente, el regulador de elución incluye sacarosa, polisorbato 80 y $MgCl_2$, y la solución salina regulada con fosfato opcionalmente incluye fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio y cloruro de potasio.

El virus incluido en las preparaciones virales descritas en el presente documento puede ser, por ejemplo, un virus oncolítico y/o un virus sin envoltura. En el presente documento se proporciona una preparación viral en la que el virus es un reovirus tal como un reovirus de mamífero. Un ejemplo de un reovirus de mamífero es un reovirus humano, tal como un virus del serotipo 3 (por ejemplo, el reovirus de la cepa Dearing). El reovirus es opcionalmente un reovirus recombinante, un reovirus reordenado o IDAC #190907-01. Las formulaciones virales purificadas preparadas de acuerdo con estos métodos también se describen en el presente documento. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además almacenar el virus en el regulador de elución.

También se proporciona en el presente documento un aparato que incluye una columna de cromatografía por permeación en gel y un regulador de elución. El regulador de elución incluye al menos un excipiente, un catión divalente y una solución salina regulada con fosfato, y el al menos un excipiente incluye histidina o sacarosa. En los métodos y sistemas reivindicados actualmente, el al menos un excipiente comprende histidina. La columna de cromatografía por permeación en gel se equilibra opcionalmente con el regulador. Opcionalmente, el aparato incluye además una preparación viral que comprende un virus y un portador líquido.

Además se proporciona en el presente documento una formulación viral purificada que incluye un virus eluido de una columna de cromatografía por permeación en gel y un regulador de elución en contacto con un medio de cromatografía por permeación en gel. En algunos ejemplos, el regulador de elución comprende al menos un excipiente, un catión divalente y una solución salina regulada con fosfato, y el al menos un excipiente comprende histidina o sacarosa. En los métodos y sistemas reivindicados actualmente, el al menos un excipiente comprende histidina.

Los reguladores de elución de cromatografía por permeación en gel también se proporcionan en el presente documento. En algunos ejemplos, el regulador de elución puede incluir al menos un excipiente, un catión divalente,

un detergente no iónico y una solución salina regulada con fosfato. En estos ejemplos, al menos un excipiente comprende histidina o sacarosa y el regulador de elución es un regulador de elución de cromatografía por permeación en gel. En los métodos y sistemas reivindicados actualmente, el al menos un excipiente comprende histidina. Opcionalmente, el regulador de elución incluye sacarosa, $MgCl_2$, polisorbato 80 y una solución salina regulada con fosfato. Opcionalmente, el regulador de elución incluye manitol, histidina, sorbitol, $MgCl_2$, polisorbato 80 y una solución salina regulada con fosfato.

Los métodos para aumentar la recuperación de un virus de una columna de cromatografía por permeación en gel se proporcionan adicionalmente en el presente documento. Los métodos incluyen poner en contacto una columna de cromatografía por permeación en gel con una preparación viral que comprende un virus y un vehículo líquido, en el que el virus es retenido en la columna de cromatografía por permeación en gel, y recuperar el virus de la columna de cromatografía por permeación en gel con un regulador de elución que comprende al menos un excipiente, un catión divalente y una solución salina regulada con fosfato, en donde el al menos un excipiente comprende histidina o sacarosa. En los métodos y sistemas reivindicados actualmente, el al menos un excipiente comprende histidina. En estos métodos, la recuperación viral es al menos aproximadamente un 20% mayor que la recuperación de un virus eluido con solución salina regulada con fosfato. Opcionalmente, la recuperación viral es al menos aproximadamente un 25% mayor que la recuperación de un virus eluido con solución salina regulada con fosfato (por ejemplo, al menos aproximadamente un 30% mayor que la recuperación de un virus eluido con solución salina regulada con fosfato o al menos aproximadamente un 35% mayor que la recuperación de un virus eluido con solución salina regulada con fosfato).

Los detalles de uno o más aspectos se exponen en la descripción adjunta a continuación. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y a partir de las reivindicaciones.

Descripción detallada

En el presente documento se describen reguladores de elución y métodos para purificar virus usando cromatografía por permeación en gel. La cromatografía por permeación en gel (es decir, la filtración de gel o la cromatografía de exclusión por tamaño) es un proceso de difusión controlada que se utiliza para separar los componentes de una mezcla de acuerdo con su tamaño. Los reguladores de elución de cromatografía por permeación en gel descritos en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para aumentar la recuperación de un virus de una columna de cromatografía por permeación en gel durante la fabricación viral. Los reguladores de elución descritos en el presente documento incluyen uno o más excipientes, un catión divalente, un detergente no iónico y una solución salina regulada con fosfato.

Los reguladores de elución proporcionados en el presente documento incluyen al menos un excipiente (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más excipientes). Los excipientes para usar en los reguladores de elución incluyen, pero no se limita a, azúcares y aminoácidos. Un ejemplo de un azúcar adecuado para usar en los reguladores de elución descritos en el presente documento incluye sacarosa. Un ejemplo de un aminoácido adecuado para usar en los reguladores de elución descritos en el presente documento incluye histidina. Opcionalmente, los reguladores de elución descritos en el presente documento incluyen al menos uno de histidina o sacarosa. En los métodos y sistemas de la invención actualmente reivindicada, el al menos un excipiente comprende histidina.

