



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 709**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99968678 .5**

96 Fecha de presentación : **07.09.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1109892**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2001**

54 Título: **Métodos para generar preparaciones libres de auxiliares de título alto de vectores de AAV recombinantes liberados.**

30 Prioridad: **04.09.1998 US 142474**
10.03.1999 US 123685 P

73 Titular/es: **TARGETED GENETICS CORPORATION**
Suite 100, 1100 Olive Way
Seattle, Washington 98101, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

72 Inventor/es: **Atkinson, Edward, Morrow;**
Fung, Victor, P.;
Wilkins, Perry, C.;
Takeya, Ryan, K. y
Reynolds, Thomas, C.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 317 709 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 para generar preparaciones libres de auxiliares de título alto de vectores de AAV recombinantes liberados.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente al campo de vectores de virus adeno-asociados (AAV) recombinantes y preparaciones de los mismos que se pueden usar para transferencia génica. Más específicamente, se refiere a métodos para generar preparaciones con títulos altos de vectores de AAV recombinantes que están sustancialmente libres de virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus) así como a proteínas celulares por liberación de partículas virales de células productoras sin lisis celular.

Técnica antecedente

Los virus adeno-asociados (AAV) tienen características únicas que los hacen atractivos como vectores para terapia génica. Los virus adeno-asociados infectan un amplio espectro de tipos celulares. Sin embargo, son no-transformantes y no están implicados en la etiología de ninguna enfermedad humana. La introducción de ADN en células hospedadoras del destinatario generalmente conduce a persistencia a largo plazo y expresión del ADN sin alterar el metabolismo normal de la célula.

Existen al menos tres características deseables de una preparación de vector de AAV recombinante para el uso en transferencia génica, especialmente en terapia génica humana. En primer lugar, se prefiere que el vector se genere con títulos suficientemente altos para transducir una proporción eficaz de células en el tejido diana. La terapia génica *in vivo* requiere típicamente un elevado número de partículas de vector. Por ejemplo, algunos tratamientos pueden requerir más de 10^8 partículas y el tratamiento de fibrosis quística por suministro directo a las vías respiratorias puede requerir más de 10^{10} partículas. En segundo lugar, se prefiere que las preparaciones de vector estén esencialmente libres de AAV con capacidad de replicación (es decir, AAV fenotípicamente de tipo silvestre que puede replicarse en presencia de virus auxiliar o funciones de virus auxiliar). En tercer lugar, se prefiere que la preparación de vector rAAV en su totalidad esté esencialmente libre de otros virus (tales como un virus auxiliar usado en la producción de AAV) así como de virus auxiliar y proteínas celulares y otros componentes tales como lípidos y carbohidratos, para minimizar o eliminar cualquier riesgo de generar una respuesta inmune en el contexto de terapia génica. Este último punto es especialmente significativo en el contexto de AAV porque el AAV es un virus “dependiente de auxiliar” que requiere co-infección con un virus auxiliar (típicamente adenovirus) u otra provisión de funciones de virus auxiliar para replicarse y empaquetarse eficazmente durante el proceso de producción de AAV; y, además, se ha observado que el adenovirus genera una respuesta inmune en el hospedador en el contexto de aplicaciones de terapia génica (véase, por ejemplo, Byrnes *et al.*, Neuroscience 66: 1015, 1995; McCoy *et al.*, Human Gene Therapy 6: 1553, 1995; y Barr *et al.*, Gene Therapy 2: 151, 1995). Los métodos de la presente invención abordan estas y otras características deseables de preparaciones de vector rAAV, como se describe e ilustra con detalle a continuación.

Están disponibles en otros lugares revisiones generales de virología y genética del AAV. El lector puede remitirse entre otros a Carter, “Handbook of Parvoviruses”, Vol. I, págs. 169-228 (1989) y Berns, “Virology”, págs. 1743-1764, Raven Press, (1990). El AAV es un virus sin capacidad de replicación, lo que significa que depende de un virus auxiliar para completar su ciclo de replicación y empaquetamiento en una célula hospedadora. Los virus auxiliares capaces de apoyar la replicación de AAV se ilustran por adenovirus, pero incluyen otros virus tales como herpes virus y poxvirus. El genoma de AAV comprende generalmente los genes de empaquetamiento *rep* y *cap*, proporcionándose otras funciones necesarias en *trans* por el virus auxiliar y la célula hospedadora.

A modo de ilustración, el genoma lineal del serotipo AAV2 termina en cualquiera de los extremos con una secuencia de repetición terminal invertida (ITR). Entre las ITR hay tres promotores de transcripción p5, p19 y p40 que se usan para expresar los genes *rep* y *cap* (Laughlin *et al.*, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5567-5571). Las secuencias ITR se requieren en *cis* y son suficientes para proporcionar un origen de replicación funcional, integración en el genoma celular y escisión eficaz y recuperación de los cromosomas de la célula hospedadora o plásmidos recombinantes. Los productos génicos *rep* y *cap* proporcionan funciones para la replicación y encapsidación del genoma viral, respectivamente, y para los mismos es suficiente estar presentes en *trans*.

Se han introducido genomas de AAV en plásmidos bacterianos por procedimientos tales como prolongación GC (Samulski *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2077-2081), adición de enlazadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasa de restricción (Laughlin *et al.*, 1983, Gene, 23: 65-73) o por ligación directa de extremos romos (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259: 4661-4666). La transfección de tales plásmidos recombinantes de AAV en células de mamífero con un virus auxiliar apropiado da como resultado la recuperación y escisión del genoma de AAV libre de cualquier secuencia plasmídica, replicación del genoma recuperado y generación de partículas de AAV infecciosas descendientes.

Los vectores AAV recombinantes que comprenden un polinucleótido heterólogo de interés terapéutico se pueden construir sustituyendo partes de la secuencia codificante de AAV en plásmidos bacterianos con el polinucleótido heterólogo. Los principios generales de construcción de vector rAAV también se reseñan en otros lugares. Véase, por ejemplo, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 3: 533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbiol. and Immunol., 158: 97-129). Las ITR de AAV generalmente se conservan, ya que el empaquetamiento del vector

requiere que las mismas estén presentes en *cis*. Sin embargo, se pueden omitir otros elementos del genoma de AAV, en particular, uno o más de los genes de empaquetamiento. El plásmido vector se puede empaquetar en una partícula de AAV suministrando los genes de empaquetamiento omitidos en *trans* por una fuente alternativa. Varias publicaciones describen diversas estrategias para producir vectores rAAV. Ratschin *et al.*, Mol. Cell. Biol. 4: 2072 (1984); Hermonat *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466 (1984); Tratschin *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 3251 (1985); McLaughlin *et al.*, J. Virol., 62: 1963 (1988); Lebkowski *et al.*, 1988 Mol. Cell. Biol., 7: 349 (1988). Samulski *et al.*, J. Virol., 63: 3822-3828 (1989); Flotte *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7: 349 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.173.414; el documento WO 95/13365 (Targeted Genetics Corporation and Johns Hopkins University) y la Patente de Estados Unidos N° 5.658.776 correspondiente (por Flotte *et al.*); el documento WO 95/13392 (Trempe *et al.*); el documento WO 96/17947 (por Targeted Genetics Corporation, J. Allen).

Ya que los títulos altos de preparaciones de vector rAAV son particularmente útiles, pero la producción de títulos altos de rAAV, particularmente en procedimientos a gran escala, puede conducir a la generación de cantidades significativas de virus auxiliar contaminante (por ejemplo, adenovirus o "Ad"), proteínas de virus auxiliar (por ejemplo, proteínas de Ad) y/o proteínas celulares, se hizo especialmente importante diseñar métodos graduables para la producción de rAAV que se puedan usar para la generación de preparaciones de título alto que estén sustancialmente libres de virus contaminante y/o proteínas virales o celulares.

Se han descrito métodos para generar preparaciones de título alto de vectores de AAV recombinante. La Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US98/18600 describe el cultivo de una línea celular que puede producir vector rAAV después de la infección con un virus auxiliar; infectar las células con un virus auxiliar, tal como adenovirus; y lisar las células. Los métodos y sistemas de producción de AAV y otros virus también se describen también, por ejemplo, en el documento WO 97/09441 (PCT/US96/14423); el documento WO 97/08298 (PCT/US96/13872); el documento WO 97/21825 (PCT/US96/20777); el documento WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); el documento WO 99/11764; Perrin *et al.* (1995) Vaccine 13: 1244-1250; Paul *et al.* (1993) Human Gene Therapy 4: 609-615; Clark *et al.* (1996) Gene Therapy 3: 1124-1132.

Los métodos de la técnica anterior usados para producir partículas de AAV recombinante usando células de empaquetamiento requerían una etapa de lisis celular debido a la creencia generalizada de que no se libera AAV de células productoras en ninguna cantidad apreciable sin lisar las células. Véase, por ejemplo, Chirico y Trempe (1998), J. Viral. Methods 76: 31-41 o el documento WO 95/06743. Sin embargo, el lisado celular contiene diversos componentes celulares que se tienen que separar del vector rAAV antes de que sea adecuado para uso *in vivo*.

La presente descripción proporciona métodos para conseguir la producción de título alto de vectores rAAV liberados de una célula productora sin lisar la(s) célula(s) y demuestra que tales técnicas se pueden emplear para producción a gran escala de preparaciones de vector AAV recombinante.

Sumario de la invención

Esta invención proporciona métodos y materiales para generar preparaciones de título alto de virus adeno-asociado (AAV) que están sustancialmente libres de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar y proteínas celulares y otros componentes. Los métodos suponen la liberación de partículas de rAAV de células productoras sin lisar activamente las células como es típico en la técnica, lo que proporciona una ventaja clara y significativa con respecto a métodos de producción que se han descrito previamente. Los métodos también son aplicables a virus que no son líticos y/o generalmente no se liberan (es decir, virus sin gemación).

En particular, la presente invención proporciona un método para generar una población de partículas de virus, que comprende las etapas de:

(a) incubar una célula productora en un medio de cultivo celular en condiciones que comprenden una condición que promueve liberación de partículas de virus, por lo que se liberan partículas de virus de la célula productora al medio de cultivo sin lisar las células, donde la condición que promueve la liberación de partículas de virus:

(i) comprende una o más condiciones seleccionadas de osmolalidad, temperatura, concentración de un ión dado, densidad celular, concentración de oxígeno disuelto, concentración de glucosa, concentración de aminoácidos y una condición que promueve la sincronización del ciclo celular; y

(ii) comprende pH y

(b) recolectar las partículas virales del medio de cultivo celular sin lisar las células, obteniendo de este modo una población de partículas virales;

donde el virus es virus adeno-asociado (AAV).

La invención también proporciona métodos para generar una población de partículas de virus, tales como partículas de virus adeno-asociado (rAAV) recombinante.

que comprende la etapa de a) incubar una célula productora en un medio de cultivo celular en condiciones que promueven la liberación de partículas de AAV de la célula, por lo que se liberan partículas de rAAV de la célula productora al medio de cultivo y donde la célula productora comprende (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido heterólogo no-AAV flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y (iii) un virus auxiliar de AAV o función de virus auxiliar de AAV. Después, las partículas de rAAV liberadas se pueden recoger o recolectar del medio de cultivo. Las condiciones que promueven la liberación de partículas virales de rAAV se describen en este documento e incluyen, pero sin limitación, pH, osmolalidad, oxígeno disuelto, medio enriquecido y temperatura.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen además diversas etapas de purificación y/o inactivación. En algunas de estas realizaciones, el método comprende además las etapas de: someter a cromatografía el sobrenadante de células productoras de AAV en una pluralidad de resinas de intercambio iónico que comprenden al menos una resina de intercambio aniónico cargada positivamente y al menos una resina de intercambio catiónico cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de vector rAAV o someter a cromatografía el sobrenadante de células productoras de AAV en una resina de intercambio aniónico seguido por filtración de flujo tangencial (TFF). También se puede usar cromatografía de sulfato de heparina para purificar adicionalmente el virus.

En los métodos de la invención se puede realizar el cultivo celular de tal modo que las células estén en suspensión o en condiciones que promuevan la adherencia de células a un soporte sólido. En consecuencia, en algunas realizaciones, la célula productora se cultiva en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un matraz de cultivo tisular, un frasco rotativo, un matraz rotativo, un reactor de tanque, un fermentador y un biorreactor, un reactor de producción plano, un sistema de fibra hueca, un reactor de lecho cargado y opcionalmente usando un microsoporte.

En algunas realizaciones de la invención, las preparaciones de vector AAV recombinante producidas por los métodos dan como resultado una población purificada de partículas de vector rAAV que está sustancialmente libre de AAV con capacidad de replicación y de virus auxiliar y proteínas celulares, así como sustancialmente libre de ADN celular.

La presente solicitud describe adicionalmente una población de partículas de rAAV, producidas de acuerdo con cualquiera de los métodos de producción de esta invención. Preferiblemente, la población de partículas contiene no más de aproximadamente una partícula infecciosa de adenovirus por mil partículas infecciosas de rAAV, preferiblemente menos de una por 10^6 rAAV, aún más preferiblemente menos de aproximadamente una en 10^9 , incluso más preferiblemente menos de aproximadamente una en 10^{10} .

Estas y otras realizaciones de la invención se explican en la siguiente descripción.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B son gráficos de barras que ilustran los resultados de dos experimentos separados, expresados como partículas resistentes a ADNasa (DRP) por célula a los diversos niveles de pH. Los cultivos celulares se mantuvieron a los niveles de pH indicados y los lisados celulares se ensayaron el día 2 (barras rellenas) y día 3 (barras sombreadas) post-infección.

Las Figuras 2A y 2B son gráficos de barras e ilustran los resultados, expresados como DRP totales, de producción de rAAV, el día 2 (2A) y día 3 (2B) post-infección, en biorreactores mantenidos a diversos niveles de pH. Los porcentajes sobre cada barra son porcentajes de DRP totales en el lisado celular. La parte rellena de cada barra representa DPR en lisados celulares, mientras que la parte sombreada de cada barra representa las DRP en el medio de cultivo celular. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de DRP totales en el lisado celular.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos de barras que representan el total de unidades de replicación (RU), el día 2 (3A) y día 3 (3B) post-infección, en el medio de cultivo (parte sombreada de cada barra) y lisados celulares (parte rellena de cada barra) cuando los cultivos se mantuvieron a los niveles indicados de pH. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de RU totales en el lisado celular.

La Figura 4 es un gráfico de barras que ilustra la proporción partícula: infectividad (P/I) de partículas de rAAV recolectadas de lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 3 post-infección de biorreactores mantenidos a los niveles indicados de pH.

Las Figuras 5A, 5B y 5C son gráficos de barras que ilustran las DRP totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (5A), día 3 (5B) y día 4 (5C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad de partida indicada. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de DRP totales en el lisado celular.

Las Figuras 6A, 6B y 6C son gráficos de barras que ilustran las RU totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (6A), día 3 (6B) y día 4 (6C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad de partida indicada. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de RU totales en los lisados celulares.

La Figura 7 es un gráfico de barras que ilustra la proporción P/I de partículas de rAAV en el medio de cultivo celular los días 3 y 4 de cultivos de biorreactor con las osmolalidades de partida indicadas.

Las Figuras 8A-C son gráficos de barras que ilustran las DRP totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (8A), día 3 (8B) y día 4 (8C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular se mantuvo a la temperatura indicada. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de DRP totales en el lisado celular.

Las Figuras 9A, 9B y 9C son gráficos de barras que ilustran las RU totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (9A), día 3 (9B) y día 4 (9C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular se mantuvo a la temperatura indicada. Los porcentajes sobre cada barra en la Figura 9A indican el porcentaje de RU totales en el medio de cultivo celular. Los porcentajes sobre cada barra en la Figura 9A indican el porcentaje de RU totales en el lisado celular.

La Figura 10 es un gráfico de barras que ilustra las DRP totales en el medio de cultivo tres días post-infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

La Figura 11 es un gráfico de barras que ilustra las RU en el medio de cultivo tres días post-infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

La Figura 12 es un gráfico de barras que ilustra la proporción P/I de partículas virales en los medios de cultivo celular cuando los cultivos se desarrollaron en los diversos medios indicados.

La Figura 13 proporciona composiciones de aminoácidos y vitaminas para los suplementos de medios descritos en el Ejemplo 6.

Modos de realizar la invención

Se han descubierto métodos para generar preparaciones con título alto de virus adeno-asociado (AAV) que están sustancialmente libres de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar y proteínas celulares y otros componentes. Los métodos generalmente suponen cultivar (que generalmente implica mantener) células productoras en condiciones que promuevan la liberación de partículas de rAAV de las células productoras.

Está bien establecido en el campo de AAV que no se libera AAV de la célula a menos que la célula se lise, sino que permanece en el núcleo de la célula. En consecuencia, la creencia generalizada y universal es que, para producir partículas de rAAV, las células se tienen que lisar. En comparación con las enseñanzas del campo, se ha descubierto que se pueden liberar partículas de rAAV de las células sin lisar las células y adicionalmente que se puede aumentar la liberación de partículas de rAAV manteniendo las células productoras en diversas condiciones ambientales controladas. Usando estas condiciones se pueden producir partículas de rAAV con mayores títulos que los obtenidos previamente. Las células cultivadas en las condiciones descritas en este documento producen más virus por célula y liberan más virus al medio de cultivo e, incluso más significativamente, pueden liberar una población de AAV con mayor infectividad que el AAV que se retiene dentro de la célula. En otras palabras, la proporción de partícula resistente a ADNasa a infectividad puede ser menor en la población de AAV liberada al medio de cultivo en comparación con esta proporción de AAV retenido dentro de la célula (véase, por ejemplo, la Figura 4). Adicionalmente, ya que la lisis no es una etapa obligatoria en los métodos de la presente invención, se pueden recoger las partículas de rAAV del sobrenadante celular, simplificando por tanto las etapas de purificación opcional posteriores. Alternativamente, también se podría realizar la lisis.

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos de liberación, o liberación preferente, de partículas virales infecciosas. Esta liberación preferente de partículas infecciosas es particularmente significativa en el contexto de producción viral, en el que es altamente deseable producir una población que contenga un gran número de partículas infecciosas en comparación con partículas no infecciosas.

Se entiende que los métodos y principios descritos en este documento son aplicables a varios virus diferentes que normalmente se retienen (es decir, no se liberan), particularmente adenovirus. En este documento se ilustra AAV.

A continuación se describen con detalle diversos métodos para la generación y el procesamiento de partículas de AAV en células de mamífero y se proporcionan ilustraciones del uso de tales técnicas en los Ejemplos siguientes. Las partículas de rAAV producidas mediante los métodos de esta invención son particularmente útiles como vectores de transferencia génica. En la técnica se conocen métodos para el uso de tales vectores y no necesitan describirse en este documento.

A modo de introducción, es típico emplear una célula hospedadora o “productora” para la replicación y el empaquetamiento de vector rAAV. Una célula productora de este tipo (habitualmente una célula hospedadora de mamífero) generalmente comprende o está modificada para comprender varios tipos diferentes de componentes para producción de rAAV. El primer componente es un genoma de vector viral adeno-asociado recombinante (rAAV) (o “pro-vector rAAV”) que se puede replicar y empaquetar en partículas de vector mediante la célula de empaquetamiento hospedadora. El pro-vector rAAV normalmente comprenderá un polinucleótido heterólogo (o “transgen”) con el que se desea

alterar genéticamente otra célula en el contexto de terapia génica (ya que el empaquetamiento de un transgen de este tipo en partículas de vector rAAV se puede usar eficazmente para suministrar el transgen a una diversidad de células de mamífero). El transgen preferiblemente está flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV que comprenden secuencias que se reconocen durante la escisión, la replicación y el empaquetamiento del vector de AAV, así como durante la integración del vector en el genoma de una célula hospedadora. Un segundo componente es un virus auxiliar que puede proporcionar funciones auxiliares para la replicación de AAV. Aunque frecuentemente se emplea adenovirus, también se pueden usar otros virus auxiliares como se conoce en la técnica. Alternativamente, las funciones de virus auxiliar requeridas se pueden aislar genéticamente de un virus auxiliar y se pueden usar los genes codificantes para proporcionar funciones de virus auxiliar en *trans*. Los elementos de vector AAV y el virus auxiliar (o funciones de virus auxiliar) se pueden introducir en la célula hospedadora simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Los componentes finales para la producción de AAV que se tienen que proporcionar en la célula productora son “genes de empaquetamiento de AAV”, tales como genes *rep* y *cap* de AAV que proporcionan proteínas de replicación y encapsidación, respectivamente. Se pueden proporcionar varias versiones diferentes de genes de empaquetamiento de AAV (incluyendo casetes *rep-cap* de tipo silvestre así como casetes *rep* y/o *cap* modificados en los que los genes *rep* y/o *cap* se pueden dejar bajo el control de los promotores nativos o unidos de forma funcional a promotores heterólogos). Tales genes de empaquetamiento de AAV se pueden introducir de forma transitoria o de forma estable en la célula de empaquetamiento hospedadora, como se conoce en la técnica y se describe con mayor detalle a continuación.

Siguiendo los métodos de la invención, se liberan partículas de rAAV al medio de cultivo (“sobrenadante”) de células intactas (es decir, no lisadas). Después de cultivar las células hospedadoras en condiciones que permiten la replicación, encapsidación y liberación de AAV, se puede procesar el sobrenadante para generar preparaciones con título alto de virus adeno-asociado (AAV) que están sustancialmente libres de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar, proteínas celulares y, significativamente, de ADN celular. A continuación se proporcionan descripciones detalladas de técnicas de procesamiento y protocolos ilustrativos que emplean tales técnicas.

