

Informe experimental – Fabricación de AAV de acuerdo con Wright

La fabricación y purificación de AAV se realizó de acuerdo con Wright, WO 2011/094198. El proceso descrito en Wright para un producto de AAV2 recombinante que codifica hRPE65 es un proceso combinado de ultracentrifugación en gradiente y columna que comprende los pasos de recolección, lisis celular, clarificación por filtración, purificación CEX, TFF, ultracentrifugación en gradiente de CsCl, TFF y formulación, pero no comprende un paso de acidificación y clarificación posterior como el proceso de acuerdo con la presente invención. El proceso de fabricación y purificación de AAV de Wright se realizó para un rAAV9 que codifica SMN1, es decir, el producto farmacológico Zolgensma, siguiendo de cerca el protocolo descrito en las páginas 26 y 27 del documento WO 2011/094198.

En detalle: 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 de 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.

A continuación, el lisado celular clarificado se sometió a una purificación por intercambio catiónico sin un paso previo de acidificación y clarificación posterior, como se incluye en el Proceso B clínico y posteriormente comercial para Zolgensma de acuerdo con la presente invención. La columna CEX contenía resina POROS™ 50 HS, como se describe en Wright.

Inicialmente, la carga de la solución de AAV en la columna CEX se realizó a pH neutro como se describe en Wright para el vector AAV2.hRPE65v2 a base de AAV2, es decir, todas las fases móviles, incluido el intermediario TFF1 y los tampones utilizados durante el procesamiento CEX, se ajustaron a pH 7. Antes de ajustar el intermediario TFF1 hasta un pH de 7 titulando con tampón de glicina 1 M de pH 2,5, la concentración de sal del intermediario TFF se ajustó mediante la adición de agua desionizada hasta 8 mM de Tris, 0,4 mM de MgCl₂, 200 mM de NaCl, 0,4 % de sacarosa. El intermediario TFF1 con pH y sal ajustados se cargó luego en la columna CEX POROS™ 50 HS. Las partículas de AAV se eluyeron mediante elución por pasos con una solución salina tamponada neutra en una concentración de sal de 400 mM de NaCl. Sin embargo, como se determinó mediante ddPCR, se unieron y se recolectaron

cantidades insuficientes de AAV de la columna CEX, lo que hizo que el procesamiento posterior fuera inviable (ver la Tabla 1). Esto probablemente se deba a que la cápside de AAV9 no tiene carga neta (cerca de su punto isoelectrico) a pH neutro, lo que evita que se una a los ligandos CEX cargados negativamente. Por lo tanto, el protocolo exacto que se describe en Wright parece no ser adecuado para la producción a gran escala de un producto farmacológico de AAV9 recombinante como Zolgensma.

El paso de CEX se repitió con la carga de la solución de AAV a pH 5. Como antes, la sal del intermediario TFF1 se ajustó primero mediante la adición de agua desionizada a 8 mM de Tris, 0,4 mM de $MgCl_2$, 200 mM de NaCl, 0,4 % de sacarosa. Luego, todas las fases móviles, incluido el intermediario TFF1 y los tampones utilizados en el procesamiento de CEX, se ajustaron a pH 5, que todavía está cerca de neutro pero por debajo del punto isoelectrico de AAV9. La elución se realizó mediante elución por pasos utilizando una solución salina tamponada de aproximadamente 400 mM de NaCl con un pH de 5. El ajuste del pH durante el procesamiento de CEX a 5 aseguró que el producto AAV9 tuviera una carga neta positiva, lo que le permitió unirse de manera efectiva a los ligandos CEX cargados negativamente. Esto dio como resultado un aumento de más de 1 logaritmo de AAV recuperado en comparación con la carga a pH neutro (ver la Tabla 1).

Tabla 1. Títulos de AAV recuperado después del paso CEX.

Título genómico de AAV (vg/ml) después de la carga a pH 5,0 y 7,0.

Paso	Carga a pH 5,0 Título intermediario CEX	Carga a pH 7,0 Título intermediario CEX
Título genómico por ddPCR (vg/mL)	3,52E + 11 vg/mL	1,77E + 10 vg/mL

El proceso de purificación continuó con los rAAV recuperados después de CEX con carga a pH 5.

El eluato de CEX se concentró mediante un segundo paso de TFF (TFF2), que incluyó la concentración por ultrafiltración (UF) y luego la diafiltración en NaCl y luego CsCl, lo que produjo el conjunto TFF2.