Los azúcares adecuados para usar en los reguladores de elución descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, monosacáridos y disacáridos. En algunos ejemplos, los reguladores de elución incluyen sacarosa, manitol, sorbitol o combinaciones de estos. Otros ejemplos de azúcares adecuados incluyen lactosa, dextrosa, fructosa, glucosa y maltosa. Opcionalmente, los reguladores de elución están sustancialmente libres de trehalosa. Sustancialmente libre significa que el regulador de elución puede incluir menos del 0.1%, menos del 0.01%, menos del 0.001%, menos del 0.0001% o 0% de trehalosa con base en el peso del regulador de elución. En algunos ejemplos, los reguladores de elución están sustancialmente libres de azúcares que no sean sacarosa (es decir, los reguladores de elución están sustancialmente libres de polioles sin sacarosa).

Los azúcares para usar en los reguladores de elución pueden incluir un azúcar o una combinación de dos o más azúcares. Por ejemplo, los reguladores de elución pueden incluir sacarosa como el azúcar presente en el regulador. Opcionalmente, los reguladores de elución pueden incluir uno o más de manitol o sorbitol (por ejemplo, una combinación de manitol y sorbitol) como los azúcares presentes en el regulador. La concentración total de azúcares presentes en los reguladores de elución puede ser del 10% en peso o menos con base en el peso de los reguladores de elución. Por ejemplo, la concentración total de azúcares puede ser inferior a 7.5% en peso con base en el peso de los reguladores de elución (por ejemplo, menos de 7.4% en peso, menos del 7.3% en peso, menos del 7.2% en peso, menos del 7.1% en peso, menos del 7% en peso, menos del 6% en peso, menos del 5% en peso, menos del 4% en peso, menos del 3% en peso, menos del 2% en peso o menos del 1% en peso con base en el peso de los reguladores de elución). Por ejemplo, la sacarosa puede estar presente en los reguladores de elución en una concentración que varía de 0.1% a 5%, de 1% a 4.5%, de 2% a 4% (por ejemplo, 3%) en peso, o cualquier cantidad entre los rangos citados, con base en el peso de los reguladores de elución. Opcionalmente, el manitol y el sorbitol se pueden incluir en los reguladores de elución en una concentración combinada de menos del 7.5% (por ejemplo, 7%) con base en el peso de los reguladores de elución. Por ejemplo, el manitol se puede incluir en una

concentración que varía de 0.01% a 7.4% (por ejemplo, de 0.1% a 7%, de 1% a 6%, de 2% a 5%, o de 3% a 4%) y el sorbitol se puede incluir en una concentración que varía de 0.01% a 7.4% (por ejemplo, de 0.1% a 7%, de 1% a 6%, de 2% a 5%, o de 3% a 4%), tal que la concentración combinada de los azúcares es inferior al 7.5% con base en el peso de los reguladores de elución.

Los aminoácidos también pueden incluirse en los reguladores de elución descritos en el presente documento. Los aminoácidos adecuados incluyen, por ejemplo, histidina, arginina, lisina, metionina, ácido glutámico, o mezclas de estos. Pueden estar presentes uno o más aminoácidos en los reguladores de elución en una concentración de 5% o menos con base en el peso de los reguladores de elución. Por ejemplo, la concentración de aminoácidos puede ser 4.5% o menos, 4.0% o menos, 3.5% o menos, 3.0% o menos, 2.5% o menos, 2.0% o menos, 1.5% o menos, 1.0% o menos, o 0.5% o menos con base en el peso de los reguladores de elución.

Como se describió anteriormente, los cationes divalentes también se incluyen en los reguladores de elución descritos en el presente documento. Un catión divalente adecuado para uso en los reguladores de elución incluye el catión de magnesio (es decir, Mg^{2+}). Se puede introducir Mg^{2+} en los reguladores de elución en combinación con un anión como una sal, tal como $MgCl_2$. En algunos ejemplos, la sal que introduce el catión divalente puede ser un hidrato (es decir, la sal que introduce el catión divalente en el regulador puede contener moléculas de agua unidas a un centro metálico o cristalizadas con el complejo). El hidrato puede ser, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, un tetrahidrato, un pentahidrato, un hexahidrato o un heptahidrato. Por ejemplo, se puede introducir Mg^{2+} en los reguladores de elución como $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Opcionalmente, los reguladores de elución están sustancialmente libres de Zn^{2+} . El catión divalente puede estar presente en los reguladores de elución en una concentración que varía de 0.01 mM a 5 mM. Por ejemplo, Mg^{2+} puede estar presente en la formulación viral como $MgCl_2$ o $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en una concentración que varía de 0.1 mM a 4.5 mM, 0.5 mM a 4 mM, 1 mM a 3 mM (por ejemplo, 2 mM), o cualquier concentración dentro de los rangos citados. Opcionalmente, los excipientes en los reguladores de elución, excluyendo los componentes de solución salina regulada con fosfato, pueden estar sustancialmente libres de sales catiónicas monovalentes, tal como, por ejemplo, sodio (Na^+), litio (Li^+), potasio (K^+) y amonio (NH_4^+) que contienen sales.

