

Informe experimental – Fabricación de AAV de acuerdo con Potter

La fabricación y purificación de AAV se realizó de acuerdo con el Proceso B clínico y posteriormente comercial de acuerdo con la presente invención, con y sin el paso de ultracentrifugación con CsCl.

Las células HEK293 se expandieron primero a través de siete pases en matraces desechables en incubadoras de CO₂ a 37°C y 5 % de CO₂. A continuación, las células se sembraron en un biorreactor iCELLis para una mayor expansión de células adherentes dentro del biorreactor. Después de 4 días de crecimiento celular en el biorreactor a 37°C, las células se transfectaron con una coprecipitación de PEI con plásmido de ADN triple. Los 3 plásmidos utilizados para la transfección fueron pSMN, es decir, el plásmido de carga codificante de SMN1, pHELP y el plásmido rep/cap pAAV2/9.

Cuatro días después de la transfección, primero se agregó benzonasa al biorreactor, y luego, tampón de lisis. Después de la incubación, el contenido del biorreactor se transfirió a bolsas de recolección. Luego, la cosecha se filtró a través de un filtro de profundidad y un filtro de 0,45 µm. A continuación, se realizó una filtración de flujo tangencial (TFF), para obtener el intermediario TFF1.

La floculación de impurezas se inició en el intermediario TFF1 mediante la disminución del pH hasta un pH objetivo de 3,5, utilizando glicina 1 M a pH 2,5 y la adición de Tween-20. El floculado formado después de la acidificación se eliminó mediante la filtración de profundidad y la filtración de pulido utilizando un filtro de 0,45 µm.

El intermediario TFF1 acidificado y clarificado se cargó en una columna CEX. El eluato de CEX se concentró mediante un segundo paso de TFF (TFF2) para obtener el conjunto TFF2.

El conjunto TFF2 se dividió en dos muestras, y una de las dos muestras se procesó adicionalmente mediante ultracentrifugación con CsCl. Se añadió CsCl a la muestra de TFF2 hasta una densidad de solución final de aproximadamente 1,37 g/mL. Este material se centrifugó a 50.000 rpm durante 18 horas a 20°C en 3 tubos de ultracentrífuga Beckman QuickSeal Ultra–Clear. El tubo después de la ultracentrifugación se muestra en la Figura 1, donde bajo la iluminación, las bandas del virus son claramente visibles, con una banda vacía prominente cerca de la parte superior del gradiente, y bandas de mayor densidad que contienen cápsides completas, más abajo en el gradiente.



Figura 1: Fotografía del tubo de ultracentrifuga después de la centrifugación en gradiente de CsCl.

Las bandas vacías y completas resultantes se extrajeron individualmente de cada uno de los tres tubos.

Luego se analizaron tres muestras diferentes mediante ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación (SV–AUC, por sus siglas en inglés): la muestra del conjunto TFF2 que no se había procesado adicionalmente mediante UC, las bandas vacías combinadas y las bandas completas combinadas después de la UC (ultracentrifugación).

El resultado de la SV–AUC de la muestra del conjunto TFF2 que no se había procesado adicionalmente mediante UC se muestra en la Figura 2. El pico de virus vacío fue abundante a 60 s, lo que representa el 64 % del área del pico, con picos adicionales de mayor densidad presentes aproximadamente a 84 y 98 s, lo que representa el 30 % del área del pico.

Los resultados de la SV–AUC de las bandas completas se muestran en la Figura 3. No se detectó el pico de virus vacío a 60 s. Los picos restantes de mayor densidad aproximadamente a 85 y 100 s demuestran la purificación de las cápsides completas.