Definiciones

Un “vector” como se usa en este documento se refiere a una macromolécula o asociación de macromoléculas que comprende o se asocia a un polinucleótido y que se puede usar para mediar el suministro del polinucleótido a una célula. Los vectores ilustrativos incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores virales, liposomas y otros vehículos de suministro génico.

“AAV” es una abreviatura para virus adeno-asociado y se puede usar para referirse al propio virus o a derivados del mismo. El término abarca todos los subtipos y formas tanto de origen natural como recombinantes, excepto cuando se requiera de otra manera. La abreviatura “rAAV” se refiere a virus adeno-asociado recombinante, también denominado vector AAV recombinante (o “vector rAAV”).

Un “vector rAAV” como se usa en este documento se refiere a un vector AAV que comprende una secuencia polinucleotídica sin origen en AAV (es decir, un polinucleótido heterólogo a AAV), típicamente una secuencia de interés para la transformación genética de una célula. En construcciones de vector preferidas de esta invención, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, preferiblemente dos secuencias de repetición terminal invertida de AAV (ITR). La expresión vector de rAAV incluye tanto partículas de vector rAAV como plásmidos de vector rAAV.

Una “partícula de vector rAAV” o “partícula de rAAV” se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de cápside de AAV (preferiblemente por todas las proteínas de cápside de un AAV de tipo silvestre) y un vector rAAV encapsidado. Por tanto, la producción de partícula rAAV incluye necesariamente la producción de vector rAAV, ya que un vector de este tipo está contenido dentro de una partícula de rAAV.

“Empaquetamiento” se refiere a una serie de acontecimientos intracelulares que dan como resultado el ensamblaje y la encapsidación de una partícula de AAV.

Los genes “*rep*” y “*cap*” de AAV se refiere a secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas de replicación y encapsidación de virus adeno-asociado. Éstas se han encontrado en todos los serotipos de AAV examinados y se describen más adelante y en la técnica. A *rep* y *cap* de AAV se les denomina en este documento “genes de empaquetamiento” de AAV.

Un “virus auxiliar” para AAV se refiere a un virus que permite que AAV (por ejemplo, AAV de tipo silvestre) se replique y se empaque por una célula de mamífero. Se conoce una diversidad de tales virus auxiliares para AAV en la técnica, incluyendo adenovirus, herpesvirus y poxvirus tales como vaccinia. Los adenovirus incluyen varios subgrupos diferentes, aunque el Adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el más comúnmente usado. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y están disponibles en depósitos tales como ATCC. Los virus de la familia de herpesvirus incluyen, por ejemplo, virus de herpes simple (HSV) y virus de Epstein-Barr (EBV), así como citomegalovirus (CMV) y virus de pseudorrabia (PRV); que también están disponibles en depósitos tales como ATCC.

“Función(es) de virus auxiliar” se refiere a función(es) codificada(s) en el genoma de un virus auxiliar que permiten la replicación y el empaquetamiento de AAV (junto con otros requerimientos para la replicación y el empaquetamiento descritos en este documento). Como se describe en este documento, la “función de virus auxiliar” se puede proporcionar de varias maneras, incluyendo proporcionando virus auxiliar o proporcionando, por ejemplo, secuencias polinucleotídicas que codifiquen la(s) función(es) requerida(s) a una célula productora en *trans*.

El término “tsHV” se refiere a un virus auxiliar sensible a temperatura, que puede proporcionar funciones auxiliares para la replicación y el empaquetamiento de AAV pero es sensible a temperatura con respecto a su propia replicación (es decir, se puede replicar a una temperatura “permisiva” pero se replica con menor eficacia, o preferiblemente no se replica en absoluto, a una temperatura “no permisiva”). La capacidad del tsHV de proporcionar ayuda para la replicación de AAV también puede ser sensible a temperatura, pero el tsHV preferido para el uso con esta invención apoya eficazmente la replicación de AAV a temperaturas a las que se puede replicar AAV pero que son no permisivas para la replicación del tsHV. A continuación se describen ejemplos de tales tsHV.

Un virus o partícula viral “infeccioso/a” es uno que comprende un componente polinucleótido que es capaz del suministro a una célula para la que la especie viral es trófica. El término no implica necesariamente ninguna capacidad de replicación del virus. Se describen ensayos para contar partículas virales infecciosas en otros lugares en esta descripción y en la técnica. La infectividad viral se puede expresar como la proporción P:I o la proporción de partículas virales totales a partículas virales infecciosas.

Un virus “con capacidad de replicación” (por ejemplo, un AAV con capacidad de replicación) se refiere a un virus fenotípicamente de tipo silvestre que es infeccioso y también es capaz de replicarse en una célula infectada (es decir, en presencia de un virus auxiliar o funciones de virus auxiliar). En el caso de AAV, la capacidad de replicación generalmente requiere la presencia de genes de empaquetamiento de AAV funcionales. Los vectores rAAV preferidos como los descritos en este documento no tienen capacidad de replicación en células de mamífero (especialmente en células humanas) debido a la carencia de uno o más genes de empaquetamiento de AAV. Preferiblemente, tales vectores de rAAV carecen de cualquier secuencia de genes de empaquetamiento de AAV para minimizar la posibilidad que se generen AAV con capacidad de replicación por recombinación entre genes de empaquetamiento de AAV y un vector de rAAV entrante. Las preparaciones de vector rAAV preferidas como las descritas en este documento son las que contienen poco, si es que contienen, AAV con capacidad de replicación (rcAAV) (preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por 10^2 partículas de rAAV, más preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por 10^4 partículas de rAAV, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por 10^8 partículas de rAAV, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por 10^{12} partículas de rAAV, más preferiblemente sin rcAAV).

“Liberación” de partículas de rAAV significa que las partículas de rAAV entran en el medio de cultivo celular de una célula productora intacta, es decir, la partícula de rAAV se libera sin lisis la célula. Se entiende que, en un cultivo de célula productora dado, algunas células se lisan, por ejemplo, después de muerte celular. Sin embargo, esta invención proporciona métodos que promueven la liberación de partícula de rAAV sin realizar lisis celular deliberada, como se hace típicamente en la técnica. Los términos “liberación” y “secreción” de una célula productora se usan de manera intercambiable en este documento.

La expresión “condición que promueve la liberación de partículas de rAAV” de una célula productora, como se usa en este documento, se refiere a una condición para cultivar células productoras que conduce a la liberación aumentada, o mejorada, de partícula de rAAV de la célula productora al medio de cultivo. Las condiciones que promueven la liberación de rAAV de la célula productora al medio de cultivo se describen en este documento y son generalmente, pero no necesariamente, condiciones que mejoran el metabolismo celular. “Promover la liberación” de partículas de rAAV de una célula productora al medio de cultivo significa que la liberación de rAAV de la célula productora aumenta cuando se compara con la liberación de rAAV de una célula productora no cultivada en las condiciones ambientales que mejoran la liberación. El aumento puede ser cualquier aumento detectable, tal como al menos aproximadamente el 1%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 35%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 65%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 100% o dos veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces. Como se conoce bien en la técnica, cuando una población celular se cultiva en una condición de partida de cultivo dada, los subproductos metabólicos de las células cambiarán algunas de las condiciones del cultivo, tales como pH y osmolalidad. En condiciones ambientales que promueven la liberación de partículas de rAAV, se controlan uno o más de estos parámetros según sea necesario, es decir, se controlan a intervalos regulares y se ajustan para mantener el parámetro dentro de un intervalo adecuado (es decir, un intervalo que promueve la liberación). El ajuste y/o control de estas condiciones se describirá con más detalle a continuación.

El término “polinucleótido” se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótido y pueden estar interrumpidos por componen-

tes no nucleotídicos. Si están presentes, las modificaciones de la estructura del nucleótido se pueden realizar antes o después del ensamblaje del polímero. El término polinucleótido, como se usa en este documento, se refiere de manera intercambiable a moléculas bicatenarias o monocatenarias. A menos que se especifique o requiera de otra manera, cualquier realización de la invención descrita en este documento que es un polinucleótido incluye tanto la forma bi-

catenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se conoce o predice que forman la forma bicatenaria.

Un “gen” se refiere a un polinucleótido que contiene al menos una fase de lectura abierta que es capaz de codificar una proteína particular después de transcribirse y traducirse.

“Recombinante”, como se aplica a un polinucleótido significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de donación, restricción o ligación y otros procedimientos que dan como resultado una construcción que es diferente de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen respectivamente copias de la construcción polinucleotídica original y la descendencia de la construcción de virus original.

Un “elemento de control” o “secuencia de control” es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, incluyendo replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso y puede ser de naturaleza potenciadora o inhibidora. Los elementos de control conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras transcripcionales, tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz en ciertas condiciones de unir ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante localizada habitualmente cadena abajo (en dirección 3’) del promotor.

“Unido funcionalmente” u “unido de forma funcional” se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos, en la que los elementos están en una relación que les permite funcionar de la forma esperada. Por ejemplo, un promotor está unido funcionalmente a una región codificante si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Puede haber restos de intervinientes entre el promotor y la región codificante mientras se mantenga esta relación funcional.

Un “vector de expresión” es un vector que comprende una región que codifica un polipéptido de interés y se usa para efectuar la expresión de la proteína en una célula diana pretendida. Un vector de expresión también comprende elementos de control unidos funcionalmente a la región codificante para facilitar la expresión de la proteína en la diana. La combinación de elementos de control y un gen o genes a los que están funcionalmente unidos para la expresión se denomina en ocasiones un “casete de expresión”, de los que se conoce un gran número y están disponibles en la técnica o se pueden construir fácilmente a partir de componentes que están disponibles en la técnica.

“Heterólogo” significa obtenido de una entidad genotípicamente distinta a la del resto de la entidad con la cual se compara. Por ejemplo, un polinucleótido introducido por técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector obtenido de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor retirado de su secuencia codificante nativa y unido funcionalmente a una secuencia codificante a la que no se encuentra unida de forma natural es un promotor heterólogo.

“Alteración genética” se refiere a un proceso en el que se introduce un elemento genético en una célula por un proceso diferente a mitosis o meiosis. El elemento puede ser heterólogo a la célula o puede ser una copia adicional o versión mejorada de un elemento ya presente en la célula. La alteración genética se puede efectuar, por ejemplo, introduciendo por transfección en una célula un plásmido recombinante u otro polinucleótido por cualquier proceso conocido en la técnica, tal como electroporación, precipitación con fosfato de calcio o puesta en contacto con un complejo polinucleótido-liposoma. También se puede efectuar la alteración genética, por ejemplo, por transducción o infección con un virus o vector viral ADN o ARN. Preferiblemente se introduce el elemento genético en un cromosoma o minicromosoma en la célula; pero en esta expresión se incluye cualquier alteración que cambia el fenotipo y/o genotipo de la célula y su descendencia.

Se dice que una célula está alterada, transducida o transformada “de forma estable” con una secuencia genética si la secuencia está disponible para realizar su función durante el cultivo prolongado de la célula *in vitro*. En ejemplos preferidos, una célula de este tipo está alterada “de forma heredable” por que se introduce una alteración genética que también se puede heredar por la descendencia de la célula alterada.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en este documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos también incluyen un polímero de aminoácido que se ha modificado; por ejemplo, formación de enlace de puente disulfuro, glicosilación, lipidación o conjugación con un componente marcador. Cuando se describen en el contexto de terapia génica y composiciones para la misma, los polipéptidos tales como “CFTR”, “p53”, “EIA” y similares, se refieren al respectivo polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado modificado por ingeniería genética del mismo, que conserva la función bioquímica deseada de la proteína intacta. De forma similar, las referencias a los genes de CFTR, p53, EA1 y otros genes de este tipo para el uso en terapia génica (típicamente denominados “transgenes” para suministrarse a una célula receptora) incluyen polinucleótidos que codifican el polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado modificado por ingeniería genética que posea la función bioquímica deseada.

Un plásmido, virus u otra sustancia “aislada” se refiere a una preparación de sustancia desprovista de al menos alguno de los demás componentes que también pueden estar presentes cuando la sustancia o una sustancia similar tienen un origen natural o su forma preparada inicialmente. Por tanto, por ejemplo, se puede preparar una sustancia aislada usando una técnica de purificación para enriquecer la misma a partir de una mezcla de partida. El enriquecimiento se puede medir en una base absoluta, tal como peso por volumen de solución, o se puede medir en relación con una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla de partida. El aumento de los enriquecimientos de las realizaciones de esta invención es cada vez más preferido. Por tanto, por ejemplo, se prefiere un enriquecimiento de 2 veces, se prefiere más un enriquecimiento de 10 veces, se prefiere más un enriquecimiento de 100 veces, se prefiere aún más un enriquecimiento de 1000 veces.

Se dice que una preparación de AAV está “sustancialmente libre” de virus auxiliar si la proporción de partículas infecciosas de AAV a partículas infecciosas de virus auxiliar es al menos aproximadamente $10^2:1$; preferiblemente al menos aproximadamente $10^4:1$, más preferiblemente al menos aproximadamente $10^6:1$, aún más preferiblemente al menos aproximadamente $10^8:1$. Las preparaciones están también preferiblemente libres de cantidades equivalentes de proteínas de virus auxiliar (es decir, proteínas como estarían presentes como resultado de un nivel de este tipo de virus auxiliar si las impurezas de partícula de virus auxiliar que se han señalado anteriormente estuvieran presentes en forma alterada). La contaminación con proteína viral y/o celular generalmente se puede observar como la presencia de bandas de tinción con Coomassie o bandas teñidas con plata en geles SDS (por ejemplo, la aparición de bandas diferentes a las correspondientes a las proteínas de cápside de AAV VP1, VP2 y VP3).

“Eficacia” cuando se usa para describir la producción, la replicación o el empaquetamiento viral se refiere a propiedades útiles del método; en particular, a la velocidad de crecimiento y el número de partículas de virus producidas por célula. La producción de “alta eficacia” indica la producción de al menos 100 partículas virales por célula; preferiblemente al menos aproximadamente 10.000 y más preferiblemente al menos aproximadamente 100.000 partículas por célula, a lo largo del periodo de cultivo especificado. Aún más preferiblemente, la producción de “alta eficacia” incluye estos niveles de producción de partículas por célula así como el máximo número de células que producen partículas, tal como al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 20%, preferiblemente al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos el 75%. El Ejemplo 6 describe condiciones de cultivo (medio “completo”) que dieron como resultado 93.000-123.000 partículas de rAAV por célula productora. En el contexto de la presente invención, la eficacia también se puede considerar en términos de porcentaje, o alcance, de liberación de partículas virales comparada con partículas virales retenidas en la célula. La eficacia también se puede considerar en términos de relación o proporción relativa de partículas virales totales a partículas virales infecciosas (tal como proporción “P/I”). Se conocen en la técnica ensayos para determinar parámetros de eficacia de producción, tales como unidades de replicación y ensayo de centro infeccioso.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, virología, cultivo de células animales y bioquímica que están dentro de la especialidad de la técnica. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual”, Segunda Edición (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); “Current Protocols in Protein Science” (John E. Coligan, *et al.* eds. Wiley and Sons, 1995); y “Protein Purification: Principles and Practices” (Robert K. Scopes, Springer-Verlag, 1994).

Condiciones que promueven la liberación de partículas de rAAV de células productoras

La presente invención proporciona métodos para generar una población de partículas de virus adeno-asociado recombinante (rAAV), que comprenden el paso de: a) incubar una población de células productoras en un medio de cultivo celular en condiciones que promuevan la liberación de partículas de rAAV de las células productoras al medio de cultivo. Después, las partículas de rAAV liberadas se pueden recolectar del medio de cultivo, obteniendo de este modo una población de partículas virales.

Las condiciones que promueven (o mejoran) la liberación de partículas de AAV (incluyendo rAAV) de una célula productora al medio de cultivo incluyen, pero sin limitación, pH del medio de cultivo; osmolalidad del medio de cultivo; temperatura; concentración de un ión dado en el medio de cultivo; densidad celular; concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo; concentración de glucosa en el medio de cultivo; concentración de aminoácidos en el medio de cultivo y condiciones que promueven la sincronización del ciclo celular. El pH del medio de cultivo y cualquiera o más de los demás parámetros se mantiene dentro de un intervalo adecuado (es decir, un intervalo que promueve la liberación) durante el que las células liberan partículas de AAV. Aunque un parámetro (es decir, condición) puede ser suficiente para promover la liberación, se puede mantener una combinación de dos o más parámetros simultáneamente, cada uno dentro de su propio intervalo adecuado. Adicionalmente, un intervalo adecuado para un parámetro puede variar dependiendo de si se usa cualquier parámetro adicional. Si un parámetro se mantiene dentro de un intervalo adecuado durante un periodo de tiempo, se puede mantener un segundo parámetro dentro de un segundo intervalo adecuado durante un periodo de tiempo igual o diferente que el primer parámetro. Alternativamente, se pueden emplear condiciones en serie. Por ejemplo, el control del pH puede realizarse durante una fase del cultivo, seguido de control de temperatura.

Está dentro de la habilidad de un especialista en la técnica variar estos parámetros y determinar si la liberación de rAAV al medio de cultivo está mejorada, en relación a la cantidad de rAAV liberado cuando las células productoras no se mantienen en la(s) condición(es) ambiental(es) dada(s). La liberación mejorada (o aumentada) de partículas de rAAV de una célula productora se puede medir por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, ensayos funcionales tales como un ensayo de centro de replicación y un ensayo de centro infeccioso, ensayos inmunológicos para productos génicos *cap*, tales como ELISA, HPLC y cualquiera de varios métodos de detección de ADN (para detectar la presencia de ADN viral) tal como transferencia por ranuras.

Generalmente se puede supervisar y controlar cualquiera de estas condiciones en el alcance necesario y/o deseado usando métodos convencionales y equipamientos conocidos en la técnica. La condición se mide y se hacen los ajustes para mantener o restituir la condición a su nivel adecuado (es decir, un nivel que promueve la liberación de virus). Se ha observado que el fallo en el mantenimiento de forma apropiada o adecuada de condiciones de cultivo puede dar como resultado el cese de la liberación de partículas de virus, mientras que otras condiciones, tales como osmolalidad, no necesitan mantenerse a un nivel específico, sino que el ajuste de la condición de cultivo inicial con respecto a este parámetro es suficiente. Para condiciones que necesitan ser supervisadas y ajustadas puede usarse, por ejemplo, un biorreactor y/o sistema de perfusión de medio. Se prefieren estos sistemas, porque los mismos permiten un control más cuidadoso de las condiciones de cultivo. Sin embargo, es adecuado cualquier sistema que permita un control y ajuste suficiente de las condiciones de cultivo para permitir la liberación suficiente y/o deseada de partículas de AAV. En este documento se proporcionan otros ejemplos de mecanismos de control para proporcionar las condiciones.

En una realización se cultivan células productoras en condiciones de pH que promueven la liberación de partículas virales. Generalmente, el pH del medio de cultivo se mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5, preferiblemente de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,5, más preferiblemente de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0. Aún más preferiblemente y especialmente si el pH es la única condición usada para promover la liberación, el pH es aproximadamente 8,0. Por ejemplo, un biorreactor permite el control del pH a $\pm 0,05$ y está disponible un control todavía más preciso (tal como $\pm 0,01$) y puede supervisar el pH de cada minuto a 3 minutos o incluso menos. En algunas realizaciones, las células se cultivan en condiciones de pH por lo que se encuentran al menos aproximadamente el 67% de partículas de virus totales en el sobrenadante del cultivo. En otras realizaciones, las células se cultivan en condiciones de pH tales que al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 82%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 95% de partículas de virus se encuentran en el sobrenadante del cultivo. Preferiblemente, la P/I, o proporción de partícula a infectividad, en el sobrenadante del cultivo es menos de aproximadamente 4.000, más preferiblemente menos de aproximadamente 3.000, más preferiblemente menos de aproximadamente 2.000, más preferiblemente menos de aproximadamente 1.700, más preferiblemente menos de aproximadamente 1.500. En algunas realizaciones, las células se cultivan aproximadamente a pH 8 y se recolectan aproximadamente 96 horas después de la infección con virus auxiliar (o introducción o iniciación de función(es) de virus auxiliar). En otras realizaciones, las células se cultivan aproximadamente a pH 8 y se recolectan aproximadamente 72 horas después de la infección con virus auxiliar (o introducción o iniciación de función(es) de virus auxiliar). En otras realizaciones, las células se cultivan aproximadamente a pH 8 y se recolectan aproximadamente 48 horas después de la infección con virus auxiliar (o introducción o iniciación de función(es) de virus auxiliar).

En algunas realizaciones también se usa una condición o condiciones diferentes al pH para promover la liberación de virus. Por ejemplo, en otras realizaciones, se usa la temperatura para promover la liberación de virus. Generalmente, la temperatura del medio de cultivo se mantiene entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 45°C, preferiblemente entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 42°C, más preferiblemente aproximadamente 35°C y aproximadamente 40°C. Aún más preferiblemente, la temperatura es de aproximadamente 37°C a aproximadamente 39°C. Por ejemplo, un biorreactor puede controlar una temperatura a $\pm 0,5^\circ\text{C}$ y puede supervisar de forma tan precisa como aproximadamente cada 30 segundos.