También se puede incluir un detergente en los reguladores de elución descritos en el presente documento. Un detergente se refiere a una sustancia que tiene, en combinación, un resto hidrófilo y un resto hidrófobo. Los detergentes adecuados para usar en los reguladores de elución descritos en el presente documento incluyen detergentes iónicos y no iónicos. En algunos ejemplos, el polisorbato 80 se incluye opcionalmente como detergente no iónico en los reguladores de elución. Pueden estar presentes uno o más detergentes en el regulador de elución, opcionalmente en una cantidad de menos del 1% en peso con base en el peso del regulador de elución. Por ejemplo, los detergentes pueden estar presentes en los reguladores de elución en una cantidad inferior al 0.5% en peso, inferior al 0.1% en peso o inferior al 0.05% en peso (por ejemplo, 0.01% en peso).

Opcionalmente, los reguladores de elución están sustancialmente libres de carboxilatos. Ejemplos de carboxilatos incluyen succinato y citrato.

Como se describió anteriormente, los reguladores de elución proporcionados en el presente documento incluyen además una solución salina regulada con fosfato (PBS). La solución salina regulada con fosfato puede incluir, por ejemplo, una o más sales de fosfato, una o más sales de cloruro, o una combinación de estas. Opcionalmente, la una o más sales de fosfato incluyen fosfato de disodio y/o dihidrógeno fosfato de potasio. Ejemplos de sales de cloruro adecuadas para usar en los reguladores de elución incluyen cloruro de sodio y/o cloruro de potasio. Las sales utilizadas para preparar la solución salina regulada con fosfato son opcionalmente hidratos. Como se describió anteriormente, el hidrato puede ser, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, un tetrahidrato, un pentahidrato, un hexahidrato o un heptahidrato. Por ejemplo, el fosfato de disodio utilizado para preparar la solución salina regulada con fosfato puede ser heptahidrato de fosfato de disodio (es decir, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$).

Una combinación ejemplar de sales utilizadas para preparar la solución salina regulada con fosfato para su uso en los reguladores de elución incluye fosfato de disodio heptahidratado (es decir, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), dihidrógeno fosfato de potasio (es decir, KH_2PO_4), cloruro de sodio (es decir, $NaCl$) y cloruro de potasio (es decir, KCl). Opcionalmente, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ puede usarse en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ de 5 mM a 15 mM o cualquier cantidad intermedia en la solución salina regulada con fosfato. Por ejemplo, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ se puede usar en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de 7.5 mM a 12.5 mM o de 9 mM a 11mM (por ejemplo, 10.14 mM), o cualquier cantidad intermedia. Opcionalmente, KH_2PO_4 puede usarse en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de 0.5 mM a 5 mM, o cualquier cantidad intermedia, en la solución salina regulada con fosfato. Por ejemplo, KH_2PO_4 se puede usar en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de 1.0 mM a 3.0 mM o de 1.5 mM a 2.0 mM (por ejemplo, 1.76 mM), o cualquier cantidad intermedia. Opcionalmente, se puede usar $NaCl$ en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de 75 mM a 200 mM, o cualquier cantidad intermedia, en la solución salina regulada con fosfato. Por ejemplo, $NaCl$ se puede usar en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de 100 mM a 175 mM o de 125 mM a 150 mM (por ejemplo, 137 mM), o cualquier cantidad intermedia. Opcionalmente, KCl puede usarse en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de 0.5 mM a 5 mM, o cualquier cantidad intermedia, en la solución salina regulada con fosfato. Por ejemplo, KCl se puede usar en una cantidad suficiente

para proporcionar una concentración de 1.0 mM a 4.0 mM o de 1.5 mM a 3.0 mM (por ejemplo, 2.68 mM), o cualquier cantidad intermedia.

Una combinación de ejemplo de excipientes, catión divalente, detergente y solución salina regulada con fosfato para formar un regulador de elución como se describe en el presente documento incluye manitol, histidina, sorbitol, MgCl₂, polisorbato 80 y solución salina regulada con fosfato. El sorbitol puede estar presente en una concentración de menos del 3% con base en el peso del regulador de elución. Por ejemplo, el sorbitol puede estar presente en una concentración de menos del 2.9%, menos del 2.8%, menos del 2.7%, menos del 2.6%, menos del 2.5%, menos del 2.4%, menos del 2.3%, menos del 2.2% , menos del 2.1%, menos del 2%, menos del 1.9%, menos del 1.8%, menos del 1.7%, menos del 1.6%, menos del 1.5%, menos del 1.4%, menos del 1.3%, menos del 1.2% , menos del 1.1% o menos del 1%. En algunos ejemplos, la concentración combinada de manitol y sorbitol es inferior al 10% con base en el peso del regulador de elución. Por ejemplo, la concentración de manitol puede ser del 3% y la concentración de histidina puede ser del 2% para proporcionar una concentración combinada del 5%. El polisorbato 80 puede estar presente en una cantidad inferior al 0.1% en peso del regulador de elución (por ejemplo, 0.01%). En estos ejemplos, la solución salina regulada con fosfato puede comprender fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio y cloruro de potasio. Además, el regulador de elución puede estar sustancialmente libre de sales catiónicas monovalentes, Zn²⁺ y/o trehalosa.