El conjunto TFF2 se procesó adicionalmente mediante ultracentrifugación con CsCl. El producto de AAV en CsCl del paso UFDF anterior se centrifugó a 51.650 rpm durante 15,45 horas a 20°C en una ultracentrífuga Beckman Coulter XPN 100. Después de la ultracentrifugación, se observaron una banda de AAV vacía cerca de la parte superior del gradiente y bandas de mayor densidad que contenían cápsides completas más abajo en el gradiente.

Las bandas completas se extrajeron y se sometieron a diafiltración con TFF en el tampón de formulación final y se concentraron mediante ultrafiltración con TFF. Las preparaciones de AAV obtenidas se analizaron para determinar el título genómico mediante ddPCR, el ADN residual de la célula huésped, mediante qPCR, la proteína residual de la célula huésped, mediante ELISA, y la relación de cápside vacía a completa, mediante SV–AUC (sigla en inglés de "ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación"). Los resultados se muestran en la Tabla 2, junto con los atributos de calidad de los lotes 600156 y 600307 de Zolgensma obtenidos mediante el proceso B de acuerdo con la presente invención (ver los Ejemplos 9, 10, 18 y 19 y las Figuras 17A, 17B, 18 y 19 de la presente solicitud) y los criterios de liberación del producto farmacológico y la sustancia farmacológica de Zolgensma que se logran mediante el proceso B de acuerdo con la presente invención.

Tabla 2. Resumen de atributos de calidad.

Atributos de calidad de las preparaciones de AAV obtenidas mediante el proceso de Wright en comparación con las especificaciones de la sustancia farmacológica de Zolgensma.

Característica de pureza		Lotes de Zolgensma 600156 / 600307	Especificaciones de liberación de Zolgensma	Prep. AAV obtenida por el proceso de Wright
Título genómico por ddPCR (vg/mL)		3,7E+13 / 4,0E+13	3,4E+13 - 7,3E+13 ^A	9,3E+12
ADN célula huésped (pg/1,0E+13 vg)		0,76E+5 / 0,68E+5	≤ 1,1E+5 ^A	1,6E+5
HCP (ng/1,0E+13)		≤ 8	≤ 4 ^A	8
AUC	% Área de pico de cápside vacía	2 % / 4 %	≤ 5 % (66 valor S) ^B	22 %
	% Pico de cápside completa 1	n. a.	35–67 % (85, 86 valor S) ^B	26 %
	% Pico de cápside completa 2	n. a.	31–59 % (94, 95 valor S) ^B	50 %
	Otros	n. a.	≤ 6 % ^B	2 %

^A Especificación de liberación aplicable a la sustancia farmacológica (posterior a la ultracentrifugación con CsCl)

^B Especificación de liberación aplicable al producto farmacológico (posterior a la ultracentrifugación con CsCl).

Como se muestra en la Tabla 2, los atributos de calidad de la preparación de AAV obtenida con el proceso de Wright mostraron mayores niveles de cápsides vacías, ADN de la célula huésped (ADNhc) e impurezas de proteína de la célula huésped (HCP) en comparación con los lotes de Zolgensma

producidos por el proceso B de acuerdo con la invención y en comparación con las especificaciones de liberación del producto farmacológico y la sustancia farmacológica para Zolgensma que se logran con este proceso. Los datos de AUC indicaron que el nivel de cápsides vacías (22 %) es más de cuatro veces mayor utilizando el método de Wright que el límite de especificación para la sustancia farmacológica de Zolgensma (≤ 5 %). Además, el nivel de ADNhc ($1,6E+5$ pg/ $1,0E+13$ vg) es mayor que el límite de especificación utilizando el método de Wright de pH 5,0, en comparación con el límite permitido de $\leq 1,1E+5$ pg/ $1,0E+13$ vg para la sustancia farmacológica de Zolgensma. Por último, el nivel de HCP (8 ng/ $1E+13$ vg) fue el doble del límite de especificación utilizando el método de Wright de pH 5,0, en comparación con el límite permitido de ≤ 4 ng/ $1E+13$ vg para la sustancia farmacológica de Zolgensma.

En resumen, los atributos de calidad de las preparaciones de AAV obtenidas mediante el proceso Wright indican niveles elevados de ADNhc, HCP y cápsides vacías en comparación con los atributos de calidad de los lotes de Zolgensma preparados mediante el proceso B de acuerdo con la presente invención, y no cumplen con las especificaciones de liberación de Zolgensma. Por lo tanto, el proceso descrito en Wright no es adecuado para la producción a gran escala de un producto farmacológico terapéutico de rAAV9 como Zolgensma.