En otras realizaciones se usa la osmolalidad para promover la liberación de virus. Generalmente la osmolaridad del medio de cultivo se inicia y/o mantiene entre aproximadamente 100 mOsM y aproximadamente 650 mOsM, preferiblemente aproximadamente 150 mOsM y aproximadamente 500 mOsM, preferiblemente aproximadamente 200 mOsM y aproximadamente 400 mOsM, aún más preferiblemente aproximadamente 300 mOsM (especialmente si la osmolaridad es la única condición usada para promover la liberación). Osmolalidad, un término bien comprendido en la técnica, se define como el número de moléculas de soluto por kg de agua. Generalmente, compuestos tales como NaCl y otras sales, manitol, glucosa, contribuyen a la osmolalidad. Se puede medir la osmolalidad usando técnicas convencionales en la técnica, tales como disminución del punto de congelación usando, por ejemplo, un osmómetro.

Otras condiciones que se pueden usar en los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, uno cualquiera o más de lo siguiente: factores de crecimiento, tales como insulina, EGF y FGF; concentración de glucosa; concentración de oxígeno disuelto; medio enriquecido (por ejemplo, glucosa adicional y/u otros nutrientes tales como vitaminas y aminoácidos). Las concentraciones de glucosa están generalmente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20 g/l; más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 15 g/l; más preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 g/l. Las concentraciones de oxígeno (típicamente medidas mediante, por ejemplo, electrodo de oxígeno disuelto o analizador de gas en sangre) están generalmente entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 200% con respecto al aire, preferiblemente entre aproximadamente el 20% y aproxi-

madamente el 100% con respecto al aire, preferiblemente aproximadamente el 30% y aproximadamente el 75% con respecto al aire. Generalmente, a mayor densidad celular, más enriquecido el medio. Las condiciones del medio se pueden mantener y/o complementar usando técnicas conocidas en la técnica, tales como perfusión.

Las células productoras se cultivan durante un periodo de tiempo adecuado para promover la liberación de virus al medio. Generalmente, las células se pueden cultivar durante aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, hasta aproximadamente 10 días. Después de aproximadamente 10 días (o antes, dependiendo de las condiciones de cultivo y la célula productora particular usada), el nivel de producción generalmente disminuye significativamente. Generalmente el tiempo de cultivo se mide a partir del punto de producción viral. Por ejemplo, en el caso de AAV, la producción viral generalmente comienza después de suministrar función de virus auxiliar en una célula productora apropiada como se describe en este documento. Generalmente, las células se recolectan de aproximadamente 48 a aproximadamente 100, preferiblemente de aproximadamente 48 a aproximadamente 96, preferiblemente de aproximadamente 72 a aproximadamente 96, preferiblemente de aproximadamente 68 a aproximadamente 72 horas después de la infección con virus auxiliar (o después de que comience la producción viral). En los Ejemplos, los resultados se expresan habitualmente en número de días, por ejemplo, "día 2", "día 3", etc. Estas indicaciones generalmente indican un día adicional medido desde la infección con virus auxiliar. Es decir, un resultado presentado para el "día 3" generalmente indica que el resultado se obtuvo aproximadamente 2 días, o 48 horas, desde el momento de introducción de función(es) de virus auxiliar.

Como se ha descrito anteriormente, se puede usar el pH y una cualquiera o más, en cualquier combinación, de las demás condiciones que promueven la liberación. Por ejemplo, se pueden cultivar las células en una cualquiera o más de las siguientes condiciones: (a) pH a aproximadamente 8,0; (b) temperatura de aproximadamente 39°C; (c) aproximadamente 300 mOsM; (d) medio enriquecido, durante aproximadamente 2 a 3 días. "Medio enriquecido" generalmente significa enriquecido en términos de sales inorgánicas adicionales (tales como Mg^{2+} , Ca^{+2}), vitaminas y/o cofactores de tal modo que el suero se puede reducir o incluso eliminar. En una realización preferida se cultivan células en las siguientes condiciones: (a) aproximadamente 300 mOsM; (b) aproximadamente pH 8,00; (c) aproximadamente 39°C y (d) se recolectan aproximadamente 96 horas después de la infección con virus auxiliar. En una realización preferida se cultivan las células en las siguientes condiciones: (a) aproximadamente pH 8,00; (b) aproximadamente 39°C; y (c) se recolectan aproximadamente 96 horas después de la infección con virus auxiliar. En otra realización se cultivan las células en las siguientes condiciones: (a) aproximadamente 300 mOsM; (b) aproximadamente pH 8,00; (c) aproximadamente 39°C y (d) se recolectan aproximadamente 72 horas después de la infección con virus auxiliar. En otra realización se cultivan las células en las siguientes condiciones: (a) aproximadamente pH 8,00; (b) aproximadamente 39°C y (c) se recolectan aproximadamente 72 horas después de la infección con virus auxiliar. En otra realización se cultivan las células en las siguientes condiciones: (a) aproximadamente 300 mOsM; (b) aproximadamente pH 8,00; (c) aproximadamente 39°C y (d) se recolectan aproximadamente 48 horas después de la infección con virus auxiliar. En otra realización se cultivan las células en las siguientes condiciones: (a) aproximadamente pH 8,00; (b) aproximadamente 39°C y (c) se recolectan aproximadamente 48 horas después de la infección con virus auxiliar.

En algunas realizaciones, el pH se mantiene en aproximadamente 8,0 y el cultivo se desarrolla a una temperatura de aproximadamente 39°C. En algunas realizaciones, el pH se mantiene en aproximadamente 8,0 y la osmolalidad (al menos la osmolalidad inicial) es aproximadamente 300 mOsM. En algunas realizaciones, el pH se mantiene en aproximadamente 8,0, la osmolalidad (al menos la osmolalidad inicial) es aproximadamente 300 mOsM y el cultivo se desarrolla a una temperatura de aproximadamente 39°C.

En algunas realizaciones, las células están sincronizadas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sometiendo las células a condiciones de estrés, particularmente antes de la adición de función(es) de virus auxiliar. La sincronización puede contribuir a la productividad global. Las posibles formas de estrés incluyen, pero sin limitación a, un estrés nutricional, un estrés osmótico, un estrés de pH, un estrés de temperatura, un estrés aeróbico, un estrés mecánico, un estrés de radiación y un estrés tóxico. Un ejemplo no limitante mediante el que se impone estrés nutricional es cultivando las células productoras en un medio que carece de uno o más aminoácidos.

También se entiende que la invención también incluye métodos para tratar células productoras (es decir, células productoras intactas) con un agente o una condición que promueva la liberación de virus, por ejemplo, tratamiento con un agente que permeabiliza una célula, tal como un ionóforo o una toxina (tal como una toxina bacteriana), choque osmótico. Para estas realizaciones, las células productoras de una población de cultivo generalmente conservan su integridad, es decir, no se lisan (aunque, como en cualquier población de cultivo celular, algunas células se pueden lisan). Generalmente se lisan menos de aproximadamente cualquiera de los siguientes porcentajes de células: el 50%, el 45%, el 40%, el 35%, el 30%, el 25%, el 20%, el 15%, el 12%, el 10%, el 8%, el 5%, el 3%, el 2%, el 1%. Alternativamente, generalmente se retiene en las células al menos aproximadamente cualquiera de los siguientes porcentajes de contenidos celulares (es decir, se retiene en la membrana celular): el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98%.

Recolección y Purificación de Partículas Virales Liberadas

Las células productoras se pueden cultivar en suspensión o adheridas a una superficie adecuada. Se conocen métodos de cultivo en suspensión o fijos en la técnica. Después de generar una población de partículas virales liberadas, las partículas virales liberadas pueden recolectarse y/o purificarse para uso posterior. Como se describe con más detalle a

continuación, las partículas de virus en medio de cultivo se separan de células productoras usando métodos conocidos en la técnica, tales como centrifugación o filtración (tal como filtración de flujo tangencial en una membrana de fibra hueca). Preferiblemente se realizan una o más etapas adicionales de purificación después de separar las células productoras del medio de cultivo. Los ejemplos de tales etapas incluyen, pero sin limitación, concentración usando filtros adecuados o cromatografía de intercambio iónico. Diversos métodos de producción y purificación se describen en el documento WO 99/11764 (PCT/US98/18600) (Targeted Genetics Corporation).

En algunas realizaciones, el sobrenadante del cultivo (después de retirar las células) se somete a cromatografía iónica opuesta. En algunas realizaciones, a la cromatografía de intercambio aniónico sigue la cromatografía de intercambio catiónico. En otras realizaciones, a la cromatografía de intercambio catiónico sigue la de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el sobrenadante del cultivo se somete a cromatografía sobre sulfato de heparina, preferiblemente después del tratamiento de cromatografía iónica opuesta, más preferiblemente después del tratamiento del sobrenadante del cultivo con cromatografía de intercambio catiónico seguida por cromatografía de intercambio aniónico. Estas técnicas se describen con más detalle a continuación.

A modo de ilustración, el sobrenadante del cultivo, o una preparación que se ha eluido de una columna de intercambio aniónico o intercambio catiónico y/o concentrada por filtración de flujo tangencial se puede purificar mediante unión a una columna que comprenda sulfato de heparina. Después, el AAV se puede eluir de una columna de este tipo usando un tampón que contiene una sal (por ejemplo, un gradiente lineal de NaCl). Por ejemplo, el AAV obtenido de fracciones combinadas de una columna de cromatografía de intercambio aniónico se puede concentrar y someter a diafiltración en TMEG más NaCl 100 mM usando una membrana de filtración de flujo tangencial de 300 K. Este concentrado se puede inyectar en una columna de un ml de sulfato de heparina (columna de "Hi-Trap Heparin" Pharmacia) y eluir usando un gradiente lineal de NaCl.

Las siguientes secciones describen con mayor detalle componentes del sistema de producción y métodos de la invención.

Célula Productora que Comprende Función de Virus Auxiliar y AAV

En los métodos de la invención se cultivan células productoras que comprenden componentes necesarios para la replicación y encapsidación viral en condiciones adecuadas (es decir, condiciones que promueven la liberación viral). Varios criterios influyen en la selección de células para el uso en la producción de partículas de rAAV como se describe en este documento. Como una cuestión inicial, la célula debe ser permisiva a replicación y empaquetamiento del vector de rAAV cuando se usa el virus auxiliar seleccionado. Sin embargo, ya que la mayoría de células de mamífero se pueden infectar productivamente con AAV y muchas también se pueden infectar con virus auxiliares tales como adenovirus, está claro que una gran diversidad de células de mamífero y líneas celulares satisfacen eficazmente estos criterios. Entre éstas, las células y líneas celulares más preferidas son las que se pueden desarrollar fácilmente en cultivo para facilitar la producción a gran escala de preparaciones de vector de AAV recombinante. De nuevo, sin embargo, muchas de tales células satisfacen eficazmente este criterio. Cuando se desea producción a gran escala, la elección del método de producción también influirá en la selección de la célula hospedadora. Por ejemplo, como se describe con mayor detalle más adelante y en la técnica, algunas técnicas de producción y recipientes o cámaras de cultivo están diseñadas para el cultivo de células adherentes o unidas, mientras otras están diseñadas para el cultivo de células en suspensión. En el último caso, la célula hospedadora estará por tanto preferiblemente adaptada o se podrá adaptar al cultivo en suspensión. Sin embargo, incluso en el caso de células y líneas celulares que están consideradas como adherentes o dependientes de anclaje, es posible (como se describe más adelante) obtener variantes adaptadas a suspensión de una línea precursora dependiente de anclaje seleccionando en serie células con capacidad de crecimiento en suspensión.

Cuando se usa un virus auxiliar sensible a temperatura, la célula tiene que ser capaz de replicar eficazmente el vector de rAAV en condiciones que sean no permisivas para la replicación del virus auxiliar. A modo de ilustración, cuando se usa adenovirus ts149 como un virus auxiliar ts (como se describe más adelante), la célula debe ser capaz de apoyar la replicación y el empaquetamiento de rAAV a temperaturas muy superiores a 32°C, preferiblemente aproximadamente 39,5°C. Las células 293 humanas son un ejemplo de una línea celular que satisface estos criterios, pero muchas otras células y líneas celulares son capaces de replicar rAAV a esta temperatura relativamente elevada.

Finalmente, el virus auxiliar (o la función de virus auxiliar), la secuencia de vector de rAAV y todas las secuencias de AAV requeridas para la replicación y el empaquetamiento tienen que estar presentes en la misma célula. Cuando se proporcionan uno o más genes de empaquetamiento de AAV de forma separada del vector, se proporciona una célula hospedadora que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un polinucleótido heterólogo introducido en dicha célula hospedadora usando un vector o pro-vector de rAAV, donde dicho vector o pro-vector de rAAV comprende dicho polinucleótido heterólogo flanqueado por al menos una ITR de AAV y carece de dicho(s) gen(es) de empaquetamiento de AAV; y (iii) un virus auxiliar o secuencias que codifican las funciones de virus auxiliar requeridas. Sin embargo, se debe señalar que uno o más de estos elementos se pueden combinar en un solo replicón. A modo de ilustración, un virus auxiliar también puede comprender un pro-vector de rAAV o un gen de empaquetamiento de AAV.

ES 2 317 709 T3

El virus auxiliar preferiblemente se introduce en el cultivo celular a un nivel suficiente para infectar la mayoría de las células en cultivo, pero, por el contrario, se puede mantener a un mínimo para limitar la cantidad de virus auxiliar presente en la preparación resultante. Se puede usar una multiplicidad de infección o "MOI" de 1-100, pero típicamente es adecuada una MOI de 5-10.

De forma similar, si el vector de AAV y/o los genes de empaquetamiento se introducen transitoriamente en la célula de empaquetamiento (a diferencia de introducirse de forma estable), se introducen preferiblemente a un nivel suficiente para alterar genéticamente la mayoría de las células en cultivo. Las cantidades requeridas generalmente están en el orden de $10 \mu\text{g}$ por 10^6 células, si se suministra como un plásmido bacteriano; o 10^8 partículas por 10^5 células, si se suministra como una partícula de AAV. La determinación de una cantidad óptima es un ejercicio de titulación de rutina que está dentro de la especialidad de la técnica.

Estos elementos se pueden introducir en la célula, bien simultáneamente, o secuencialmente en cualquier orden. Cuando la célula se altera de forma heredable por cualquiera de los elementos, la célula se puede seleccionar y permitirse su proliferación antes de introducir el siguiente elemento.

En una realización preferida, el virus auxiliar se introduce el último en la célula para recuperar y empaquetar un vector de rAAV residente. La célula generalmente ya estará complementada hasta el grado necesario con genes de empaquetamiento de AAV. Preferiblemente, el vector de rAAV o los genes de empaquetamiento y más preferiblemente ambos se integran de forma estable en la célula. Se entenderá fácilmente que son posibles otras combinaciones. Tales combinaciones se incluyen dentro del alcance de la invención.

Una vez que se proporcionan los elementos requeridos a la célula hospedadora, la célula se cultiva en condiciones que son permisivas para la replicación de AAV, para permitir la replicación, el empaquetamiento y la liberación del vector de rAAV. Los tiempos de cultivo adecuados dependen de varias consideraciones y pueden variar como se ha descrito anteriormente. El tiempo de cultivo se ajusta preferiblemente para corresponderse con niveles máximos de producción y es generalmente de 3-6 días. Preferiblemente se producen al menos 100 partículas virales por célula; más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 por célula, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 10.000 por célula. Preferiblemente, al menos $0,5 \times 10^6$, más preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^6 , aún más preferiblemente al menos aproximadamente 2×10^6 RU/ml de vectores de AAV se producen por 2×10^5 células durante el periodo de cultivo. Opcionalmente se pueden usar métodos de producción a gran escala tales como cultivo en suspensión y filtración de flujo tangencial. Después, las partículas de AAV se recogen y se aíslan de las células usadas para preparar las mismas.

Las preparaciones de partículas de rAAV obtenidas por los métodos de la presente invención comprenden preferiblemente una densidad alta de partículas infecciosas de AAV y están sustancialmente libres de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar y restos celulares y otros contaminantes. Las propiedades deseables incluyen las siguientes:

- Una concentración de al menos 10^7 , preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^9 RU/ml, como se determina en un ensayo de replicación o comparación de hibridación cuantitativa con un patrón conocido.

- No más de 10^3 , preferiblemente no más de aproximadamente 10^2 , más preferiblemente no más de aproximadamente 10^1 partículas infecciosas de virus auxiliar por 10^8 RU de partículas de rAAV.

- Menos del 5%, preferiblemente menos de aproximadamente el 1%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 0,01%, aún más preferiblemente menos de aproximadamente el 0,001% de contaminación por virus auxiliar en una base de proteína (p/p), detectada por análisis densitométrico de geles SDS o por inmunoensayo para proteína específica de virus auxiliar (tal como fibra de hexona y pentona de adenovirus).

- Menos del 5%, preferiblemente menos de aproximadamente el 1%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 0,01%, aún más preferiblemente menos de aproximadamente el 0,001% de contaminación por virus auxiliar o proteína celular (p/p), detectada por análisis densitométrico de geles SDS o por inmunoensayo para virus auxiliar o proteínas específicas celulares.

- Preferiblemente, la preparación está también sustancialmente libre de otros componentes celulares potenciales tales como lípidos celulares, carbohidratos y/o ácidos nucleicos.

Los métodos explicados en esta descripción son adecuados para preparar pequeños lotes experimentales o lotes preparativos de 10-100 litros o más. Para preparaciones de lotes a gran escala también es deseable la siguiente propiedad:

- Un total de al menos 10^{10} , preferiblemente 10^{12} y más preferiblemente 10^{14} RU de partículas de vector de AAV en la preparación.

Opcionalmente se pueden procesar vectores de rAAV adicionalmente para enriquecer para partículas de rAAV, agotar partículas de virus auxiliar o convertir los mismos de otro modo en adecuados para la administración a un sujeto. Las técnicas de purificación pueden incluir centrifugación de gradiente isopícnico y técnicas cromatográficas. La

reducción de actividad infecciosa de virus auxiliar puede incluir inactivación por tratamiento térmico o por tratamiento de pH como se conoce en la técnica. Otros procesos pueden incluir concentración, filtración, diafiltración o mezcla con un tampón adecuado o excipiente farmacéutico. Las preparaciones se pueden dividir en alícuotas de dosis unitaria y multidosis para la distribución, que conservarán las características esenciales del lote, tales como la homogeneidad de contenido antigénico y genético y la proporción relativa de virus auxiliar contaminante.

En las siguientes secciones se proporcionan técnicas ejemplares para generar preparaciones de virus auxiliar y AAV que muestran diversas propiedades deseables como se ha descrito anteriormente.

Se conocen diversos métodos para la determinación del título infeccioso de una preparación viral en la técnica. Un método para la determinación del título es un ensayo de titulación de alto rendimiento, en el que se establece una matriz de pocillos de cultivo que comprenden cada uno una alícuota de células de mamífero y una alícuota de preparación de virus (así como pocillos de control que comprenden, por ejemplo, solamente células, solamente virus y nada). La matriz de pocillos de cultivo puede estar, por ejemplo, en forma de un recipiente de microtitulación. Típicamente se añaden a las células alícuotas (por ejemplo, alícuotas diluidas en serie) de la preparación de virus que se tiene que titular y después las células y los virus se incuban en condiciones que permiten la replicación del virus (típicamente condiciones de cultivo adecuadas para la célula hospedadora de mamífero). Después de la replicación del virus, el ácido nucleico viral generalmente se libera por lisis de las células de mamífero (usando condiciones o agentes que promueven la lisis según sea necesario). El ácido nucleico (incluyendo ácido nucleico viral) en la multiplicidad de lisados se puede transferir y fijar a una membrana en condiciones que unen ácido nucleico (lavando según sea apropiado para retirar proteínas y otros contaminantes). La membrana es preferiblemente una réplica o imagen especular de la matriz de cultivo en la que los pocillos individuales de la matriz original se representan posteriormente mediante “combinaciones” de ácidos nucleicos (del lisado de cada pocillo de cultivo) que están unidos en posiciones correspondientes a la membrana. Después se puede usar la hibridación de la membrana con una sonda específica de virus marcada (o específica de inserto viral) para identificar y cuantificar la cantidad relativa de ácido nucleico específico de virus en cada uno de los puntos de la matriz y, por correspondencia, en cada uno de los pocillos de cultivo original. Las condiciones y los materiales para transferencia, unión, lavado e hibridación de ácido nucleico se pueden adaptar de técnicas de biología molecular de rutina tales como hibridación de “transferencia puntual” (como se describe en la técnica).

Selección y Preparación de Vector de AAV y Genes de Empaquetamiento de AAV

Las células productoras usadas en los métodos de producción descritos en este documento comprenden un vector de rAAV. Un vector de rAAV comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, no AAV) de interés en lugar de todos o una parte de los genes *rep* y/o *cap* de AAV que normalmente forman la mayor parte del genoma de AAV. Sin embargo, como en el genoma de AAV de tipo silvestre, el vector de rAAV está preferiblemente flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV como se ha señalado anteriormente. También se han descrito en la técnica variaciones en las que una construcción de rAAV está flanqueada por sólo una ITR única (típicamente modificada) y pueden emplearse en relación con la presente invención.

Son adecuados los virus adeno-asociados de cualquier serotipo, ya que los diversos serotipos están relacionados funcionalmente y estructuralmente, incluso a nivel genético (véase, por ejemplo, Blacklow, págs. 165-174 de “Parvovirus and Human Disease” J. R. Pattison, ed. (1988); y Rose, Comprehensive Virology 3: 1, 1974). Todos los serotipos de AAV aparentemente muestran propiedades de replicación similares mediadas por genes *rep* homólogos; y todos llevan generalmente tres proteínas de cápside relacionadas tales como las expresadas en AAV2. El grado de relación se sugiere adicionalmente por análisis de heterodúplex que muestra amplia hibridación cruzada entre serotipos a lo largo de la longitud del genoma; y la presencia de segmentos análogos de auto-hibridación en los extremos que corresponden a las ITR. Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada serotipo están bajo un control regulador similar. Entre los diversos serotipos de AAV, el AAV2 es el más comúnmente empleado.