Otro regulador de elución adecuado incluye sacarosa, MgCl₂, polisorbato 80 y una solución salina regulada con fosfato. Opcionalmente, la sacarosa está presente en una concentración de menos de 5% con base en el peso del regulador de elución. Por ejemplo, la sacarosa puede estar presente en una concentración de 4.5% o menos, 4% o menos, 3.5% o menos, 3% o menos, 2.5% o menos, o 2% o menos con base en el peso del regulador de elución. En estos ejemplos, la solución salina regulada con fosfato puede comprender fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio y cloruro de potasio. Además, el regulador de elución puede estar sustancialmente libre de sales catiónicas monovalentes, polioles sin sacarosa y carboxilatos (por ejemplo, succinato y citrato).

Los reguladores de elución descritos en el presente documento pueden usarse como reguladores de elución de cromatografía por permeación en gel para purificar virus durante, por ejemplo, la fabricación de virus. Los métodos para purificar un virus como se describe en el presente documento incluyen poner en contacto una columna de cromatografía por permeación en gel con una preparación viral que incluye un virus y un portador líquido.

Los virus para uso en las preparaciones virales descritas en el presente documento incluyen virus con envoltura y sin envoltura. Los virus con envoltura y sin envoltura pueden ser virus de ADN, virus de ARN o retrovirus. Opcionalmente, el virus para usar en las preparaciones virales descritas en el presente documento es un virus sin envoltura. Los virus sin envoltura incluyen, por ejemplo, virus que pertenecen a las familias de Adenoviridae (por ejemplo., Adenovirus), Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio), Reoviridae (por ejemplo., Reovirus), Papillomaviridae (por ejemplo., Virus del papiloma), Polyomaviridae (por ejemplo, Poliomasvirus), Parvoviridae (por ejemplo, Virus de rata Kilham) e Iridoviridae (por ejemplo, virus tipula iridiscente).

Opcionalmente, el virus es un virus oncolítico. Los virus adecuados para usar en las preparaciones virales y los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limita a virus de, myoviridae, siphoviridae, podoviridae, tectiviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxviridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adenoviridae, papovaviridae, polydnaviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, cystoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyviridae, calciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, flaviviridae, togaviridae, barnaviridae, y bornaviridae.

Las preparaciones virales incluyen opcionalmente un reovirus. Como se usa en el presente documento, reovirus se refiere a cualquier virus clasificado en el género de reovirus, incluidos los reovirus naturales y recombinantes. Los reovirus son virus con un genoma de ARN segmentado de doble cadena. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y poseen dos cubiertas de cápsida icosaédricas concéntricas. El genoma consiste en ARN de doble cadena en 10-12 segmentos discretos con un tamaño total del genoma de 16-27 pares de kilobase (kbp). Los segmentos de ARN individuales varían en tamaño. Se han recuperado tres tipos distintos pero relacionados de reovirus de muchas especies. Los tres tipos comparten un antígeno común de fijación de complemento. El reovirus humano consta de tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang, T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) y tipo 3 (cepa Dearing, T3D o cepa Abney, T3A).

Como se describió anteriormente, el reovirus puede ser un reovirus recombinante, que puede ser natural o no natural. El reovirus se describe como de origen natural cuando puede aislarse de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionalmente por humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una fuente de campo (es decir, de un humano que ha sido infectado con el reovirus). El reovirus también puede seleccionarse o mutagenizarse para una actividad mejorada (por ejemplo, actividad oncolítica). Se pueden encontrar ejemplos de reovirus específicos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 7,803,385 o en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2008/0292594.

El reovirus puede modificarse, pero aún es capaz de infectar lícitamente una célula de mamífero que tiene una ruta ras activa. El reovirus puede pretratarse química o bioquímicamente (por ejemplo, mediante tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) anterior a la administración a las células proliferantes. El tratamiento previo con una proteasa elimina la capa externa o la cápsida del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede recubrirse en un liposoma o micela (Chandran y Nibert, *Journal of Virology*, 72 (1): 467-75 (1998)). Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula subviral infecciosa (ISVP).

El reovirus puede ser un reovirus recombinante o reordenado resultante de la recombinación/reordenamiento de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos. La recombinación/reordenamiento de segmentos genómicos de reovirus puede ocurrir en la naturaleza después de la infección de un organismo huésped con al menos dos reovirus genéticamente distintos. Los viriones recombinantes también pueden generarse en cultivo celular, por ejemplo, por coinfección de células huésped permisivas con reovirus genéticamente distintos. En consecuencia, el reovirus recombinante para su uso en las formulaciones descritas en el presente documento puede resultar del reordenamiento de segmentos del genoma de dos o más reovirus genéticamente distintos, que incluye, pero no se limita a, reovirus humano, tal como el tipo 1 (por ejemplo, Cepa Lang), tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones) y tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney), reovirus de mamíferos no humanos o reovirus aviar. En algunos ejemplos, los reovirus recombinantes pueden resultar del reordenamiento de segmentos del genoma de dos o más reovirus genéticamente distintos en donde al menos un virus parental está genéticamente modificado, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados químicamente, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos, o es en sí mismo el resultado de un evento de recombinación. El reovirus recombinante puede experimentar recombinación, por ejemplo, en presencia de mutágenos químicos, que incluye, pero no se limita a sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, que incluye, pero no se limita a la luz ultravioleta y otras formas de radiación.