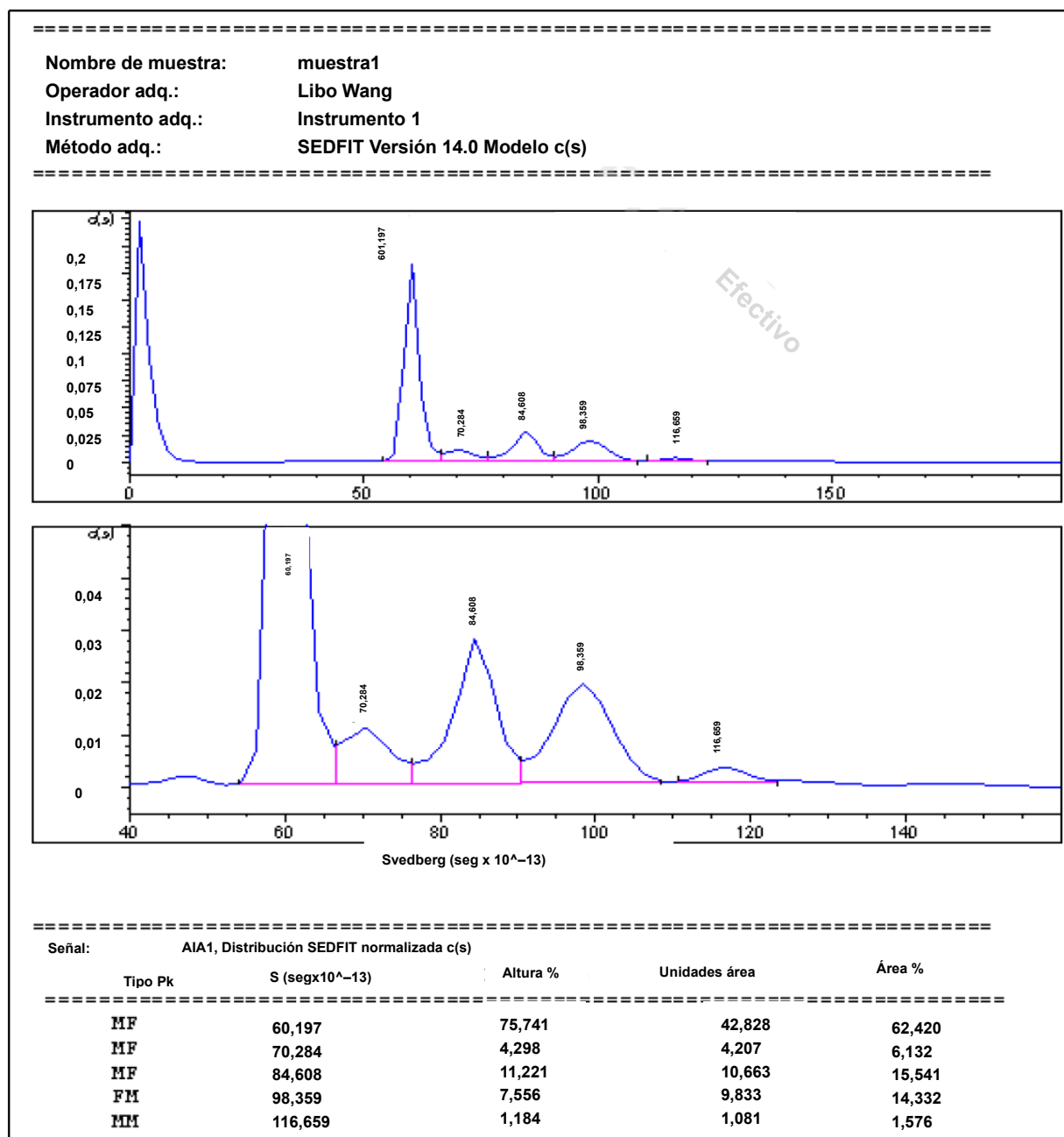


Figura 2: Datos AUC de muestra de conjunto TFF2 no procesada por UC CsCl.