Un vector de rAAV comprende un polinucleótido heterólogo. El polinucleótido es típicamente de interés por una capacidad de proporcionar una función a una célula diana en el contexto de terapia génica, tal como regulación positiva o negativa de la expresión de un cierto fenotipo. Un polinucleótido heterólogo o “transgen” de este tipo generalmente será de una longitud suficiente para proporcionar la función o secuencia codificante deseada. Para la encapsidación en partículas de AAV2, el transgen será preferiblemente menor de aproximadamente 5 kb aunque pueden emplearse otros serotipos y/o modificaciones para permitir que secuencias mayores se empaqueten en las partículas virales de AAV.

Cuando se desea la transcripción del polinucleótido heterólogo en la célula diana pretendida, se puede unir de forma funcional con su propio promotor o un promotor heterólogo, dependiendo, por ejemplo, del nivel y/o especificidad de transcripción deseados dentro de la célula diana, como se conoce en la técnica. Diversos tipos de promotores y potenciadores son adecuados para el uso en este contexto. Los promotores constitutivos proporcionan un nivel continuo de transcripción génica, mientras que los promotores inducibles generalmente muestran baja actividad en ausencia del inductor y se regulan positivamente en presencia del inductor. Los promotores y potenciadores también pueden ser específicos de tejido: es decir, los mismos muestran su actividad sólo en ciertos tipos celulares, presumiblemente debido a elementos reguladores génicos encontrados exclusivamente en esas células.

Los ejemplos ilustrativos de promotores son el promotor tardío SV40 del virus de simio 40, el elemento potenciador/promotor de poliedro de baculovirus, la timidina quinasa del Virus Herpes Simplex (HSV tk), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y diversos promotores retrovirales incluyendo elementos LTR. Los promotores inducibles incluyen promotores inducibles por iones de metales pesados (tales como el promotor del virus de tumor mamario de ratón (mMTV) o diversos promotores de hormonas de crecimiento), promotores inducibles por hormonas esteroideas y los promotores del fago T7 que están activos en presencia de ARN polimerasa de T7. Los ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen diversos promotores de surfactina (para expresión en el pulmón), promotores de miosina (para expresión en el músculo) y promotores de albúmina (para expresión en el hígado). Se conoce una gran diversidad de otros promotores y están generalmente disponibles en la técnica y las secuencias de muchos de tales promotores están disponibles en bases de datos de secuencias tales como la base de datos de GenBank.

Cuando también se desea la traducción en la célula diana pretendida, el polinucleótido heterólogo comprenderá también preferiblemente elementos de control que faciliten la traducción (tales como un sitio de unión a ribosoma o “RBS” y una señal de poliadenilación). En consecuencia, el polinucleótido heterólogo comprenderá generalmente al menos una región codificante unida funcionalmente a un promotor adecuado y también puede comprender, por ejemplo, un potenciador unido funcionalmente, un sitio de unión a ribosoma y una señal de poli-A. El polinucleótido heterólogo puede comprender una región codificante o más de una región codificante bajo el control del mismo o de diferentes promotores. La unidad completa, que contiene una combinación de elementos de control y región codificante, se denomina frecuentemente un casete de expresión.

El polinucleótido heterólogo se integra por técnicas recombinantes en o preferiblemente en lugar de la región codificante genómica de AAV (es decir, en lugar de los genes *rep* y *cap* de AAV) y está flanqueado preferiblemente en cualquiera de sus lados por regiones de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Esto significa que una ITR aparece tanto cadena arriba como cadena abajo de la secuencia codificante, ya sea en yuxtaposición directa, preferiblemente (aunque no necesariamente) sin ninguna secuencia de intervención de origen de AAV para reducir la probabilidad de recombinación que podría regenerar un genoma con capacidad de replicación de AAV. Una única ITR puede ser suficiente para realizar las funciones normalmente asociadas a configuraciones que comprenden dos ITR (documento WO 94/13778), y, por tanto, se pueden emplear construcciones de vector con sólo una ITR junto con los métodos de empaquetamiento y producción de la presente invención.

Los promotores nativos para *rep* son autorreguladores y pueden limitar la cantidad de partículas de AAV producidas. El gen *rep* también puede estar unido funcionalmente a un promotor heterólogo, tanto si se proporciona *rep* como parte de la construcción de vector o de forma separada. Cualquier promotor heterólogo que no esté fuertemente regulado negativamente por la expresión del gen *rep* es adecuado; pero se prefieren promotores inducibles porque la expresión constitutiva del gen *rep* puede tener un impacto negativo en la célula hospedadora. Se conoce una gran diversidad de promotores inducibles en la técnica y se han enumerado ejemplos anteriormente. Una sub-clase preferida de promotores inducibles son los inducidos por el virus auxiliar que se usa para complementar la replicación y el empaquetamiento del vector de rAAV. También se han descrito varios promotores inducibles por virus auxiliar, incluyendo el promotor de gen temprano de adenovirus que es inducible por la proteína E1A de adenovirus; el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor de herpes virus que es inducible por proteínas de herpes virus tales como VP16 o ICP4; así como promotores inducibles de vaccinia y poxvirus.

Se han descrito métodos para identificar y ensayar promotores inducibles por virus auxiliar tales como los promotores obtenidos del gen de la metalotioneína de ratón. Véase el documento WO96/17947 (Targeted Genetics Corporation).

Dada los límites de tamaño de encapsidación relativos de diversos genomas de AAV, la inserción de un polinucleótido heterólogo grande en el genoma requiere la retirada de una parte de la secuencia de AAV. La retirada de uno o más genes de AAV es deseable en cualquier caso, para disminuir la probabilidad de generar AAV con capacidad de replicación (“rcAAV”). En consecuencia, las secuencias codificantes o promotoras para *rep*, *cap* o ambos preferiblemente se retiran, ya que las funciones proporcionadas por estos genes se pueden proporcionar en *trans*.

El vector resultante se denomina “sin capacidad” de estas funciones. Para replicar y empaquetar el vector, las funciones ausentes se complementan con un gen de empaquetamiento, o una pluralidad del mismo, que codifican conjuntamente las funciones necesarias para los diversos productos génicos ausentes de *rep* y/o *cap*. Los genes de empaquetamiento o casetes génicos preferiblemente no están flanqueados por ITR de AAV y preferiblemente no comparten ninguna homología sustancial con el genoma de rAAV para minimizar recombinación homóloga durante la replicación entre la secuencia del vector y los genes de empaquetamiento proporcionados separadamente. El nivel de homología y frecuencia de recombinación correspondiente aumentan con el aumento de longitud de secuencias homólogas y con su nivel de identidad compartida. El nivel de homología que supondrá una preocupación en un sistema dado se puede determinar teóricamente y confirmarse experimentalmente, como se conoce en la técnica. Típicamente, sin embargo, se puede reducir la recombinación sustancialmente o eliminarse si la secuencia solapante es menor de aproximadamente una secuencia de 25 nucleótidos si tiene una identidad de al menos el 80% a lo largo de toda su longitud o menor de aproximadamente una secuencia de 50 nucleótidos si tiene una identidad de al menos el 70% a lo largo de toda su longitud. Por supuesto, se prefieren niveles de homología aún menores ya que los mismos disminuirán adicionalmente la probabilidad de recombinación. Parece que, aún sin ninguna homología solapante, existe alguna frecuencia residual de generación de rcAAV. Se pueden obtener disminuciones aún mayores en la frecuencia

de generación de rcAAV (por ejemplo, por recombinación no homóloga) al “escindir” las funciones de replicación y encapsidación de AAV, como se describe en el documento WO98/27204 (Targeted Genetics Corporation).

La construcción de vector de rAAV y las construcciones de genes de empaquetamiento complementarias se pueden implementar en esta invención de varias formas diferentes. Se pueden usar partículas virales, plásmidos y células hospedadoras transformadas de forma estable en su totalidad para introducir tales construcciones en la célula de empaquetamiento, tanto de forma transitoria como estable.

El vector de AAV y los gen(es) de empaquetamiento complementarios, si existen, se pueden proporcionar en forma de plásmidos bacterianos, partículas de AAV o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, la secuencia de vector de AAV, el gen(es) de empaquetamiento o ambos, se proporcionan en forma de células eucariotas genéticamente alteradas (preferiblemente alteradas de forma heredable o integradas de forma estable). El desarrollo de células hospedadoras alteradas de forma heredable para expresar la secuencia de vector de AAV, los genes de empaquetamiento de AAV o ambos, proporciona una fuente establecida del material que se expresa a un nivel fiable. Por tanto, se puede usar una diversidad de células diferentes genéticamente alteradas en el contexto de esta invención como se describe en la técnica, entre otros, en la Patente de Estados Unidos N° 5.658.776; el documento WO95/13392; el documento WO98/23018; la Patente de Estados Unidos N° 5.656.785; el documento WO98/27204. Otras combinaciones son posibles.

En consecuencia, por ejemplo, los genes *rep* y *cap* pueden estar presentes en plásmidos y/o integrados de forma estable en el genoma de la célula productora.

Introducción de Material Genético en las Células

Como se describe en la técnica y se ilustra tanto en este documento como en las referencias citadas anteriormente, se puede introducir material genético en células productoras usando cualquiera de una diversidad de medios para transformar o transducir tales células tales como transfección con plásmidos bacterianos, infección con vectores virales, electroporación, precipitación con fosfato de calcio e introducción usando cualquiera de una diversidad de composiciones basadas en lípidos (un proceso frecuentemente denominado “lipofección”). Se han descrito en la técnica métodos y composiciones para llevar a cabo estas técnicas y están disponibles ampliamente.

La selección de células productoras alteradas adecuadamente se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica en la técnica. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas usadas para alterar la célula se pueden introducir simultáneamente con o funcionalmente unidas a uno o más marcadores detectables o seleccionables, tales como genes de resistencia a fármacos, como se conoce en la técnica. Se pueden realizar ensayos para la adquisición, localización y/o mantenimiento de un polinucleótido introducido usando técnicas basadas en hibridación de ADN (tales como transferencia de Southern y otros procedimientos conocidos en la técnica). Los ensayos para expresión se pueden llevar a cabo fácilmente por análisis Northern de ARN extraído de las células genéticamente alteradas o por inmunofluorescencia indirecta para el producto génico correspondiente. Se pueden obtener ensayos y confirmación de capacidades y eficacias de empaquetamiento introduciendo los componentes funcionales restantes de AAV y un virus auxiliar en la célula, para ensayar la producción de partículas de AAV. Cuando una célula se altera de forma heredable con una pluralidad de construcciones de polinucleótido, es por lo general más conveniente (aunque no esencial) introducir las mismas en la célula separadamente y validar cada etapa en serie. Las referencias que describen tales técnicas incluyen las citadas en este documento.

Selección y Preparación de Virus Auxiliar

Como se ha descrito anteriormente, el AAV es un parvovirus que carece de auto-replicación y debe depender generalmente de un virus auxiliar para suministrar determinadas funciones de replicación. Se pueden usar diversos virus auxiliares en los métodos de la presente invención.

Se han identificado varios de tales virus auxiliares, incluyendo adenovirus, herpes virus (incluyendo, pero sin limitación, HSV1, citomegalovirus y HHV-6) y pox virus (especialmente vaccinia). Se puede usar cualquiera de tales virus con esta invención.

Frecuentemente, el virus auxiliar será un adenovirus de un tipo y subgrupo que pueda infectar la célula hospedadora pretendida. Comúnmente se usa adenovirus humano de subgrupo C, especialmente serotipos 1, 2, 4, 6 y 7. Se prefiere generalmente el serotipo 5. Las características y los patrones de crecimiento de adenovirus se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Horowitz, “Adenoviridae and their replication”, págs. 771-816 en “Fundamental Virology”, Fields *et al.*, eds.

Aunque no es esencial, en principio es deseable que la cepa de virus auxiliar carezca de capacidad de replicación en el sujeto que finalmente recibirá la terapia génica. Por tanto, cualquier virus auxiliar residual presente en una preparación de rAAV no tendrá capacidad de replicación. Los adenovirus en los que la región E1A o tanto la E1A como la E3 se han retirado no son infecciosos para la mayoría de células humanas. Éstos se pueden replicar en una línea celular permisiva (por ejemplo, la línea celular humana 293) que es capaz de complementar la actividad ausente.

Las regiones de adenovirus que parecen estar asociadas con función auxiliar, así como las regiones que no lo están, se han identificado y descrito en la técnica (véase, por ejemplo, P. Colosi *et al.*, documento WO 97/17458 y las referencias citadas en ese documento).

5

Uso de un Virus Auxiliar Condicionalmente Sensible

Un virus auxiliar “condicionalmente sensible” también se puede emplear para proporcionar actividad de virus auxiliar. Véase el documento WO 99/11764. Una cepa de virus auxiliar de ese tipo debe tener como mínimo la propiedad de ser capaz de apoyar la replicación de AAV en una célula hospedadora en al menos un conjunto de condiciones donde por sí misma no experimenta replicación genómica eficaz. Cuando la actividad de virus auxiliar se suministra en forma de partículas de virus intactas, también es generalmente necesario que el virus sea capaz de replicarse en una célula hospedadora en un segundo conjunto de condiciones. El primer conjunto de condiciones se diferenciará del segundo conjunto de condiciones en una característica fácilmente controlable, tal como la presencia o ausencia de un cofactor requerido (tal como un catión), la presencia o ausencia de un fármaco inhibidor o un cambio en una condición ambiental tal como temperatura. Más oportunamente, la diferencia entre las dos condiciones es temperatura y por tanto, tal virus condicionalmente sensible se denomina un virus auxiliar sensible a temperatura (tsHV).

Un virus auxiliar “sensible a temperatura” o “ts” es uno que es capaz de replicar su material genético en una célula eucariota en un determinado intervalo de temperaturas (el intervalo “permisivo” de temperaturas), típicamente aproximadamente 15°-35°C y preferiblemente aproximadamente 20°-32°C. Sin embargo, a la temperatura “no-permisiva”, aún cuando otras condiciones se mantienen iguales, la tasa de replicación de material genético es sustancialmente menor, al menos 10 veces menor, habitualmente al menos aproximadamente 100 veces menor y preferiblemente al menos aproximadamente 1000 veces menor. Esta temperatura es típicamente aproximadamente 35°-50°C, generalmente aproximadamente 42°C. En un ejemplo típico de tal virus auxiliar ts, el virus es capaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente bajas tales como temperaturas de aproximadamente 20°-32°C, pero es incapaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente altas tales como temperaturas de aproximadamente 37°-42°C. Se entiende que la célula infectada por virus puede aún así mostrar algunos procesos metabólicos atribuibles al virus a la temperatura no-permisiva, incluyendo, pero sin limitación, función auxiliar para producción de AAV.

Se puede producir un virus auxiliar sensible a temperatura en grandes cantidades cultivando células infectadas a una temperatura permisiva. Después puede producirse un vector de AAV cultivando de células que comprenden elementos de vector y el virus auxiliar sensible a temperatura a una temperatura no-permisiva. La preparación de vector estará sustancialmente libre de componentes de virus auxiliar.

Se ha descrito en la técnica un gran número de variantes de adenovirus sensible a temperatura; véase, por ejemplo, las variantes descritas por Ensinger *et al.* (J. Virol. 10: 328, 1972); Williams *et al.* (J. Gen. Virol. 11: 95, 1971); Ishibashi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65: 304, 1970); Lundholm *et al.* (Virology 45: 827, 1971); y Shiroki *et al.*, (Virology 61: 474, 1974). El análisis de complementación indica que tales variantes entran dentro de una pluralidad de grupos diferentes de complementación (Ginsberg *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34: 419, 1974). Esto sugiere que se puede convertir en sensible a temperatura varias etapas en el ciclo replicativo de adenovirus.

Ya que la función auxiliar para replicación de AAV requiere que sólo parte del ciclo de adenovirus esté intacto, el ensayo para función auxiliar de diversos mutantes a la temperatura no-permisiva proporciona un medio para mapear la función auxiliar. Por ejemplo, Ishibashi *et al.* (Virology 45: 317, 1971) describieron que las variantes sensibles a temperatura de adenovirus aviar apoyan la replicación de AAV1 y AAV2. Ito *et al.* publicaron que un mutante sensible a temperatura ts13 de adenovirus humano 7 (Ad7ts13) ayuda a la replicación de AAV a la temperatura no permisiva tan eficazmente como la cepa silvestre. Drake *et al.* (Virology 60: 230, 1974) describieron la complementación de síntesis de antígeno de AAV4 mediante 3 grupos de mutantes sensibles a temperatura de virus herpes simplex tipo 1 (HSV1). Handa *et al.* (J. Gen. Viro. 29: 239, 1975) publicaron actividad auxiliar para producción de virus AAV1 mediante mutantes de adenovirus humano Ad5ts36, Ad5ts125, Ad5ts149, Ad12tsA275, Ad12tsB221 y Ad12tsC295. Ostrove *et al.* (Virology 104: 502, 1980) publicaron que los mutantes sensibles a temperatura Ad5ts125, Ad5ts135, Ad5ts157, Ad5ts116 y Ad5ts142 y el espectro de hospedadores de mutantes hr6 pero no hr3 apoyan la replicación de AAV. Mayor *et al.* (J. Gen. Virol. 35: 545, 1977) publicaron que el Ad31ts13 pero no el Ad31ts94 apoyaba la producción de AAV1 a la temperatura no permisiva.

Straus *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 742, 1976) publicaron que Ad5ts125 apoyaba la replicación de AAV2 en condiciones en las que el adenovirus no se replicaba por sí mismo. Usaron esta propiedad para estudiar los intermedios de ADN formados durante la replicación de AAV. Myers *et al.* (J. Virol. 35: 65, 1980) llevaron a cabo un estudio cuantitativo de función auxiliar y mostraron que Ad5ts149 apoyaba la producción de 20.000 partículas infecciosas de AAV por célula a la temperatura no permisiva, mientras que Ad5ts107 produjo sólo ~100 partículas por célula. Ya que Ad5ts107 tiene una mutación en la región codificante de unión a proteína de ADN de 72 kDa, concluyeron que esta proteína desempeñaba un papel en la expresión de ARN de AAV. Más recientemente, Carter *et al.* (Virology 191: 473, 1992) propusieron que se requiere una proteína de 72 kDa completamente funcional para la expresión post-transcripcional cuantitativa de los genes *rep* y *cap* de AAV.

Se pueden generar variantes sensibles a condición de la cepa seleccionada de virus auxiliar mediante una estrategia apropiada de mutagenización y selección. Por ejemplo, el virus se puede mutagenizar con nitrosoguanidina, ácido nitroso, hidroxilamina o 5-bromo-2-desoxiuridina. Se seleccionan candidatos que se puedan multiplicar en una célula eucariota adecuada en las condiciones permisivas deseadas, pero no en las condiciones no permisivas deseadas. Como ilustración se pueden obtener mutantes sensibles a temperatura de adenovirus que se multiplican, por ejemplo, a 32°C, pero no a 39,5°C. Las proporciones de eficacia de plaqueo a 39,5°C frente a 32°C son preferiblemente menores de 10^{-4} y más preferiblemente menores de 10^{-5} . Se puede encontrar una ilustración adicional de procesos de selección adecuados para adenovirus sensible a temperatura, por ejemplo, en Ensinger *et al.*, J. Virol. 10: 328, 1972; y Williams *et al.*, J. Gen. Virol. 11: 95, 1971. Se puede encontrar una descripción de variantes de adenovirus que no son sensibles a temperatura, sino sensibles a espectro de hospedador, en Harrison *et al.*, Virology 77: 319, 1977. Se pueden preparar mutantes sensibles a temperatura eficaces para el uso en esta invención, por ejemplo, a partir de virus auxiliares alternativos como herpes simplex 1 (HSV1) o herpes simplex 2 (HSV2). Véase, por ejemplo, Schaffer *et al.*, Virology 52: 57, 1973 para HSV1; Esparza *et al.*, Virology 57: 554, 1974 para HSV2. Como se ha indicado en la sección de antecedentes, se ha descrito un gran número de virus auxiliares sensibles a condición y se pueden obtener de los científicos que los desarrollaron o describieron o de un depósito público.

La cepa se debe convertir en sensible a condición en una etapa de su ciclo replicativo de tal modo que la función que está bloqueada en condiciones no-permisivas no sea una que se requiere para la replicación de alta eficacia de AAV. La elección de qué cepa de virus auxiliar usar se puede hacer mediante referencia tanto a la biología conocida del virus auxiliar como a los requerimientos replicativos del AAV.