Otros ejemplos de reovirus recombinantes adecuados incluyen aquellos que comprenden deleciones o duplicaciones en uno o más segmentos del genoma, que comprenden información genética adicional como resultado de la recombinación con un genoma de la célula huésped, o que comprenden genes sintéticos. El reovirus también se puede modificar mediante la incorporación de proteínas de recubrimiento mutadas, tal como por ejemplo $\sigma 3$, en la cápsida externa del virión. Las proteínas pueden mutarse por reemplazo, inserción o deleción. El reemplazo incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de residuos de aminoácidos adicionales en la proteína en una o más ubicaciones. Las deleciones incluyen deleciones de uno o más residuos de aminoácidos en la proteína. Dichas mutaciones pueden generarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótidos del gen que codifica una de las proteínas de recubrimiento puede dar como resultado la generación de la proteína de recubrimiento mutante deseada. En una realización, el reovirus es IDAC # 190907-01.

Los virus para usar en las preparaciones virales descritas en el presente documento pueden haber experimentado uno o más pasos de purificación previos. Los virus pueden purificarse antes de los métodos de cromatografía por permeación en gel descritos en el presente documento, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en las patentes estadounidenses números 6.808.916; 7.186.542; 7.223.585; y 7,901,921 y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2007/0269856. Por ejemplo, el virus se puede separar de otras partículas utilizando las técnicas de centrifugación en gradiente de densidad, ultrafiltración, diafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida de alto rendimiento o combinaciones de estas.

Las preparaciones virales descritas en el presente documento incluyen además un portador líquido. Los portadores líquidos adecuados pueden ser portadores acuosos o no acuosos. Ejemplos de portadores no acuosos adecuados incluyen propilenglicol, polietilenglicol y aceites, incluidos los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceite de oliva y similares. Los ésteres orgánicos tal como el oleato de etilo también son portadores no acuosos adecuados. Los portadores acuosos incluyen agua, etanol, glicerol, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y regulados. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos. La preparación, si se desea, también puede contener agentes humectantes o emulsionantes, lubricantes, deslizantes, emolientes, humectantes, espesantes, agentes aromatizantes, conservantes o reguladores de pH. Los reguladores de pH, además de la solución salina regulada con fosfato incluida en los reguladores de elución, pueden incluirse para controlar el pH de la preparación viral. En algunos ejemplos, el regulador se incluye para mantener el pH de la preparación viral entre 5 y 8.5. Por ejemplo, el regulador se puede incluir para mantener el pH de la formulación viral entre 6.8 y 8.0 o entre 7.0 y 7.8 (por ejemplo, 7.4). Ejemplos de reguladores adecuados incluyen reguladores de fosfato tales como regulador de fosfato 0.05 M, reguladores de acetato, reguladores de benzoato, reguladores de citrato, reguladores de lactato, reguladores de maleato y reguladores de tartratos. Se pueden usar portadores regulados como la solución de Hanks, la solución de Ringer, la solución de dextrosa, la albúmina de suero humano al 5%, la dextrosa de Ringer, la dextrosa y el cloruro de sodio, lactato de Ringer y aceites fijos, polietilenglicol, polivinilpirrolidona o lecitina. Las soluciones de monoetanolamina, dietanolamina, trometamina y glicina también se pueden usar como reguladores adecuados. Los liposomas y los vehículos no acuosos, tal como los aceites fijos, también pueden usarse como portadores. Otros ejemplos de portadores adecuados se describen en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (21^a ed.) Ed. David B.

Troy, Lippincott Williams & Wilkins, 2005. En algunos ejemplos, los reguladores Tris no se usan en las preparaciones virales o los reguladores de elución descritos en el presente documento.

Las preparaciones virales se preparan combinando el virus con un portador líquido. En algunos ejemplos, se proporciona una cantidad adecuada de virus para preparar una preparación viral en un título que varía de 1×10^5 a 1×10^{14} partículas virales por mililitro (VP/mL). Alternativamente, el portador líquido se puede agregar a un cultivo de células infectadas con virus. Como se usa en el presente documento, un cultivo de células se refiere a una población de células cultivadas tal como se encuentra en sus condiciones de cultivo (por ejemplo, las células infectadas con virus y el medio de cultivo). Además, una solución o suspensión de células infectadas con virus puede diluirse con el portador líquido para producir la preparación viral.

Opcionalmente, el portador líquido de la preparación viral es el regulador de elución como se describe en el presente documento. En realizaciones en las que el portador líquido es distinto del regulador de elución, la preparación viral se puede usar directamente en los métodos de cromatografía por permeación en gel. Alternativamente, se puede realizar un intercambio de regulador para proporcionar una preparación viral con el regulador de elución como portador líquido. El intercambio de regulador se puede realizar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el intercambio de regulador se puede realizar utilizando métodos de filtración.