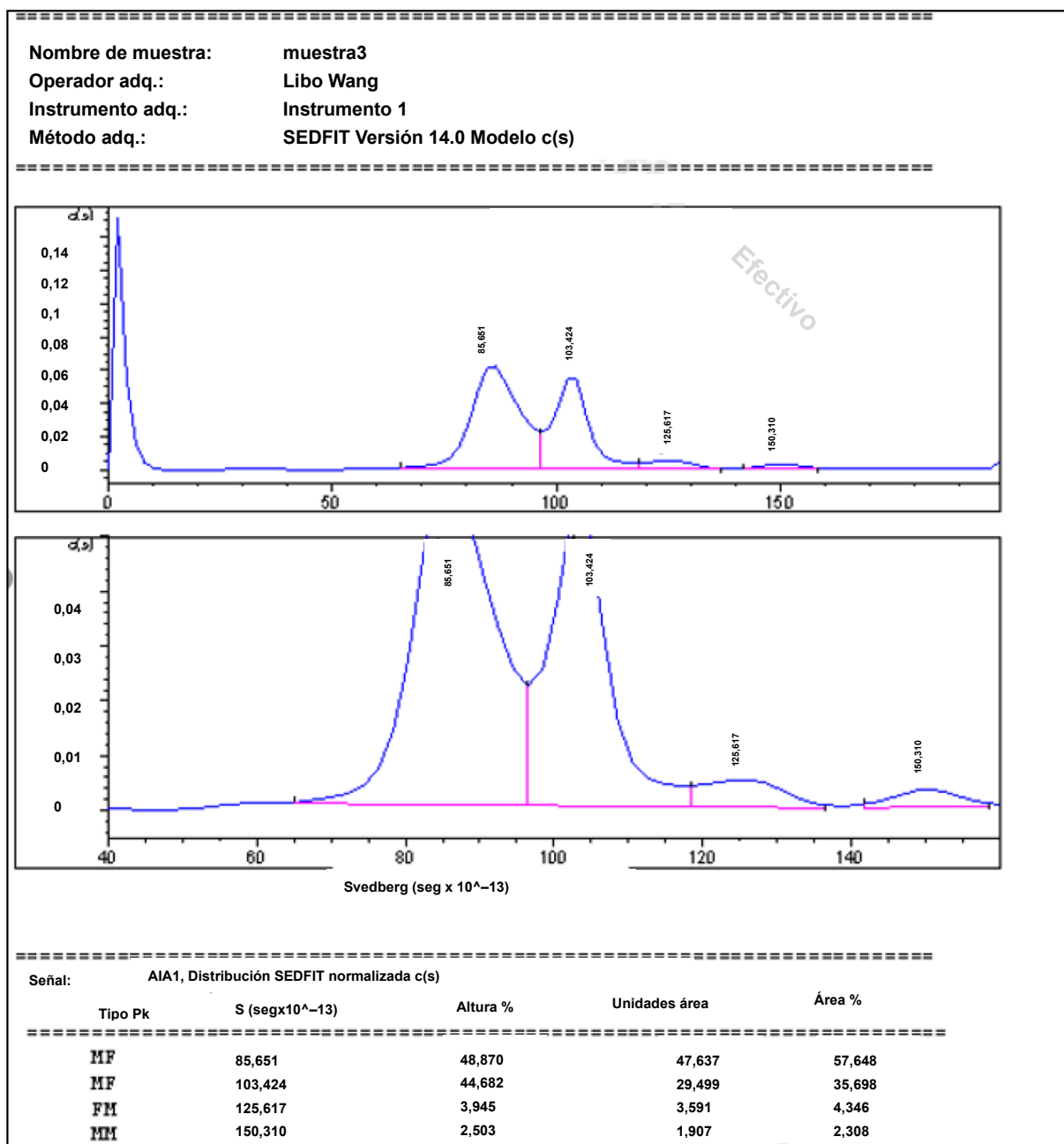


Figura 3: Datos de AUC de bandas de cápside completas recolectadas después de la purificación con gradiente de CsCl.

En la Tabla 1 se muestra una tabla del análisis de sedimentación continua de la muestra del conjunto TFF2 no procesada mediante UC preparativa con CsCl, las bandas vacías combinadas y las bandas completas combinadas.

Muestra	Pico principal 1 (P1)			Pico principal 2 (P2)			Pico principal 3 (P3)			Relación P1 (P2+P3)/
	valor s—	% área	MW (MDa)	valor s—	% área	MW (MDa)	valor s	área %	MW (MDa)	
Conjunto TFF2	60,20	62,42	4,17	84,61	15,54	6,88	98,36	14,33	8,70	0.48
Bandas vacías	62,76	87,16	3,72	87,33	2,26	6,23	100,95	2,61	7,84	0.06
Bandas completas	N/A			85,65	57,65	4,98	103,42	35,70	6,56	N/A

Tabla 1: Resultados de análisis de sedimentación continua.

Estos resultados demuestran que la centrifugación con CsCl logró reducir significativamente la proporción de cápsides vacías, de 62,42 % en la muestra del conjunto TFF2, a no ser detectable en las bandas completas combinadas.

Por lo tanto, un proceso de purificación como el descrito en Potter, WO 2016/004319, que comprende la producción de AAV en células HEK293 y la purificación por acidificación y clarificación, CEX y TFF, pero que no incluye un paso de ultracentrifugación con CsCl, produce una preparación de AAV con más de 50 % de cápsides vacías, mientras que el proceso de purificación de AAV de acuerdo con la presente invención produce preparaciones de AAV altamente puras, con una relación de cápsides vacías por debajo del 7 %.