Un virus auxiliar ejemplar para el uso con esta invención es el adenovirus sensible a temperatura ts149 del serotipo Ad5 (Ad5ts149). En condiciones optimizadas, esta cepa se puede usar para producir rAAV a niveles que alcanzan o superan los soportados por Ad5 de tipo silvestre. El ts149 tiene una única transición de C-G a A-T en la posición 7563 (Roovers *et al.*, Virus Genes 4: 53, 1990). Esto da como resultado un cambio del aminoácido leucina en el resto 411 de la ADN polimerasa a fenilalanina. La ADN polimerasa está contenida dentro de la unidad de transcripción E2 del adenovirus. Sin embargo, otros mutantes ts que se mapean en esta región son menos adecuados. En particular, la unidad de transcripción E2 también comprende la región codificante para la proteína de unión a ADN de 72 kDa (DBP). Una cepa que no produce DBP detectable (Add/802) apoya la replicación de AAV, pero a un nivel que está reducido en un orden de magnitud (Carter *et al.*, Virology 191: 473, 1992). El Adts125, que también comprende un mapeo de mutación para la región codificante de DBP, apoya la replicación de AAV (Straus *et al.*, J. Virol. 17: 140, 1976), aunque los niveles son generalmente mucho menores que con el Ad5 de tipo silvestre (Myers *et al.*, J. Virol. 35: 65, 1980). En consecuencia, los vectores de adenovirus sensibles a temperatura adecuados para el uso en esta invención incluyen aquellos para los que la sensibilidad mapea la región del genoma E2A, preferiblemente la región codificante de ADN polimerasa.

El especialista puede determinar fácilmente qué cepas virales son adecuadas para el uso como virus auxiliar realizando un ensayo de replicación de rAAV usando un panel de cepas candidatas del virus auxiliar en una célula candidata en condiciones que son no-permisivas para la auto-replicación del auxiliar. Para variantes sensibles a temperatura, la selección se realiza a la temperatura no permisiva de acuerdo con las propiedades conocidas de la cepa. Las temperaturas no-permisivas generalmente son más elevadas que las temperaturas permisivas, típicamente aproximadamente 35°-50°C, preferiblemente 38°-45°C, más preferiblemente aproximadamente 39,5°C. Se prefieren las variantes que apoyan la replicación de AAV a un nivel que está dentro de un orden de magnitud del apoyado por el virus de tipo silvestre correspondiente. Al realizar la selección, el especialista debe incorporar las otras enseñanzas de esta descripción. En particular, es insuficiente seleccionar mediante el cultivo en momentos que dan replicación máxima de AAV con virus de tipo silvestre. Debe ajustarse una matriz cinética en la que los virus auxiliares candidatos se usen durante períodos más largos y después se comparen con el virus de tipo silvestre en el momento máximo de recolección.

Una vez que se ha seleccionado una cepa adecuada de virus auxiliar, se puede implementar en esta invención de varias formas diferentes. Se pueden usar partículas virales, plásmidos virales y células hospedadoras transformadas de forma estable en su totalidad.

En una realización, el genoma del virus auxiliar (o como mínimo, las regiones del genoma del virus auxiliar que codifican función auxiliar) se introduce en la célula hospedadora para usarse para la replicación del vector de rAAV en forma de un plásmido de ADN o una pluralidad de plásmidos, que proporcionan funciones complementarias. Se conocen en la técnica procedimientos para manipulación experimental de adenovirus. Véase, por ejemplo, Graham *et al.*, "Manipulation of adenovirus vectors". En: Murray EJ, ed Methods in molecular biology: Gene transfer and expression protocols, vol.7. Clifton, NJ: The Human Press, 1991: 109-128, que proporciona protocolos detallados para propagación, titulación y purificación de adenovirus, cotransfección y recombinación *in vivo*. Los plásmidos de adenovirus están disponibles en el mercado en Microbix Biosystems Inc., Toronto, Canadá.

En otra realización, la célula hospedadora se transfecta de forma estable con genes de adenovirus o se altera genéticamente para proporcionar las funciones requeridas para la replicación de rAAV. Alternativamente, la célula hospedadora se puede alterar genéticamente con sólo una parte del genoma de adenovirus y posteriormente se infecta o transfecta con una partícula de adenovirus o plásmido. Las solicitudes de patente WO 95/27071 y WO 95/34671 describen células hospedadoras alteradas de forma heredable para proporcionar función de adenovirus, que complementa la propiedad replicativa de diversas construcciones anormales de adenovirus.

ES 2 317 709 T3

En otra realización más, la célula hospedadora usada para la replicación de AAV se infecta con un virus auxiliar que tiene capacidad de auto-replicación, pero no en condiciones no-permisivas. Se puede usar cualquier preparación de la cepa requerida que proporcione una MOI suficiente. En conformidad con GMP y otros requisitos reguladores y para facilitar el aumento de escala para propósitos comerciales, las preparaciones de virus auxiliar comprenden preferiblemente una densidad elevada de partículas infecciosas y están sustancialmente libres de restos celulares y otros contaminantes. Las propiedades deseables incluyen las siguientes:

- Una densidad de al menos 10^6 , preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{10} UI/ml, como se determina en un ensayo de DITC₅₀.

- Una proporción de ADN de adenovirus a proteína total o hexona de adenovirus que indique que al menos el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80% de las partículas virales contienen ADN de adenovirus.

- Menos del 20%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de contaminación mediante material no-adenovirus a nivel de proteína o ADN, como se detecta en geles SDS teñidos para proteínas o geles de agarosa de productos de digestión de nucleasa de restricción teñidos con bromuro de etidio.

- Un total de al menos 10^9 , preferiblemente al menos aproximadamente 10^{11} , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{13} UI por lote de producción.

Se puede preparar virus auxiliar en cualquier célula que sea permisiva para replicación viral. Para adenovirus, las células preferidas incluyen células 293 y células HeLa. Tradicionalmente, cuando estas células se han usado para la replicación de adenovirus, se han usado en placas de cultivo. Estos métodos generalmente soportan la replicación de adenovirus sensible a temperatura a niveles que son uno o dos logaritmos menores que para adenovirus de tipo silvestre.

En consecuencia, es preferible emplear técnicas de cultivo que permitan un aumento en la densidad de siembra. Están disponibles variantes de células 293 y de células HeLa que se han adaptado a cultivo en suspensión. Se prefiere HeLa por razones de crecimiento celular, viabilidad y morfología en suspensión. Estas células se pueden cultivar a densidad suficiente (2×10^6 por ml) para compensar la menor tasa de replicación de la cepa sensible a temperatura de adenovirus. Una vez establecidas se infectan las células con el virus y se cultivan a la temperatura permisiva durante un periodo suficiente; generalmente 3-7 días y típicamente aproximadamente 5 días.

La filtración de flujo tangencial es una técnica usada en la técnica para procesar grandes cantidades de células de mamífero con el objetivo de perfundir, concentrar y recolectar las mismas. Véase, por ejemplo, Dorin *et al.*, Biotechnol. Prog. 6: 494, 1990; Maiorella *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 37: 121, 1991. Se recomienda que esta técnica se use con cultivos en suspensión para la preparación de virus auxiliar para el uso en esta invención. Las células HeLa S3 soportan fuerzas de cizalla de $750\text{-}1500\text{ s}^{-1}$, permitiendo la concentración de las células y diafiltración de medio consumido.

Se recolecta el virus del cultivo del medio consumido o por microfluidización de las células. El nivel de virus auxiliar producido en el cultivo es típicamente al menos 10^7 UI/ml y preferiblemente al menos aproximadamente 3×10^7 UI/ml.

El virus auxiliar preparado de acuerdo con la anterior descripción se puede usar directamente para infectar células hospedadoras usadas para la replicación de rAAV. Más habitualmente se aísla y concentra el virus antes del uso. Los métodos actuales para purificar y concentrar virus auxiliar típicamente implican gradientes isopícnicos de CsCl. Este método requiere tiempo y trabajo, requiere numerosas etapas de procesamiento abierto y es difícil de aumentar de escala. En lugar de ello se recomienda la purificación por cromatografía. Se remite el lector generalmente a Prior *et al.*, Pharmaceut. Technol. 19: 30, 1995; y Huyghe *et al.*, Human Gene Therapy 6: 1403, 1995. La cromatografía de intercambio aniónico se prefiere particularmente para el aislamiento de cepas sensibles a temperatura de adenovirus, especialmente en una resina de polietilenimina usando un gradiente continuo de NaCl a pH 7,4.

Técnicas Preferidas de Producción y Purificación de AAV para el uso en la Presente Invención

Como con el virus auxiliar, con propósitos de ilustración es conveniente dividir la discusión de la producción y purificación de AAV en etapas “aguas arriba” y “aguas abajo” del proceso; refiriéndose el proceso “aguas arriba” generalmente a la producción de AAV en células hospedadoras adecuadas y liberación del virus de las células para producir una preparación “sin procesar” de AAV. El procesamiento “aguas abajo” se puede emplear para purificar la preparación de AAV (por ejemplo, para aislar AAV de proteínas celulares y/u otros contaminantes).

En aspectos preferidos de la presente invención, los procesamientos aguas arriba y aguas abajo de AAV se realizan de una manera diseñada para reducir y/o eliminar sustancialmente proteínas celulares contaminantes, así como cualquier virus auxiliar contaminante (por ejemplo, Ad) o proteínas de virus auxiliar, cualquiera de los cuales podría contribuir a la provocación de una respuesta inmune si están presentes en niveles considerables en la preparación final de vector de rAAV que se tiene que usar para transferencia génica.

Las siguientes secciones describen, con propósitos de ilustración, técnicas que se pueden emplear para la producción de AAV.

5 (i) *Procesamiento Aguas arriba de AAV*

Se puede producir vector de AAV a partir de una línea celular de mamífero que contiene los genes de empaquetamiento de AAV necesarios (por ejemplo, un gen *rep* y *cap* de AAV); un pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido heterólogo no-AAV flanqueado por al menos una repetición terminal invertida de AAV (ITR) y un virus auxiliar para AAV (por ejemplo, un adenovirus). Estos componentes se pueden introducir en la célula en una diversidad de configuraciones. Ya que el AAV se puede replicar y empaquetar en cualquiera de una diversidad de células de mamífero, existe un gran número de líneas celulares que se pueden modificar y emplear para la producción de AAV.

A modo de ilustración se puede producir vector de AAV a partir de una línea celular, tal como “C12” (como se describe por K. R. Clark *et al.*, Gene Therapy, 3: 1124-1132, 1996) o la línea “C137.5” (descrita en una solicitud en trámite junto con la presente del mismo solicitante por Targeted Genetics Corporation, J. Allen *et al.*, documento WO 96/17947), que se ha modificado por ingeniería para contener una construcción *rep* y/o *cap*, así como una construcción de vector. Opcionalmente, se puede introducir por transfección en una línea celular tal como C12 o c137 que contiene una construcción *rep* y/o *cap* un plásmido que contiene una construcción de vector, tal como pAAV-CF. O se puede introducir por transfección en una célula un plásmido que contiene *rep* y *cap*, tal como pRS5, así como un plásmido que contiene una construcción de vector. La célula se puede infectar con Adenovirus o transfectar con ADN que contiene genes de adenovirus.

Se puede generar una diversidad de tales células “productoras” de AAV, como se describe en las referencias citadas en este documento y en la técnica.

Las células productoras de AAV se pueden cultivar en condiciones (incluyendo medio, temperatura y similares) que son generalmente adecuadas para el cultivo de células de mamífero, que también son generalmente permisivas para la replicación de AAV. Por ejemplo, el medio de suspensión DMEM/F12 se prefiere para el cultivo de células y el medio DMEM solo se prefiere para la producción de vector de AAV. Como se conoce en la técnica, algunos tipos celulares y líneas celulares tienden a ser dependientes de unión, mientras otros son capaces de desarrollarse en suspensión; y muchas células dependientes de unión también pueden “adaptarse” al cultivo en suspensión ciclando las células en condiciones de suspensión como un medio de enriquecimiento y finalmente seleccionando las variantes que son capaces de cultivo en suspensión. En consecuencia, el cultivo de células para producción de AAV se puede llevar a cabo en cualquiera de una diversidad de recipientes, dependiendo en parte de si la línea celular productora seleccionada es relativamente dependiente de unión o está adaptada a suspensión. Tales recipientes para el cultivo de células dependientes de unión incluyen, por ejemplo, matraces de cultivo tisular, frascos rotativos, microsoportes y biorreactores (tales como biorreactores de fibra hueca, de lecho cargado o de lecho fluidizado). Los recipientes para líneas celulares de mamífero adaptadas a suspensión incluyen, por ejemplo, matraces rotativos, reactores de tanque y fermentadores de elevación de aire.

La replicación de AAV se desarrolla durante un periodo de tiempo así como hasta un punto en el ciclo de crecimiento en el que la producción viral es óptima, preferiblemente fase logarítmica de crecimiento de medio a tardío (típicamente de uno a tres días), tiempo después del cual las partículas de virus se recolectan del sobrenadante de cultivo.

La filtración de flujo tangencial (TFF) se puede emplear beneficiosamente para el procesamiento y la recolección de grandes volúmenes de células. La TFF se puede usar para perfundir, concentrar y recoger células animales. Por ejemplo, la TFF se puede usar para procesar células en condiciones de flujo laminar a velocidades medias de cizalla de pared hasta 3000 por segundo (véase, por ejemplo, Maiorella, B., *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 37: 121-126, 1991). La concentración a gran escala de virus usando ultrafiltración TFF se ha descrito por R. Paul *et al.* Human Gene Therapy, 4: 609-615, 1993.

A continuación se describen etapas ilustrativas de producción que emplean tales técnicas.

(ii) *Procesamiento Aguas abajo de AAV*

Como se ha descrito previamente, sería particularmente ventajoso obtener preparaciones de AAV que estén sustancialmente libres de partículas de virus auxiliar (tales como partículas de Ad). Adicionalmente, las preparaciones de vector de AAV estarán también preferiblemente sustancialmente libres de virus auxiliar y proteínas celulares (que también pueden ser inmunogénicas). Sin embargo, existe un conjunto adicional de restricciones que influye en la idoneidad de técnicas para producción de AAV. Concretamente, para ser particularmente útiles para la producción de AAV para terapia génica, lo más deseable para las técnicas es que sean “graduables”, es decir, aplicables junto con dispositivos y procedimientos de fabricación a gran escala. Este último conjunto de restricciones reduce o elimina eficazmente la utilidad de técnicas convencionales disponibles tales como separación con cloruro de cesio (que no es adecuada para procedimientos de preparación a gran escala).

Preferiblemente, las partículas de rAAV se purifican además por procedimientos cromatográficos de intercambio iónico que contrastan con diversos procedimientos mencionados en la técnica para la purificación potencial de, por ejemplo, AAV o Ad. En particular, tales procedimientos como se describen en la técnica típicamente emplean un solo tipo de separación iónica, en ocasiones en combinación con otras clases de procedimientos cromatográficos (véase, por ejemplo, K. Tamayose *et al.*, Human Gene Therapy 7: 507-513 (1996) y el documento WO 96/27677, 12 de sept. de 1996). Sin embargo, en el caso de producción de AAV, es particularmente eficaz una combinación de cromatografía de intercambio iónico *opuesta* secuencial para la generación de preparaciones de AAV que están sustancialmente libres de partículas y proteínas de virus auxiliar, así como proteínas celulares. Una combinación de ambos intercambios iónicos opuestos es particularmente eficaz para eliminar todos los diversos contaminantes de partículas y proteínas que típicamente se producen en la generación de preparaciones de vector de AAV.

Se puede emplear cualquiera de una diversidad de resinas de intercambio catiónico y aniónico junto con estos procedimientos, cuyas propiedades fundamentales son la disponibilidad de grupos cargados negativamente y positivamente, respectivamente, a los que se puede unir AAV al menos en cierto grado (más preferiblemente en un grado que difiere sustancialmente de la afinidad de unión relativa de uno o más de los contaminantes que se han mencionado anteriormente, es decir, partículas y proteínas de Ad, así como proteínas celulares de mamífero). Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que la etapa de intercambio aniónico es particularmente eficaz para separar AAV de adenovirus; mientras que se cree ambas etapas (pero especialmente la etapa de intercambio catiónico) son particularmente eficaces para separar AAV de proteínas celulares. También se ha empleado intercambio aniónico seguido de filtración de flujo tangencial, como se describe e ilustra a continuación. Como se describe más adelante adicionalmente, se ha encontrado que las preparaciones de AAV se pueden concentrar en gran medida mediante cromatografía en sulfato de heparina.

A modo de ilustración se puede cargar un lisado aclarado de AAV como se ha descrito anteriormente en una columna de intercambio aniónico cargada positivamente, tal como una resina amino o imino cargada con N (por ejemplo, POROS 50 PI o cualquier DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria, o resina basada en PEI) o una columna de intercambio catiónico cargada negativamente (tal como HS, SP, CM o cualquier resina catiónica basada en sulfo, fosfo o carboxi). La columna se puede lavar con un tampón (tal como tampón de cromatografía A/TMEG). Se puede eluir la columna con un gradiente de concentración creciente de NaCl y las fracciones se pueden recoger y ensayar para la presencia de AAV y/o contaminantes.

Se pueden usar otros procedimientos en lugar de o, preferiblemente, adicionalmente a los procedimientos de intercambio aniónico y catiónico que se han descrito anteriormente, basados en asociaciones intermoleculares mediadas por rasgos distintos a la carga como se conoce en la técnica. Tales procedimientos diferentes incluyen asociaciones intermoleculares basadas en pares de ligando-receptor (tales como interacciones anticuerpo-antígeno o lectina-carbohidrato), así como separaciones basadas en otros atributos de las moléculas, tales como cromatografía de tamizado molecular basada en tamaño y/o forma. Para poner sólo un ejemplo, se puede cargar la preparación filtrada o parcialmente purificada de AAV en una columna que contenga un anticuerpo específico para AAV. Esta columna puede unir el AAV. Se puede aclarar la columna con tampón para retirar proteínas contaminantes y luego eluirse con un gradiente o etapa de concentración creciente de NaCl y las fracciones se pueden recoger. Alternativamente, una columna de este tipo se puede eluir con un tampón de pH diferente al del tampón de carga.

Se pueden identificar los picos de AAV y adenovirus en las fracciones mediante ensayos de infectividad o mediante hibridación de ácido nucleico o inmunoensayos. Los picos se pueden combinar y la combinación se puede diluir o dializar o diafiltrar con un tampón (por ejemplo, TMEG o equivalente) para reducir la concentración de sal.

Esta combinación se puede inyectar en una columna de intercambio aniónico cargada positivamente y/o una columna de intercambio catiónico cargada negativamente (tales como las que se han mencionado anteriormente). Se puede lavar la columna con un tampón (tal como tampón de cromatografía A/TMEG). La columna se puede eluir con un gradiente de concentración creciente de NaCl y las fracciones se pueden recoger. Se pueden identificar los picos de AAV y adenovirus en las fracciones mediante un ensayo de infectividad o mediante hibridación de ácido nucleico o inmunoensayos. Los picos se pueden combinar basándose en los resultados de cualquiera de estos ensayos.

La combinación de fracciones que contienen AAV eluidas de una columna de intercambio aniónico como se ha descrito anteriormente se puede concentrar y purificar mediante filtración de flujo tangencial (TFF), por ejemplo, en un Ultrasette de Filtron o unidad Pellicon de Millipore. Una membrana de límite de peso molecular adecuado (tal como un límite de 100.000 o 300.000) está compuesta típicamente por un polímero tal como celulosa regenerada o polietersulfona. La preparación se filtra a través de la membrana y el producto se retiene. El material retenido se puede diafiltrar usando la membrana con lavados sucesivos de un tampón adecuado tal como Solución Salina Equilibrada de Ringer + glicerol al 5%. La muestra final está altamente enriquecida para el producto y se puede filtrar a esterilidad a través de un filtro de 0,2 μ y almacenar para el uso.

En la purificación y concentración de AAV con filtración de flujo tangencial de material después de la columna de intercambio aniónico, la membrana de límite de peso molecular 300.000 ha dado como resultado rendimientos mayores de unidades replicativas que la membrana de límite de peso molecular 100.000.

Una etapa adicional que se puede emplear para la retirada de adenovirus, si se desea, implica tratar la combinación de eluido con una etapa de inactivación térmica (como se describe en este documento) y después filtración (por

ejemplo, antes de someter la preparación a TFF). Sin embargo, se ha encontrado que el procedimiento “intercambio aniónico a TFF” que se ha descrito anteriormente dio como resultado una preparación de AAV que estaba libre de adenovirus detectable y dio como resultado mejores rendimientos de AAV purificado.

A continuación se describen etapas ilustrativas de producción que emplean tales técnicas.

La anterior descripción proporciona, entre otros, métodos para generar preparaciones con título alto de vectores de AAV recombinante que están sustancialmente libres de virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus) y proteínas celulares.

Los ejemplos presentados a continuación se proporcionan como una guía adicional para el especialista en la técnica y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos Generales

Cuantificación de títulos de rAAV en preparaciones de vector: ensayo de transferencia por ranuras

El ensayo de transferencia por ranuras de ADN de rAAV se llevó a cabo de la siguiente manera. Se digirieron alícuotas de muestras con nucleasa para retirar el ADN desencapsidado. Después las muestras se desnaturalizaron en NaOH 0,4 M, EDTA 10 mM con 1,0 µg/ml de ADN de esperma de salmón a 65°C. Se diluyeron y filtraron muestras y patrones de rAAV en membranas de nailon usando un colector de transferencia por ranuras y se lavaron con NaOH 0,4 M. El filtro se hibridó con un fragmento de restricción de ADNc de CFTR humano marcado con ³²P. Esta sonda detecta un fragmento de aproximadamente 1,5 kb del vector de AAVCF (correspondiente al fragmento de EcoRI de 1,488 kb predicho).