Como se discutió anteriormente, los métodos para purificar un virus incluyen poner en contacto una columna de cromatografía por permeación en gel con una preparación viral como se describe en el presente documento. Los métodos para purificar el virus se pueden realizar usando un aparato que incluye una columna de cromatografía por permeación en gel y un regulador de elución como se describe en el presente documento. La columna de cromatografía por permeación en gel para uso en los métodos e incluida en el aparato descrito en el presente documento puede estar disponible comercialmente. Por ejemplo, la columna de cromatografía por permeación en gel puede ser una columna BPG, disponible comercialmente en GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Reino Unido), una columna XK 16/70, disponible comercialmente en Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) u otros equivalentes. Los ejemplos de resinas adecuadas para su uso en la columna de cromatografía por permeación en gel incluyen la resina SEPHAROSE 4 Fast Flow y la resina SEPHAROSE CL-4B, ambas disponibles comercialmente en GE Healthcare, u otros equivalentes. Otros ejemplos de columnas de cromatografía por permeación en gel adecuadas incluyen columnas SUPERDEX (por ejemplo, la columna SUPERDEX-200) y columnas SEPHAROSE (por ejemplo, la columna de resina SEPHAROSE 4 FF), ambas disponibles comercialmente en GE Healthcare u otros equivalentes. Opcionalmente, la columna de cromatografía por permeación en gel se equilibra con el regulador antes de poner en contacto la columna con la preparación viral. Poner en contacto con la columna de cromatografía por permeación en gel incluye, por ejemplo, cargar manualmente la preparación en la columna o cargar la preparación en la columna utilizando un sistema automatizado. El virus se retiene en la columna de cromatografía por permeación en gel después de la carga y posteriormente se recupera de la columna haciendo pasar el regulador de elución como se describe en el presente documento a través de la columna. La elución del virus se puede detectar utilizando, por ejemplo, un detector ultravioleta o midiendo la conductividad o el índice de refracción del eluyente.

Los métodos descritos en el presente documento proporcionan una recuperación incrementada del virus de la columna de cromatografía por permeación en gel usando los reguladores de elución descritos en el presente documento en comparación con la recuperación del virus obtenido usando otros reguladores de elución. En algunos ejemplos, la recuperación viral usando los reguladores de elución descritos en el presente documento es al menos aproximadamente un 20% mayor que la recuperación de un virus eluido solo con solución salina regulada con fosfato (es decir, solución salina regulada con fosfato sin los excipientes, catión divalente y, opcionalmente, el detergente) Por ejemplo, la recuperación viral es al menos aproximadamente un 25% mayor, al menos aproximadamente un 30% mayor o al menos aproximadamente un 35% mayor que la recuperación de un virus eluido solo con solución salina regulada con fosfato.

Los métodos descritos en el presente documento proporcionan formulaciones virales purificadas. Las formulaciones virales purificadas incluyen un virus eluido de una columna de cromatografía por permeación en gel y un regulador de elución que se ha puesto en contacto con el medio de cromatografía por permeación en gel. El virus eluido puede ser un virus purificado. Como se usa en el presente documento, los virus purificados se refieren a virus que se han separado de los componentes celulares que los acompañan naturalmente. Por lo general, los virus se consideran purificados cuando tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% en peso seco, libres de las proteínas y otros componentes celulares con los que están naturalmente asociados.

Opcionalmente, las formulaciones virales purificadas descritas en el presente documento pueden almacenarse durante un período de tiempo en el regulador de elución que se ha puesto en contacto con el medio de cromatografía por permeación en gel. Por ejemplo, después de que la formulación viral purificada que contiene el virus purificado y el regulador de elución eluido de la columna de cromatografía por permeación en gel, la formulación viral purificada se puede almacenar hasta por doce meses (incluyendo, por ejemplo, un día, una semana, un mes, tres meses, seis meses, nueve meses o doce meses). En algunos ejemplos, las formulaciones virales purificadas retienen la infectividad viral durante el período de almacenamiento. Las formulaciones virales purificadas se pueden almacenar a aproximadamente temperatura ambiente o por debajo de la temperatura

ambiente. Como se usa en el presente documento, la temperatura ambiente se refiere a una temperatura entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 30 °C.

Se han descrito varios aspectos. Sin embargo, se entenderá que se pueden hacer varias modificaciones. Además, cuando se describe una característica o paso, se puede combinar con cualquier otra característica o paso en el presente documento, incluso si la combinación no se establece explícitamente. En consecuencia, otros aspectos están dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales

Los materiales utilizados para preparar los reguladores de elución se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) a menos que se indique lo contrario. Se preparó una solución de trabajo de Tween 80 al 1% en agua de grado Milli-Q combinando 50.06 gramos de agua de grado Milli-Q y 1.03 gramos de reserva de Tween 80. Después de mezclar los componentes, se añadió agua adicional de grado Milli-Q para obtener 100 g de solución. Se preparó una solución de trabajo de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mM combinando 80.61 gramos de agua de grado Milli-Q y 2.04 gramos de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Después de mezclar los componentes, se añadió agua adicional de grado Milli-Q para obtener 100 g de solución.