Ensayo de infectividad de microtitulación para medir rAAV

El ensayo de infectividad de microtitulación se llevó a cabo como se ha descrito previamente. Atkinson *et al.* (1988) *Nucleic Acids Research* 26(11): 2821-2823. En resumen, se llevó a cabo un ensayo de infectividad de microtitulación de alto rendimiento para medir virus infeccioso de la siguiente manera. Se inocularon alícuotas (10 µl) de sobrenadantes libres de células diluidos en serie en células HeLa clon 37 cultivadas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de tres días, las células infectadas se trataron y lisaron con una solución de desnaturalización (adición de 1/10^a de volumen de NaOH 4,0 M, 10 µl/ml de ADN de esperma de salmón y EDTA 100 mM). El lisado se transfirió a una placa Silent Monitor BiodyneB (Pall) y filtró al vacío a la membrana de nylon. La membrana se lavó, desnaturalizó, hibridó con un fragmento de restricción de ADNc de CFTR humano marcado con ³²P. Esta sonda detecta un fragmento de aproximadamente 1,5 kb del vector de AAVCF (correspondiente al fragmento de EcoRI de 1,488 kb predicho). Se cuantificó la replicación de vector en relación con una banda de CFTR genómica endógena y se expresa como unidades de replicación. Una unidad de replicación (RU) se define como una intensidad de señal equivalente a la de la banda de CFTR genómica endógena que es aproximadamente 1,8 kb. Se usó regresión lineal de patrones de vector conocido diluido en serie para extrapolar y calcular la concentración de vector en muestras.

Medio de producción

Las Tablas 1 y 2 proporcionan concentraciones de componentes (en mg/l) de medio adecuado para cultivar células y producir rAAV (espacios en blanco indican concentración nula). Generalmente, es preferible tener niveles reducidos de suero. Por ejemplo, el medio usado en estos experimentos contenía aproximadamente suero fetal bovino (FBS) al 1%.

ES 2 317 709 T3

TABLA 1

	<u>Concentración</u>
SALES INORGÁNICAS	
CaCl ₂ anhidro	200
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0,1
KCL	400
MgSO ₄ •7H ₂ O	200
NaCl	4675
NaHCO ₃	1200
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	125
OTROS COMPONENTES	
Glucosa	8500
HEPES	3575
Rojo Fenol, Sal de Na	
piruvato de sodio	110
pantotenato de calcio	6
cloruro de colina	6
ácido fólico	6
inositol	11
nicotinamida	6
piridoxal HCl	2
piridoxina HCl	4
riboflavina	0,6
tiamina HCl	6
F-68	500
AMINOÁCIDOS	
L-Alanina	8,9
L-Arginina• HCl	236,9

ES 2 317 709 T3

	<u>Concentración</u>
L-Asparagina•H ₂ O	17
Ácido L-aspártico	13,3
L-Cistina	72
Ácido L-glutámico	14,7
L-Glutamina	1168
Glicina	37,5
L-Histidina•HCl•H ₂ O	84
L-Isoleucina	157,3
L-Leucina	157,2
L-Lisina•HCl	218,7
L-Metionina	45,1
L-Fenilalanina	99
L-Prolina	11,5
L-Serina	52,5
L-Treonina	142,8
L-Triptófano	26,2
L-Tirosina	108
L-Valina	140,4

TABLA 2

Componente	Concentración, mg/l
CaCl ₂	200
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0,1
KCl	400
MgSO ₄ •7H ₂ O	200
NaCl	4675
NaHCO ₃	1200
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	125
glucosa	4500
HEPES	3575
piruvato de sodio	110
pantotenato de calcio	4
cloruro de colina	4
ácido fólico	4

ES 2 317 709 T3

	Componente	Concentración, mg/l
5	inositol	7
	nicotinamida	4
	piridoxal HCl	
10	piridoxina HCl	4
	riboflavina	0,4
	tiamina HCl	4
15	F-68	500
	L-Alanina	
	L-Arginina• HCl	84
20	L-Asparagina	
	Ácido L-aspártico	
	L-Cisteína	48
25	L-Glutámico	
	L-Glutamina	876
	Glicina	30
30	L-Histidina-HCl.H ₂ O	42
	L-Isoleucina	104,8
	L-Leucina	104,8
35	L-Lisina HCl	146,2
	L-Metionina	30
40	L-Fenilalanina	66
	L-Prolina	
	L-Serina	42
45	L-Treonina	95,2
	L-Triptófano	16
	L-Tirosina	72
50	L-Valina	93,6

Ejemplo 2

55 *Efecto de pH en la producción de partículas de vector de rAAV en lisados de células productoras*

Se inocularon células JL14 a aproximadamente 3×10^5 células/ml en un biorreactor de 3 litros y se cultivaron en 1,5 litros del medio de rAAV mostrado en la Tabla 2. Dos días después de inocular el medio de cultivo en el biorreactor con células JL14, el biorreactor se perfundió con medio fresco, empezando con 0,4 volúmenes por día, doblando después esta cantidad cada 24 horas a partir de entonces. Después de 5 días o cuando la densidad celular alcanzó 6×10^6 células/ml, se retiraron 3×10^8 células y se cultivaron en condiciones convencionales, es decir, permitiendo que el pH variara. Las células restantes en el Biorreactor se concentraron en un volumen de 750 ml de medio de cultivo y se realizó un intercambio de medio de tres volúmenes con medio de producción (es decir, medio como en la Tabla 2) a pH 7,2 para intercambiar el medio, para que el volumen final de cultivo celular fuera de 750 - ml. Se cultivó adenovirus tipo 5 de una solución madre obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo(Manassas, VA). El adenovirus se diluyó en 750 ml de medio de producción y se añadió a las células (multiplicidad de infección (MOI) = 10), llevando el volumen final a 1,5 litros. Se permitió que la infección con adenovirus procediera durante una hora a 37°C.

Después de permitir el desarrollo de la infección, se transfirieron 1×10^5 células a cada uno de 5 matraces rotativos separados. El volumen en los 5 matraces se llevó a 1,5 litros con medio de producción a pH 6,6, 7,0, 7,2, 7,4 y 7,8, respectivamente. Los contenidos de los matraces rotativos se transfirieron a biorreactores separados, los cuales se mantuvieron después individualmente a pH 6,6, 7,0, 7,2, 7,4 y 7,8. Otros parámetros del medio de cultivo fueron los siguientes: temperatura = 37°C; concentración de oxígeno disuelto (DO_2) = 30% y agitación = 150 rpm.

La temperatura, pH, DO_2 , densidad celular, osmolaridad y glucosa/lactato se supervisaron diariamente. Se recolectaron muestras celulares el día 2 y día 3 post-infección y se lisaron. Los lisados celulares se ensayaron mediante ensayo de transferencia por ranuras de partículas resistentes a ADNasa (DRP) y mediante el ensayo de infectividad de microtitulación.

Las Figuras 1A y 1B son gráficos de barras que representan los resultados de dos experimentos separados, expresados como DRP por célula a diversos niveles de pH. Las barras rellenas representan DRP/célula el día 2 post-infección; las barras sombreadas representan las DRP/célula el día 3. Las DRP/célula en los cultivos mantenidos a pH 7,2, pH 7,4 y pH 7,8 disminuyeron espectacularmente del día 2 al día 3 post-infección, mientras que esta reducción no fue tan pronunciada en el cultivo celular de control. La densidad celular total no cambió de forma apreciable en estas condiciones de cultivo.

Ejemplo 3

Efecto del pH en la liberación de partículas de vector de rAAV en el medio de cultivo celular

En resumen, se cultivaron células productoras de AAV en biorreactores. Después las células se infectaron con Ad5 a $MOI = 10$ y se inocularon en un medio bajo en suero (véase Tabla 2) en suspensión en biorreactores de 1,5 litros. Los cultivos se mantuvieron a diversos niveles elevados de pH (de 7,2 a 8,0). Después los cultivos se supervisaron diariamente para número de células, viabilidad, consumo de glucosa, producción de lactato, pH, osmolaridad y producción de AAV. Como se muestra a continuación, hubo un aumento en la producción de AAV cuando el pH se elevó a 7,4; asociado a un aumento aún más espectacular del número de partículas de AAV liberadas al sobrenadante (que aumentó cuando se aumentó el pH):

pH de Cultivo	Partículas asociadas a células	Partículas en Sobrenadante	Total de Partículas	%Asociado a células	% en Sobrenadante
7,2	4,70E+12	1,90E+09	4,70E+12	100%	0%
7,4	6,50E+12	1,30E+13	1,95E+13	33%	67%
7,6	3,40E+12	1,50E+13	1,84E+13	18%	82%
8,0	1,30E+12	1,50E+13	1,63E+13	8%	92%

En resumen, a medida que se elevó el pH, se observó un aumento marcado en el número de partículas de AAV liberadas al sobrenadante y un desplazamiento en el porcentaje de partículas de sobrenadante: asociadas a células (de prácticamente todas asociadas a células a pH 7,2 a la mayoría en el sobrenadante (92%) a pH 8,0).

Para investigar adicionalmente los efectos de pH en la producción de vector de rAAV, se cultivaron células JL14 en un biorreactor de perfusión como se ha descrito anteriormente (usando el medio descrito en la Tabla 1) a una densidad de 10^7 células/ml. El cultivo celular se concentró a un volumen de 750 ml y el medio se intercambió realizando de 3 diavolumenes. El volumen total se llevó a 1,5 litros conteniendo el medio de producción adenovirus a una MOI de 10. Se permitió el desarrollo de la infección durante una hora.

Después de permitir el desarrollo de la infección, se transfirieron 1×10^5 células a cada uno de 5 matraces rotativos separados. El volumen en los cinco matraces se llevó hasta 1,5 litros con medio de producción a pH 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 y 8,0 y matraces de control (pH no mantenido al nivel de partida). Los contenidos de los matraces rotativos se transfirieron a biorreactores separados, los cuales después se mantuvieron individualmente a pH 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 y 8,0. Los biorreactores mantuvieron el pH al nivel establecido $\pm 0,05$ unidades de pH. Otros parámetros del medio de cultivo fueron los siguientes: temperatura = 37°C; concentración de oxígeno disuelto (DO_2) = 30%; y agitación = 150 rpm. Las células y el sobrenadante de cultivo se recolectaron los días 2 y 3.

Los resultados se muestran en las Figuras 2A y 2B. Las Figuras 2A y 2B son gráficos de barras y representan los resultados, expresados como DRP totales, de producción de rAAV en biorreactores mantenidos a diversos niveles de pH. Los porcentajes sobre cada barra son porcentajes de DRP totales en el lisado celular. La parte rellena de cada barra

ES 2 317 709 T3

representa las DRP en lisados celulares, mientras que la parte sombreada de cada barra representa las DRP en el medio de cultivo. El día 2 post-infección, el 29% de las DRP totales estaban en el medio de cultivo del cultivo mantenido a pH 8,0, mientras que el día 3 post-infección, el porcentaje de DRP totales en el medio de cultivo aumentó al 92%. El día 3 post-infección, el porcentaje de DRP totales en el medio de cultivo fue del 67% a pH 7,4, del 82% a pH 7,6, del 73% a pH 7,8 y del 92% a pH 8,0. Los cultivos mantenidos a pH 7,2 no produjeron ninguna DRP en el medio de cultivo celular en este experimento.

El día 2 y día 3 post-infección los lisados celulares y el medio de cultivo de los biorreactores mantenidos a pH 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 y 8,0 se ensayaron para unidades de replicación (RU) usando un ensayo de infectividad. Los datos se muestran en las Figuras 3A y 3B. La densidad celular total no cambió de forma apreciable en estas condiciones de cultivo.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos de barras que representan las unidades de replicación (RU) totales ensayadas el día 2 (3A) y día 3 (3B) post-infección en el medio de cultivo (parte sombreada de cada barra) y lisados celulares (parte rellena de cada barra) cuando los cultivos se mantuvieron a los niveles de pH indicados. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de RU totales en el lisado celular. Estos datos demuestran que las partículas de rAAV liberadas al medio de cultivo celular son funcionales en un ensayo de infectividad.

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa la proporción partícula:infectividad (P/I) de partículas de rAAV recolectadas de lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 3 post-infección de biorreactores mantenidos a los niveles de pH indicados. Estos datos indican que la mayoría del vector de rAAV liberado al medio de cultivo es infeccioso.

Ejemplo 4

Efecto de osmolalidad en la liberación de partículas de vector de rAAV al medio de cultivo celular

Para evaluar los efectos de la osmolalidad inicial del medio de cultivo en la liberación de rAAV al medio de cultivo celular, se cultivaron células JL14 en biorreactores y se infectaron con adenovirus esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2. La osmolalidad inicial en los biorreactores individuales fue de 130, 200, 300, 400 y 500 mOsm, respectivamente. En cada reactor, el pH se mantuvo a pH 8,0 ($\pm 0,05$); temperatura = 37°C; DO₂ = 30%; y agitación = 150 rpm. Los días 2, 3 y 4 post-infección se recogieron los lisados celulares y el medio de cultivo celular y se ensayaron para producción de vector de rAAV.

Los resultados se muestran en las Figuras 5-7.

Las Figuras 5A, 5B y 5C son gráficos de barras que representan las DRP totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (5A), día 3 (5B) y día 4 (5C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad inicial indicada. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de DRP totales en el lisado celular. Estos datos muestran que cuando el medio de cultivo celular tiene una osmolalidad inicial de 300 mOsm, el 41%, el 59% y el 80% de las DRP totales están en el medio de cultivo celular los días 2, 3 y 4, respectivamente. Una osmolalidad inicial de medio de cultivo celular de 300 mOsm dio el máximo porcentaje de vector de rAAV total en el medio de cultivo celular, comparado con otras osmolalidades iniciales ensayadas. La densidad celular total no cambió de forma apreciable en estas condiciones de cultivo.

Las Figuras 6A, 6B y 6C son gráficos de barras que representan las RU totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (6A), día 3 (6B) y día 4 (6C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad inicial indicada. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de RU totales en los lisados celulares. Estos datos indican que el vector de rAAV liberado en el medio de cultivo es infeccioso.

La Figura 7 es un gráfico de barras que representa la proporción P/I de partículas de rAAV en los medios de cultivo celular los días 3 y 4 de cultivos de biorreactores con las osmolalidades iniciales indicadas.

Ejemplo 5

Efecto de temperatura sobre la liberación de partículas de vector de rAAV al medio de cultivo celular

Se cultivaron células JL14 en biorreactores y se infectaron con adenovirus esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las células se transfirieron a biorreactores mantenidos individualmente a 31°C, 34°C, 37°C, 39°C y 42°C, respectivamente. Estas temperaturas se mantuvieron $\pm 0,5^\circ\text{C}$. El pH en cada reactor se mantuvo a 8,0 ($\pm 0,05$); agitación = 150 rpm; DO₂ = 30%. Los días 2, 3 y 4 post-infección se ensayaron los lisados celulares y el medio de cultivo celular para partículas de rAAV.

Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

Las Figuras 8A-C son gráficos de barras que representan las DRP totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medios de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (8A), día 3 (8B) y día 4 (8C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular se mantuvo a la temperatura indicada. Los porcentajes sobre cada barra indican el porcentaje de DPR totales en el lisado celular. Los datos muestran que cuando el medio de cultivo se mantuvo a 39°C, el 66%, el 67% y el 57% de las DRP totales se observaron en el medio de cultivo celular los días 2, 3 y 4, respectivamente. Adicionalmente, los datos indican que se encontró un porcentaje mayor de DPR en el medio de cultivo celular cuando el medio de cultivo se mantuvo a 39°C, comparado con 37°C o 42°C.

Las Figuras 9A, 9B y 9C son gráficos de barras que representan las RU totales en lisados celulares (parte rellena de cada barra) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada barra) el día 2 (9A), día 3 (9B) y día 4 (9C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular se mantuvo a la temperatura indicada. Los porcentajes sobre cada barra en la Figura 9A indican el porcentaje de RU totales en el medio de cultivo celular. Los porcentajes sobre cada barra en la Figura 9A indican el porcentaje de RU totales en el lisado celular. Estos datos muestran que cuando el medio de cultivo se mantuvo a 39°C, el 80%, el 97% y el 98% de RU totales se observaron en el medio de cultivo celular los días 2, 3 y 4, respectivamente. La densidad celular total no cambió de forma apreciable en estas condiciones de cultivo.

Ejemplo 6

Efectos de suplementos de medio de cultivo en la liberación de partículas de vector de rAAV al medio de cultivo celular

Se cultivaron células JL14 en biorreactores y se infectaron con adenovirus esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las células se transfirieron a biorreactores que contenían diversos medios, de siguiente la manera: (1) DMEM; (2) DMEM + 4 g/litro de glucosa; (3) DMEM + 4 g/litro de glucosa + glutamina 4 mM; (4) DMEM + 4 g/litro de glucosa + glutamina 4 mM + aminoácidos + vitaminas ("completo"); (5) 2X DMEM. Todas las osmolalidades de partida se ajustaron a 285-300 mOsm. Otros parámetros fueron los siguientes: temperatura mantenida a 39°C; pH mantenido a 8,0; DO₂ = 30%; y agitación = 150 rpm. Tres días post-infección, el sobrenadante de cultivo celular se ensayó para partículas de vector de rAAV.

Los resultados se muestran en las Figuras 10, 11 y 12.

La Figura 10 es un gráfico de barras que representa las DRP totales en el medio de cultivo tres días post-infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

La Figura 11 es un gráfico de barras que representa las RU en el medio de cultivo tres días post-infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

La Figura 12 es un gráfico de barras que representa la proporción P/I de partículas virales en el medio de cultivo celular cuando los cultivos se desarrollaron en los diversos medios indicados.

Aunque la anterior invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, será evidente para los especialistas en la técnica que se practicarán ciertos cambios y modificaciones. Por lo tanto, la descripción y ejemplos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una población de partículas de virus, que comprende las etapas de:

(a) incubar una célula productora en un medio de cultivo celular en condiciones que comprenden una condición que promueve la liberación de partículas de virus, por lo que las partículas de virus se liberan de la célula productora al medio de cultivo sin lisar las células, en el que la condición que promueve la liberación de partículas de virus:

(i) comprende una o más condiciones seleccionadas de osmolalidad, temperatura, concentración de un ión dado, densidad celular, concentración de oxígeno disuelto, concentración de glucosa, concentración de aminoácido y una condición que promueve la sincronización del ciclo celular y

(ii) comprende pH y

(b) recolectar las partículas virales del medio de cultivo celular sin lisar las células, obteniendo de este modo una población de partículas virales;

en el que el virus es un virus adeno-asociado (MV).

2. El método de la reivindicación 1, en el que el virus es un virus adeno-asociado recombinante (rAAV) y en el que la célula productora comprende:

(i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV;

(ii) un vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido heterólogo no-AAV flanqueado por al menos una repetición terminal invertida de AAV (ITR) y

(iii) función de virus auxiliar para AAV.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la condición que promueve la liberación de partículas de virus es una combinación de osmolalidad y pH, temperatura y pH u osmolalidad, temperatura y pH.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la condición que promueve la liberación de partículas de virus es una combinación de osmolalidad y pH.

5. El método de la reivindicación 3, en el que la condición que promueve la liberación de partículas de virus es una combinación de temperatura y pH.

6. El método de la reivindicación 3, en el que la condición que promueve la liberación de partículas de virus es una combinación de osmolalidad, temperatura y pH.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el pH es de 7,4 a 8,0.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el pH es 8,0.

9. El método de la reivindicación 7 o 8, en el que el pH inicial del medio de cultivo es 8,00.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el pH del medio de cultivo se supervisa durante el cultivo y se mantiene en 8,00.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 y 6 a 10, en el que la osmolalidad del medio de cultivo se supervisa durante el cultivo y se mantiene de 200 mOsm a 400 mOsm.

12. El método de la reivindicación 11, en el que la osmolalidad del medio de cultivo celular es 300 mOsm.

13. El método de la reivindicación 11 ó 12, en el que la osmolalidad inicial del cultivo celular es 300 mOsm.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la osmolalidad del medio de cultivo celular se ajusta usando NaCl u otra sal, manitol o glucosa.

15. El método de la reivindicación 14, en el que la osmolalidad del medio de cultivo celular se ajusta usando NaCl.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 5 a 15, en el que la temperatura es 37°C a 40°C.

17. El método de la reivindicación 16, en el que la temperatura es 39°C.

ES 2 317 709 T3

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 17, en el que las células productoras se cultivan durante 48 a 96 horas después de la introducción de función de virus auxiliar.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en el que la función de virus auxiliar se proporciona por el virus auxiliar.

20. Un método para generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho virus auxiliar es un adenovirus.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 20, que comprende adicionalmente las etapas de:

(c) cromatografiar el medio de cultivo de la célula productora de AAV en al menos una resina de intercambio aniónico cargada positivamente y

(d) purificar las fracciones cromatográficas que contienen partículas de rAAV de la etapa (c) por cromatografía de intercambio catiónico o filtración de flujo tangencial para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV.

22. El método de la reivindicación 21, en el que la etapa (d) es cromatografía de intercambio catiónico.

23. El método de la reivindicación 21, en el que la etapa (d) es filtración de flujo tangencial.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 20, que comprende adicionalmente las etapas de:

(c) cromatografiar el medio de cultivo de célula productora de AAV en una resina de intercambio catiónico;

(d) purificar las fracciones cromatográficas que contienen partículas de rAAV de la etapa (c) mediante cromatografía de intercambio aniónico y

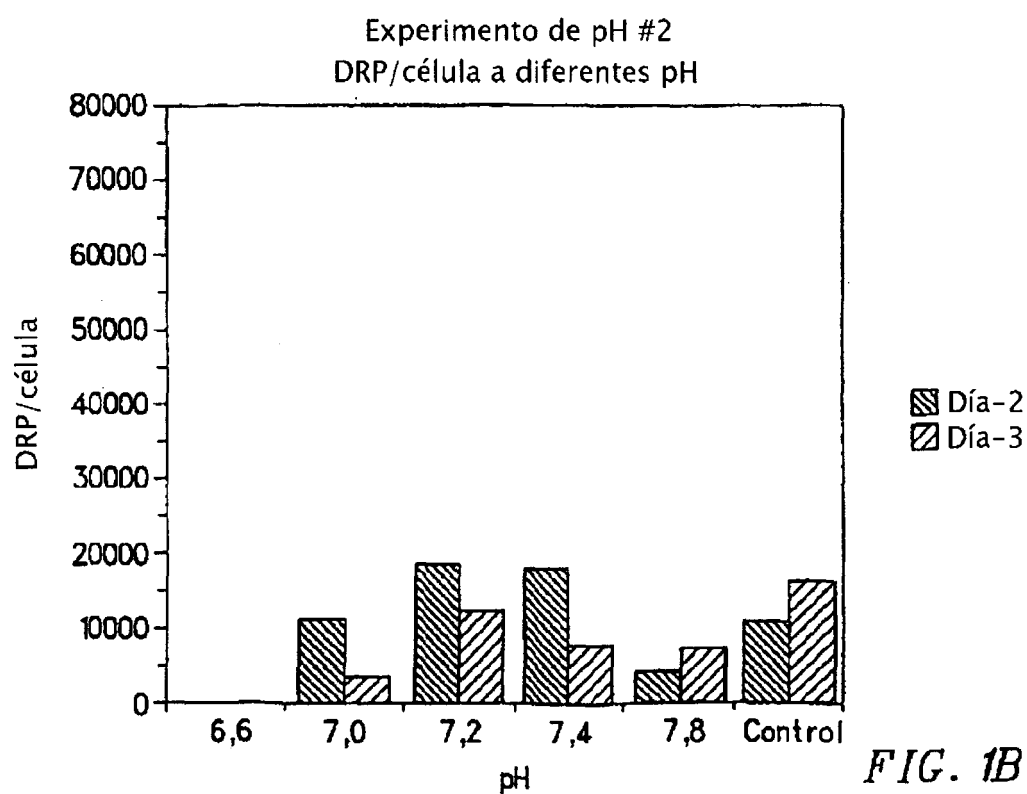
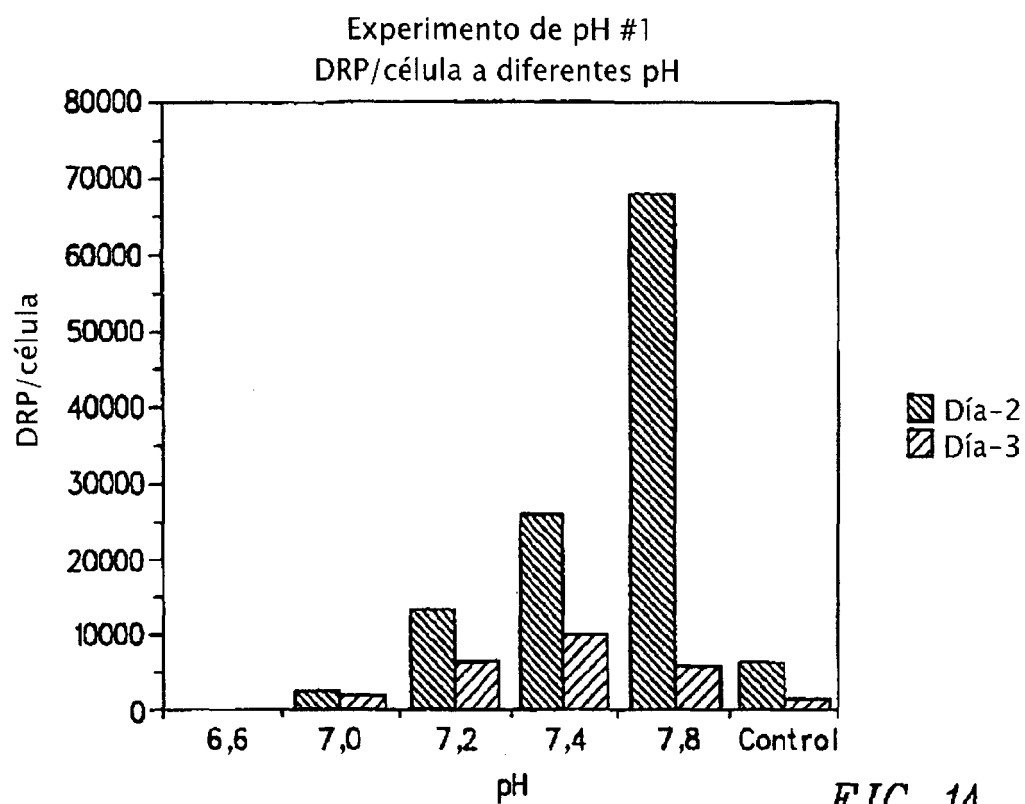
(e) purificar las fracciones cromatográficas que contienen partículas de rAAV de la etapa (d) mediante cromatografía de sulfato de heparina para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 20, que comprende adicionalmente las etapas de cromatografiar el medio de cultivo de la célula productora de AAV en una pluralidad de resinas de intercambio iónico que comprenden al menos una resina de intercambio aniónico cargada positivamente y al menos una resina de intercambio catiónico cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV.

26. Un método para generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 25, en el que dicho vector de rAAV comprende un polinucleótido heterólogo no-AAV flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y/o en el que dicha célula productora de AAV comprende al menos un gen de empaquetamiento de AAV que está integrado de forma estable en el genoma de dicha célula productora de AAV y/o en el que dicha célula productora de AAV comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV.

27. Un método para generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dicho gen *rep* de AAV y gen *cap* de AAV están de forma estable integrados en el genoma de dicha célula productora de AAV.

28. Un método para generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 27, en el que la célula productora es una línea celular de mamífero dependiente de unión o una línea celular de mamífero adaptada a suspensión.



EXPERIMENTO DE pH #3 EN REACTOR DE CFTR JL-14
DISTRIBUCIÓN DE VECTOR EN CÉLULAS/SOBRENADANTE
DRP TOTALES EN CULTIVO DÍA 2

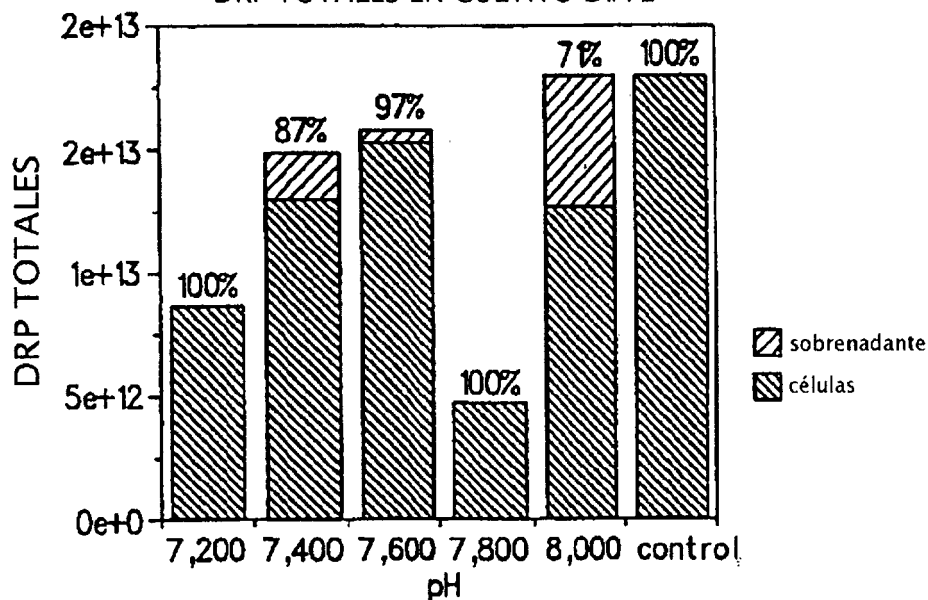


FIG. 2A

EXPERIMENTO DE pH #3 EN REACTOR DE CFTR JL-14
DISTRIBUCIÓN DE VECTOR EN CÉLULAS/SOBRENADANTE
DRP TOTALES EN CULTIVO DÍA 3