Ejemplo 2: regulador de elución 1

El regulador de elución 1 se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se combinaron agua de grado Milli-Q (1.0 kg) y L-histidina (32.0 g) y se agitaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla se calentó luego a 40 ± 5 °C para disolver completamente la L-histidina en el agua. Luego se eliminó el calor y se añadieron los siguientes componentes a la mezcla: D-manitol (48.02 g), solución de trabajo Tween 80 al 1% (16.02 g), D-sorbitol (32.03 g), solución de trabajo de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mM (32.0 g), KH_2PO_4 (0.38 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.36 g), KCl (0.32 g) y NaCl (12.80 g). Los componentes se mezclaron bien y se añadió agua adicional de grado Milli-Q para lograr 1.6 kg de regulador.

El pH del regulador fue de 7.52 utilizando un medidor de pH que se calibró el mismo día en que se preparó el regulador. Luego se filtró el regulador de elución a través de un sistema de filtrado Millipore con una membrana HA de 0,45 μm (Millipore; Billerica, MA) y se desgasificó durante 30 minutos a temperatura ambiente para formar el Regulador de Elución 1.

Ejemplo 3: Regulador de elución 2 (referencia)

El regulador de elución 2 se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Agua de grado Milli-Q (1.0 kg), sacarosa (64.0 g), Tween 80 (0.81 g), solución de trabajo de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mM (32.0 g), KH_2PO_4 (0.38 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.35 g), KCl (0.32 g) y NaCl (12.80 g) se combinaron. Los componentes se mezclaron bien y se añadió agua adicional de grado Milli-Q para lograr 1.6 kg de regulador.

El pH del regulador fue de 7.40 utilizando un medidor de pH que se calibró el mismo día en que se preparó el regulador. El regulador de elución se filtró luego a través de un sistema de filtrado Millipore con una membrana HA de 0,45 μm (Millipore; Billerica, MA) y se desgasificó durante 30 minutos a temperatura ambiente para formar el Regulador de Elución 2.

Ejemplo 4: Regulador de elución 1 -2x

El regulador de elución 1 se preparó en una formulación dos veces más concentrada que la mostrada en el Ejemplo 2 de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se combinaron agua de grado Milli-Q (61.78 g) y L-histidina (4.00 g) y se agitaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla se calentó luego a 40 °C durante 27 minutos para disolver completamente la L-histidina en el agua. Luego se eliminó el calor y se agregaron los siguientes componentes a la mezcla: D-manitol (6.00 g), solución de trabajo Tween 80 al 1% (2.02 g), D-sorbitol (4.00 g), solución de trabajo de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mM (4.01 g), KH_2PO_4 (0.024 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.27 g), KCl (0.021 g) y NaCl (0.81 g). Los componentes se mezclaron bien y se añadió agua adicional de grado Milli-Q para lograr 100 g de regulador.

El pH del regulador fue de 7.59 utilizando un medidor de pH que se calibró el mismo día en que se preparó el regulador. El regulador de elución se filtró luego a través de un sistema de filtrado Corning de 150 ml con una membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm (Corning Incorporated; Corning, NY) para formar el Regulador de Elución 1 - 2x.

Ejemplo 5: Regulador de elución 2 -2x (Referencia)

El regulador de elución 2 se preparó en una formulación dos veces más concentrada que la mostrada en el Ejemplo 3 de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se combinaron agua de grado Milli-Q (60.0 g), sacarosa (8.00 g), solución de trabajo Tween 80 al 1% (10.0 g), solución de trabajo de MgCl₂·6H₂O 100 mM (4.01 g), KH₂PO₄ (0.024 g), Na₂HPO₄·7H₂O (0.27 g), KCl (0.021 g) y NaCl (0.80 g). Los componentes se mezclaron bien y se añadió agua adicional de grado Milli-Q para lograr 100 g de regulador.

El pH del regulador fue de 7.28 utilizando un medidor de pH que se calibró el mismo día en que se preparó el regulador. El regulador de elución se filtró luego a través de un sistema de filtrado Corning de 150 ml con una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm (Corning Incorporated; Corning, NY) para formar el Regulador de Elución 2 - 2x.

Ejemplo 6: preparaciones virales

Se preparó una preparación viral de control (Preparación de control) proporcionando 2.76 x 10¹⁴ partículas de reovirus en solución salina regulada con fosfato (PBS). La preparación 1 viral se preparó proporcionando 2.76 x 10¹⁴ partículas de reovirus en el Regulador de Elución 1. La preparación 2 viral se preparó proporcionando 2.76 x 10¹⁴ partículas de reovirus en el Regulador de Elución 2.

Ejemplo 7: recuperación viral después de la cromatografía por permeación en gel

Las preparaciones virales preparadas en el Ejemplo 6 (Preparación de control, Preparación 1 viral y Preparación 2 viral) se cargaron cada una individualmente en columnas de cromatografía por permeación en gel. La preparación de control, la preparación 1 viral y la preparación 2 viral fueron eluidas con PBS, formulación 1 de regulador y formulación 2 de regulador, respectivamente. Los datos medios se muestran en las Tablas 1 y 2 de experimentos separados.

Tabla 1

Preparación viral	Regulador de elución	Partículas virales totales pre-GPC	Partículas virales totales post-GPC	Etapa de Recuperación %
Formulación de control	PBS	2.76 x 10 ¹⁴	2.07 x 10 ¹⁴	75%
Preparación 1 viral	Regulador de elución 1	2.76 x 10 ¹⁴	2.96 x 10 ¹⁴	107%
Preparación 2 viral	Regulador de elución 2	2.76 x 10 ¹⁴	3.05 x 10 ¹⁴	111%

Tabla 2

Preparación viral	Regulador de elución	Partículas virales totales pre-GPC	Partículas virales totales post-GPC	Etapa de Recuperación %
Formulación de control	PBS	2.51 x 10 ¹⁶	1.70 x 10 ¹⁶	68%
Formulación de control	PBS	1.31 x 10 ¹⁶	9.58 x 10 ¹⁵	73%
Preparación viral 1	Regulador de elución 1	1.57 x 10 ¹⁶	1.42 x 10 ¹⁶	90%
Preparación viral 1	Regulador de elución 1	4.29 x 10 ¹⁶	4.13 x 10 ¹⁶	96%
Preparación viral 1	Regulador de elución 1	3.28 x 10 ¹⁶	3.48 x 10 ¹⁶	106%

Como se muestra en la Tabla 1, el uso del Regulador de Elución 1 con reovirus en la columna de permeación de gel aumentó la recuperación viral del 75% al 107%, en comparación con el uso de PBS solo. La Tabla 2 demuestra que la recuperación viral aumenta constantemente usando el Regulador de Elución 1 en comparación con el uso de PBS solo. Además, el uso del Regulador de Elución 2 con reovirus en la columna de permeación de gel aumentó la recuperación viral del 75% al 111%, en comparación con el uso de PBS solo (ver Tabla 1). Por lo tanto, la adición de los Reguladores de Elución 1 y 2 al reovirus dio como resultado un título mejorado en aproximadamente un 32% y un 36%, respectivamente, en comparación con el uso de PBS con el reovirus.

Los métodos y sistemas de las reivindicaciones adjuntas no están limitados en su alcance por los métodos y sistemas específicos descritos en el presente documento, que están destinados a ilustrar algunos aspectos de las reivindicaciones. Se pretende que varias modificaciones de los métodos y sistemas, además de las mostradas y descritas en el presente documento, estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, aunque solo se describen específicamente ciertos métodos, sistemas y aspectos representativos de estos métodos y sistemas, otros métodos y sistemas y combinaciones de varias características de los métodos y sistemas están destinados a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, incluso si no se cita específicamente. Por lo tanto, una combinación de etapas, elementos, componentes o constituyentes puede mencionarse explícitamente en el presente documento; sin embargo, se incluyen todas las demás combinaciones de pasos, elementos, componentes y constituyentes, aunque no se indiquen explícitamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar un virus, que comprende:
 - 5 poner en contacto una columna de cromatografía por permeación en gel con una preparación viral que comprende un virus y un portador líquido, en donde el virus se retiene en la columna de cromatografía por permeación en gel; y recuperar el virus de la columna de cromatografía por permeación en gel con un regulador de elución que comprende al menos un excipiente, un catión divalente y una solución salina regulada con fosfato, en donde el al menos un excipiente comprende histidina.
 - 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el portador líquido es el regulador de elución.
 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el al menos un excipiente comprende uno o más de manitol o sorbitol.
 - 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el catión divalente es Mg^{2+} , opcionalmente, en donde Mg^{2+} está presente como cloruro de magnesio.
 - 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la solución salina regulada con fosfato comprende una combinación de una o más sales de fosfato y una o más sales de cloruro.
 6. El método de la reivindicación 5, en donde la una o más sales de fosfato comprenden fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de potasio, o una combinación de los mismos, y en donde la una o más sales de cloruro comprenden cloruro de sodio, cloruro de potasio, o una combinación de los mismos.
 - 25 7. El método de la reivindicación 1, en donde el regulador de elución comprende además un detergente.
 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde cuando el regulador de elución comprende un detergente, dicho detergente comprende un detergente no iónico, opcionalmente, en donde el detergente no iónico es polisorbato 80.
 - 30 9. El método de la reivindicación 1, en donde el regulador de elución comprende manitol, histidina, sorbitol, polisorbato 80 y $MgCl_2$ y en donde la solución salina regulada con fosfato comprende fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio y cloruro de potasio.
 - 35 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además almacenar el virus en el regulador de elución.
 - 40 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el virus es un virus oncolítico; o en donde el virus es un virus no envuelto; opcionalmente, un reovirus; opcionalmente, un reovirus de mamífero; opcionalmente, un reovirus humano; opcionalmente, un reovirus de serotipo 3; y opcionalmente, una cepa de Deering del reovirus del serotipo 3.
 - 45 12. El método de la reivindicación 11, en donde el virus es un reovirus recombinante o reordenado y opcionalmente en donde el virus es un reovirus y el reovirus es IDAC # 190907-01.
 13. Un sistema que comprende:
 - 50 una columna de cromatografía por permeación en gel; y un regulador de elución, en donde el regulador de elución comprende al menos un excipiente, un catión divalente y una solución salina regulada con fosfato, y en donde el al menos un excipiente comprende histidina.
 - 55 14. El sistema de la reivindicación 13, en donde la columna de cromatografía por permeación en gel se equilibra con el regulador.
 15. El sistema de la reivindicación 13 o 14, en donde el sistema comprende además una preparación viral que comprende un virus y un portador líquido.