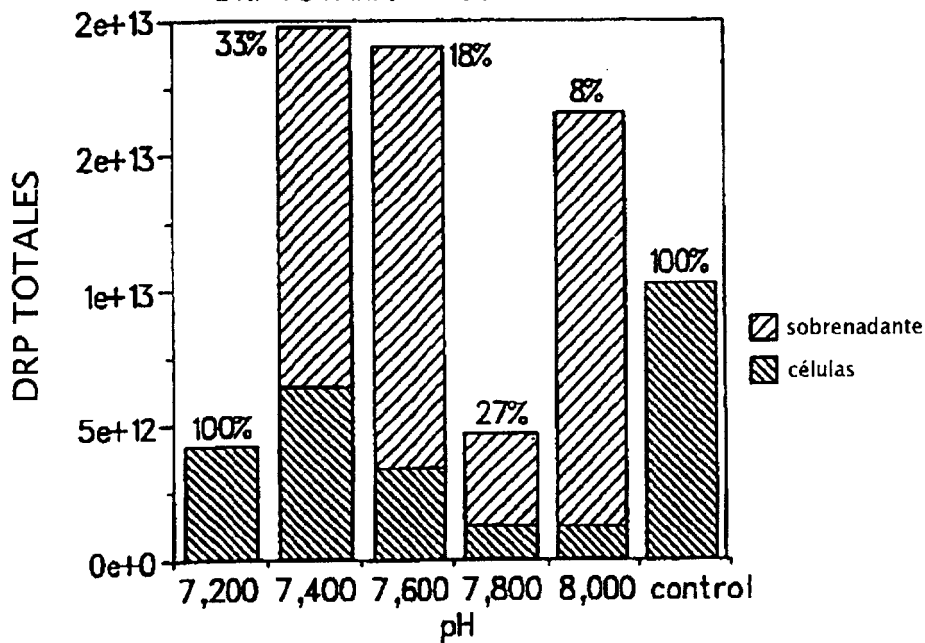


FIG. 2B

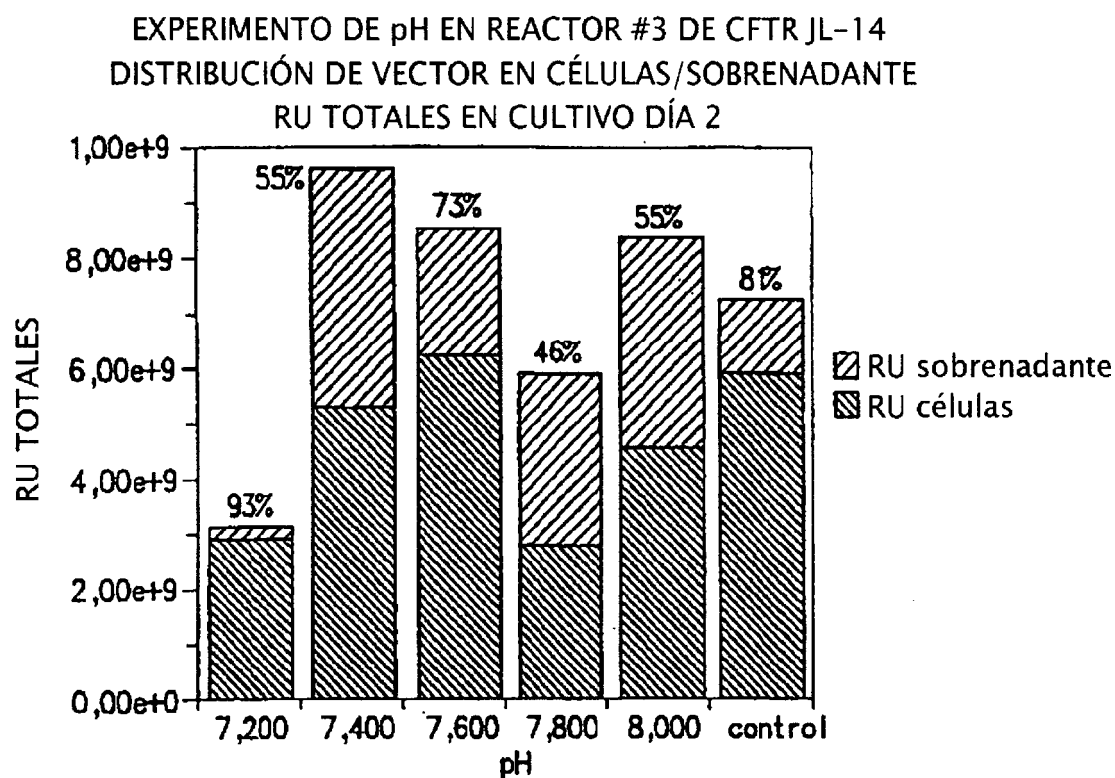


FIG. 3A

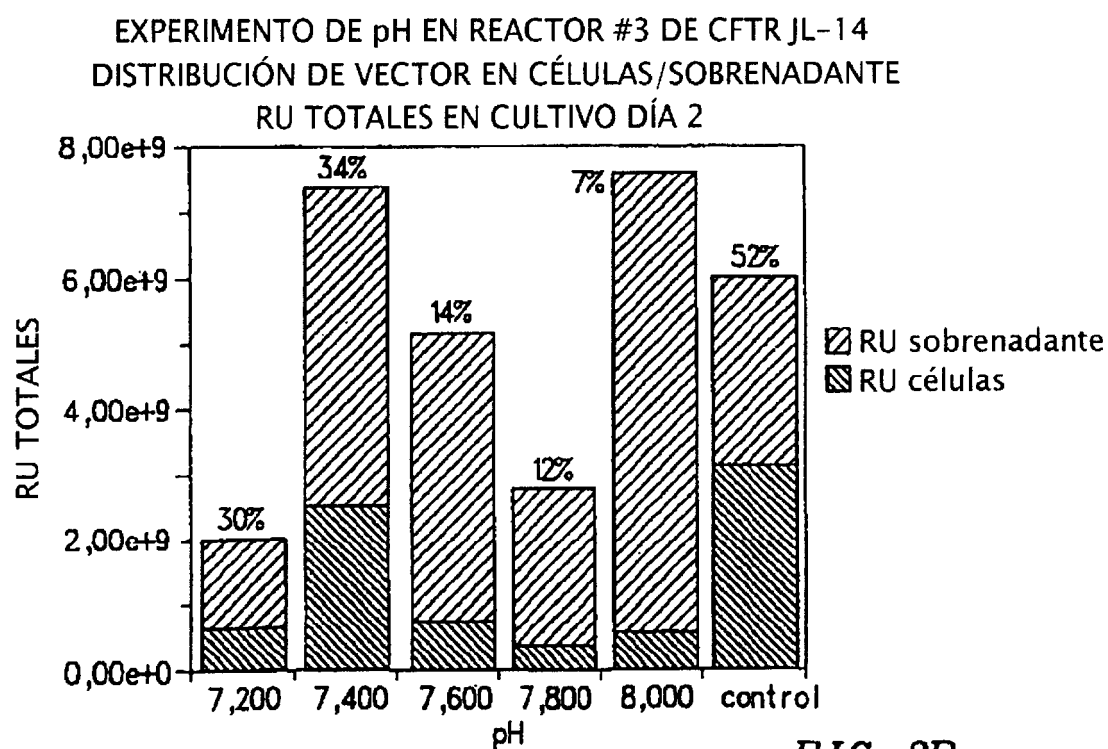


FIG. 3B

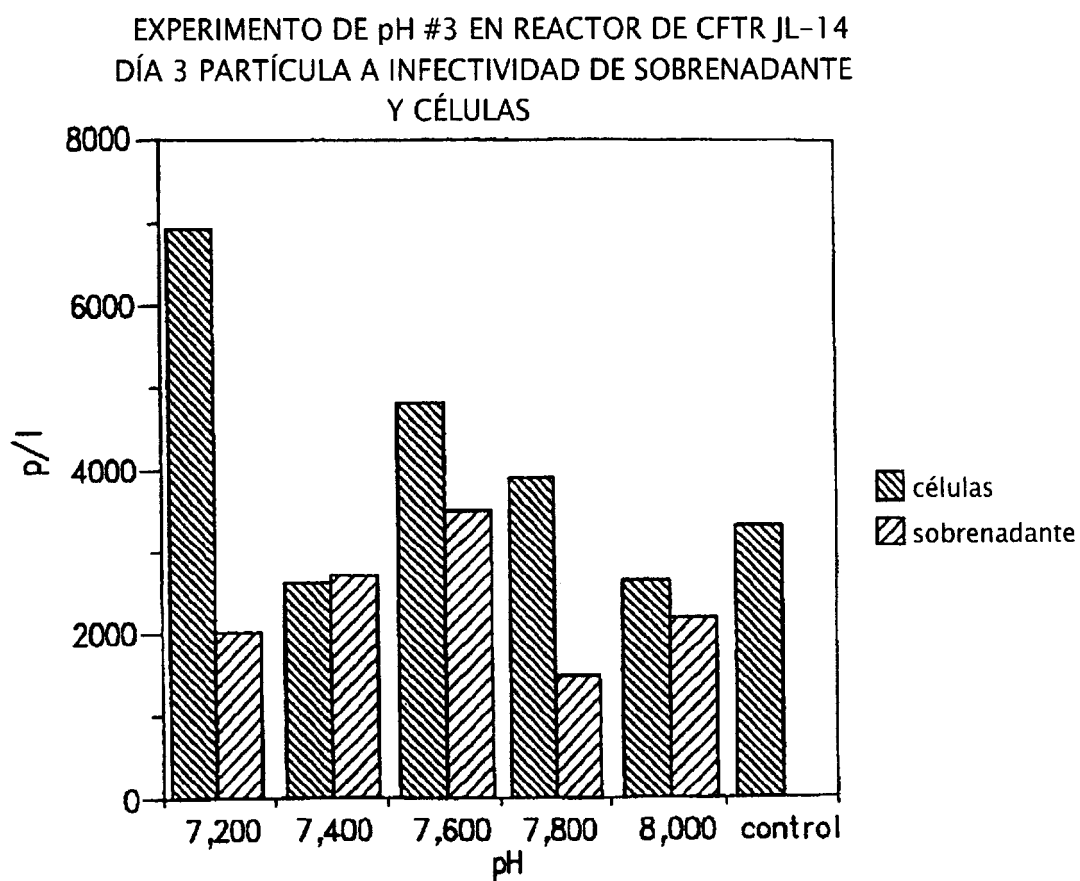


FIG. 4

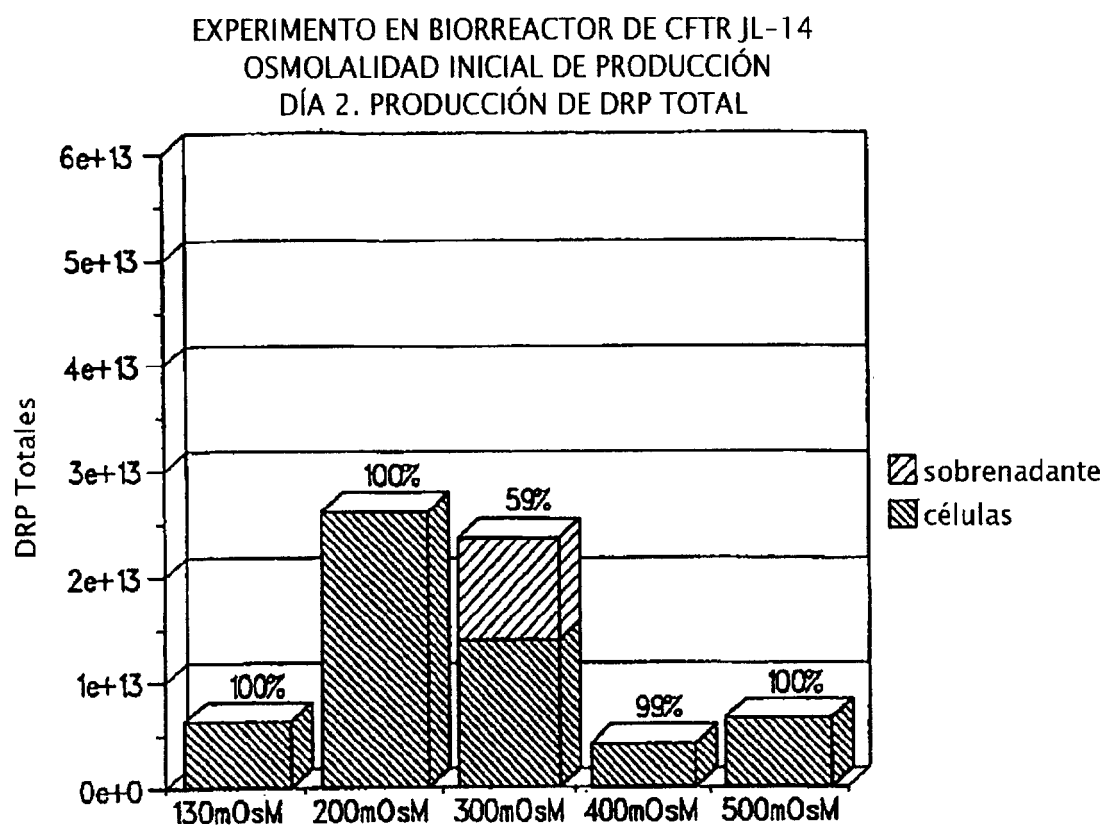


FIG. 5A

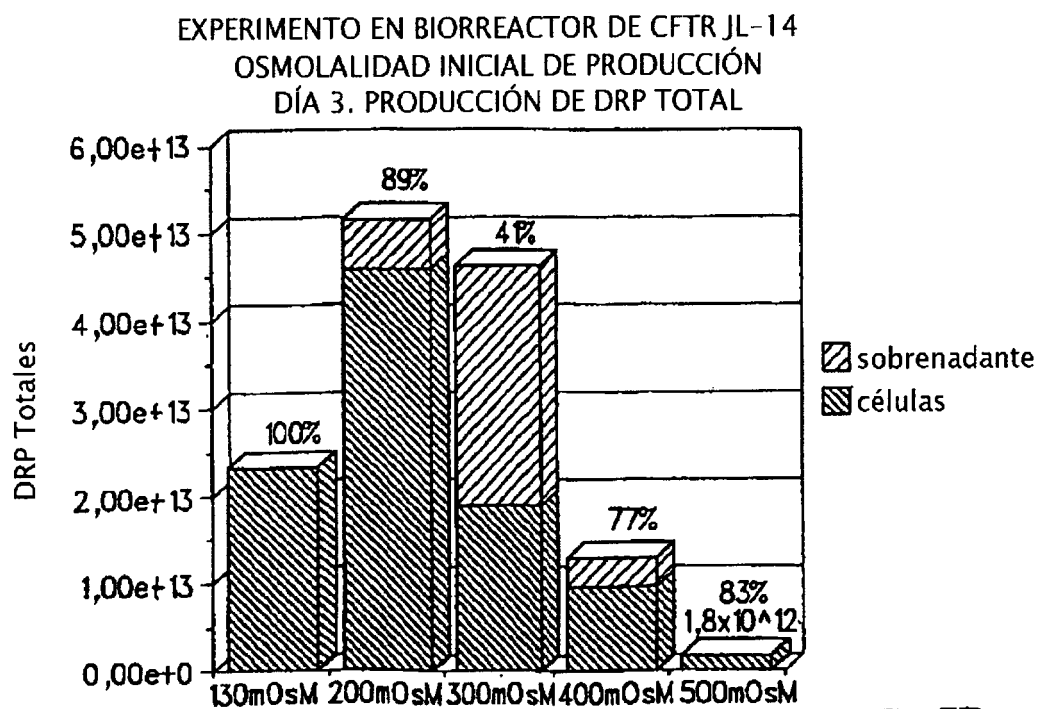


FIG. 5B

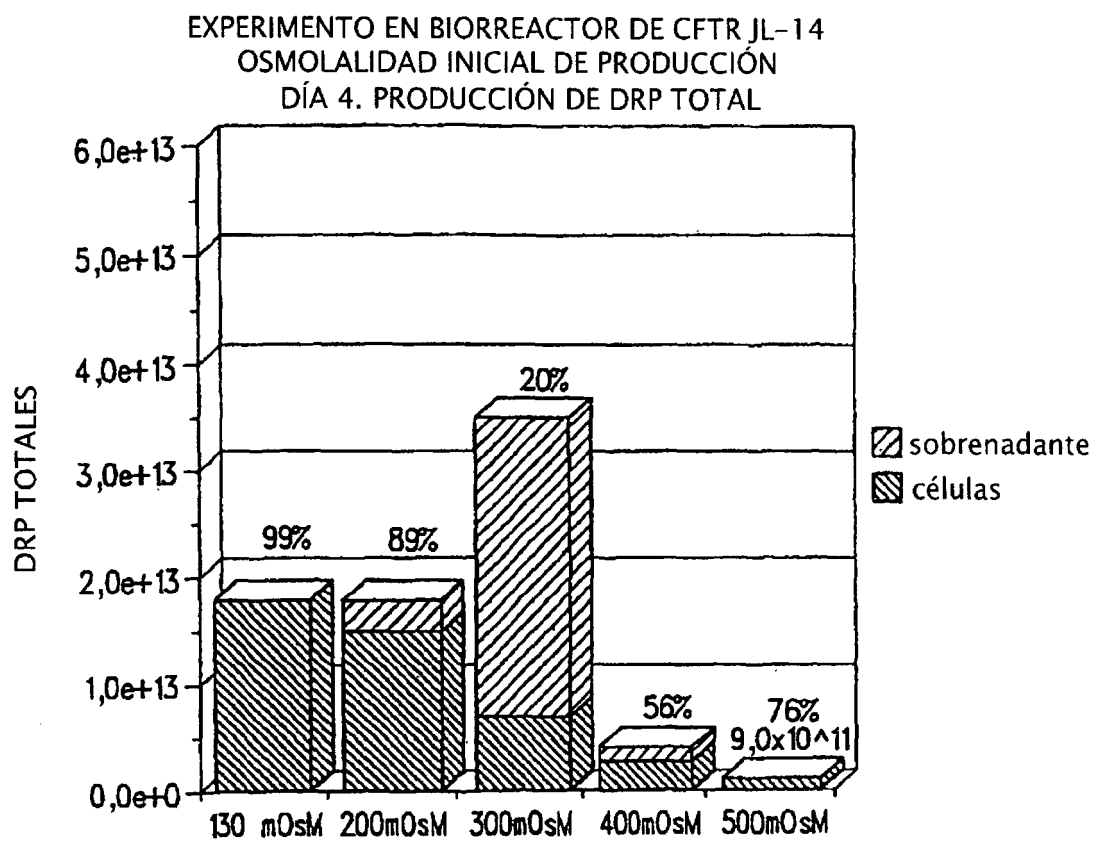


FIG. 5C

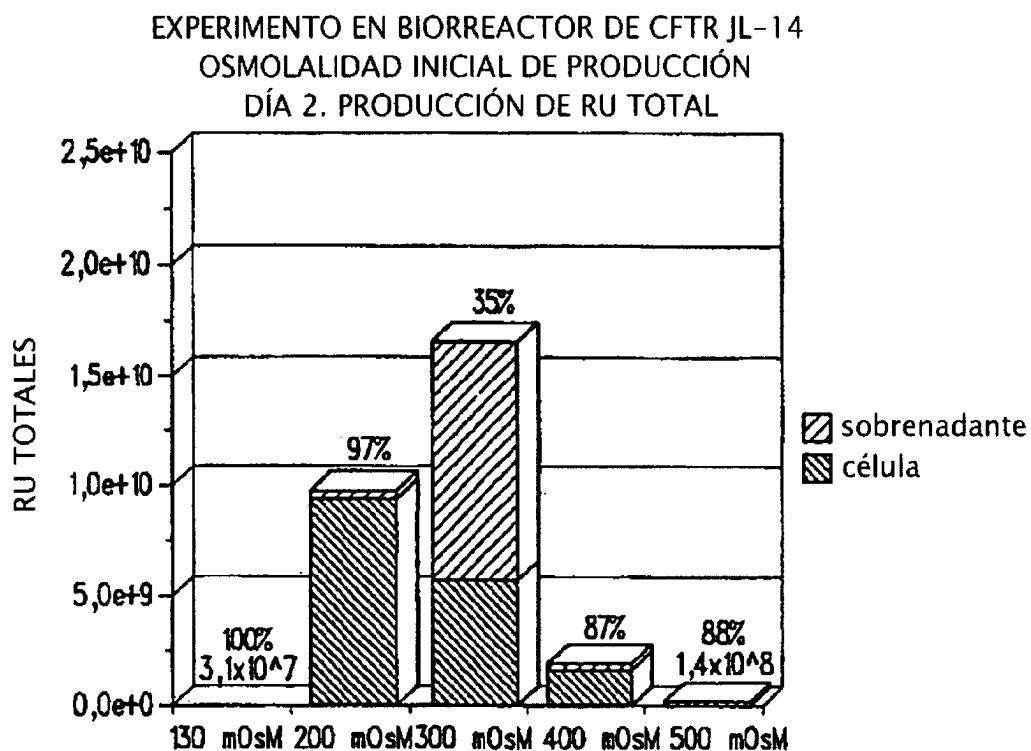


FIG. 6A

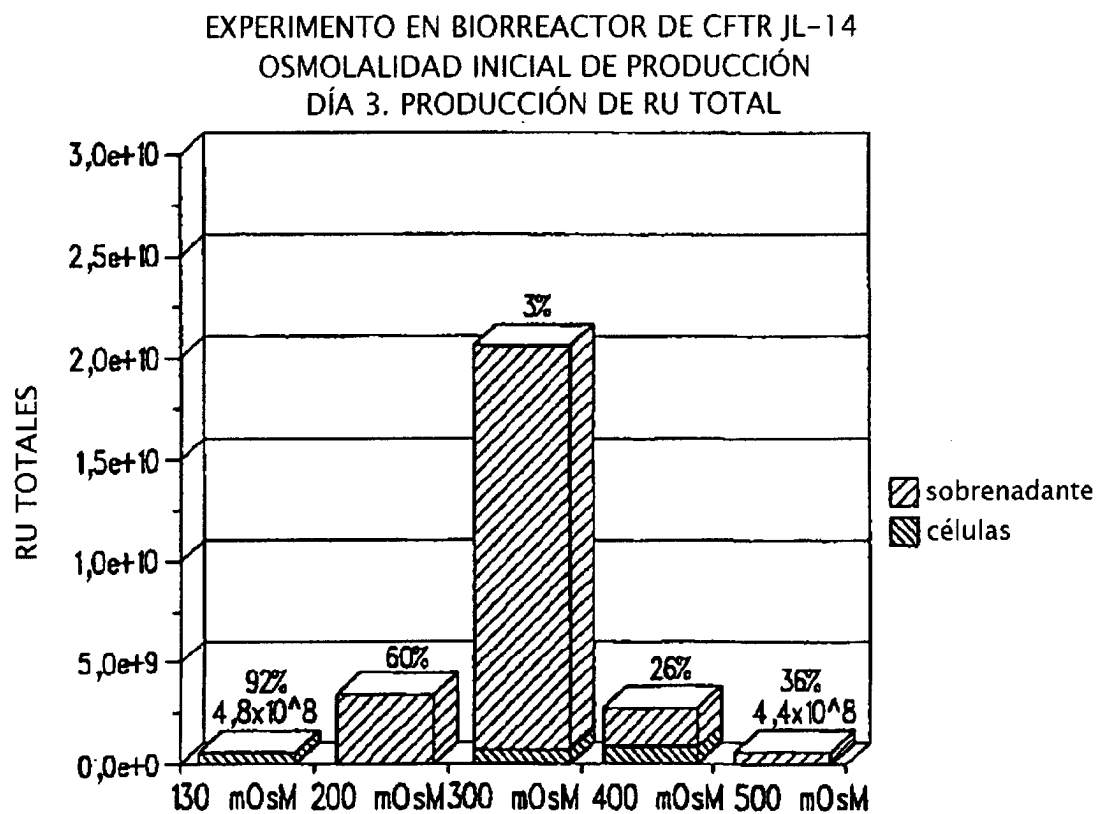


FIG. 6B

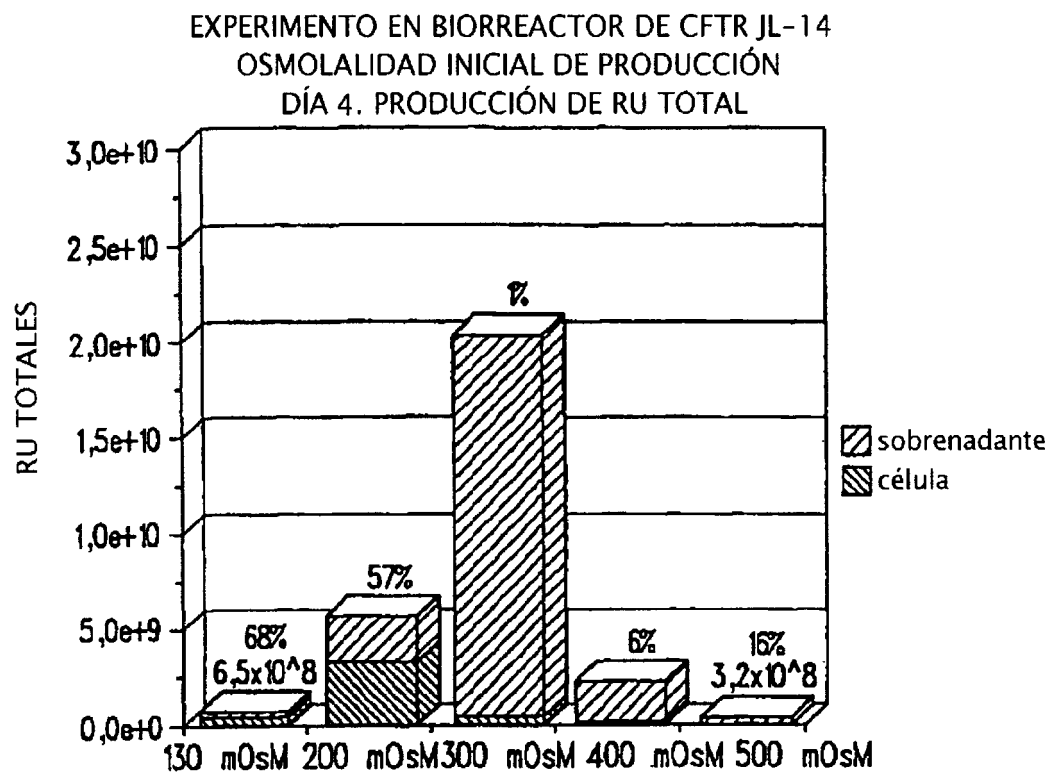


FIG. 6C

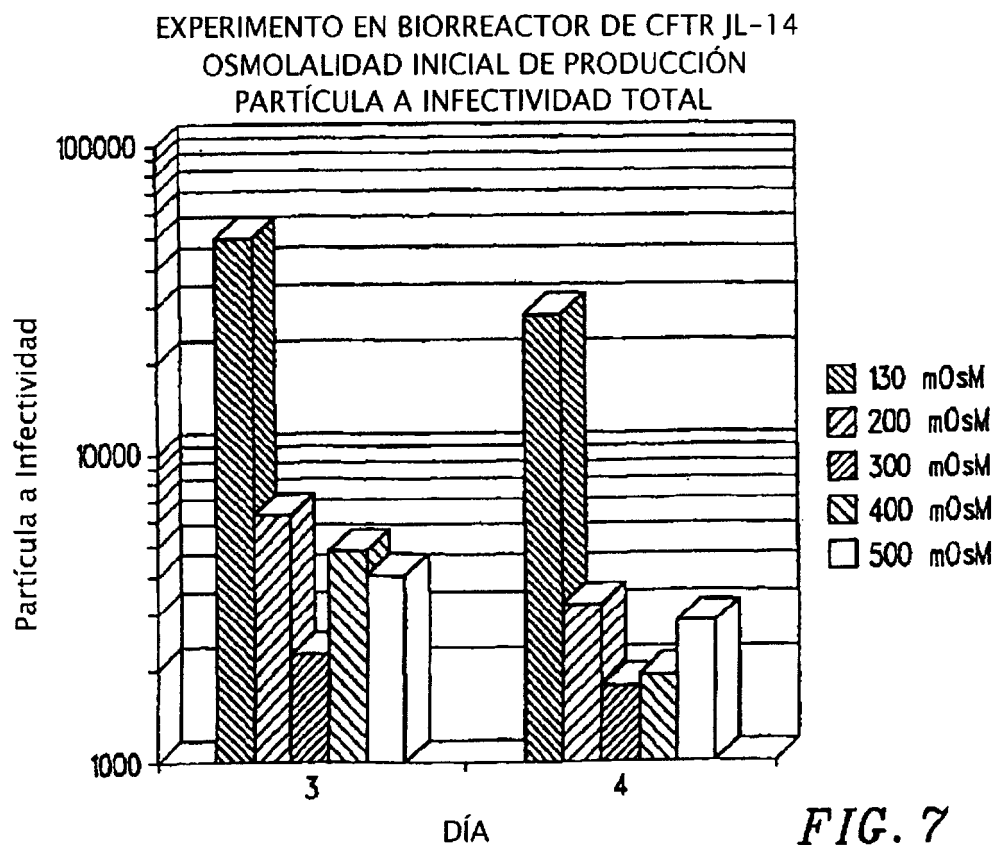


FIG. 7

EXPERIMENTO DE TEMPERATURA EN REACTOR DE CFTR JL-14
DÍA 2. PARTÍCULAS RESISTENTES A ADNASE TOTALES

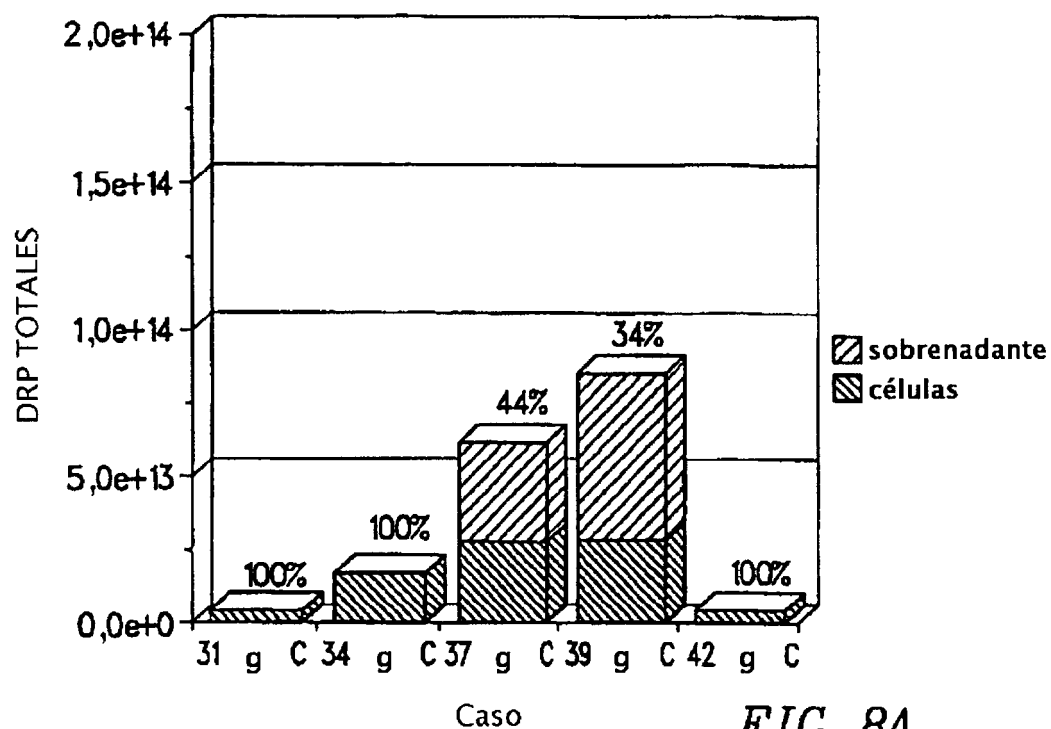


FIG. 8A

EXPERIMENTO DE TEMPERATURA EN REACTOR DE CFTR JL-14
DÍA 3. PARTÍCULAS RESISTENTES A ADNASE TOTALES

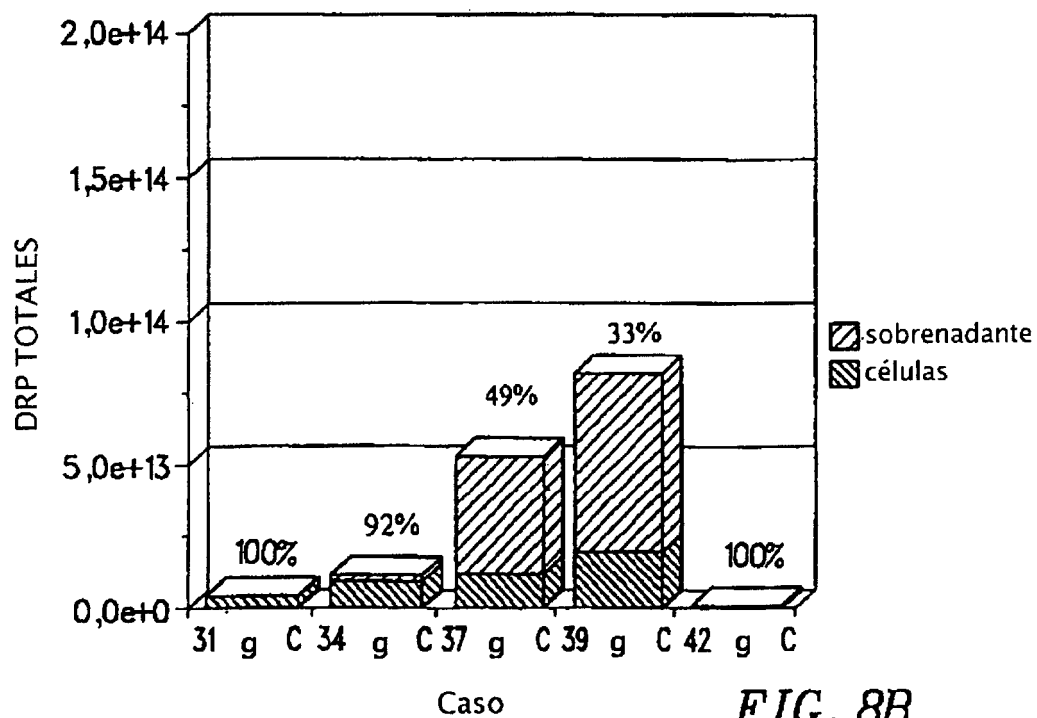


FIG. 8B

EXPERIMENTO DE TEMPERATURA EN REACTOR DE CFTR JL-14
DÍA 4. PARTÍCULAS RESISTENTES A ADNASE TOTALES

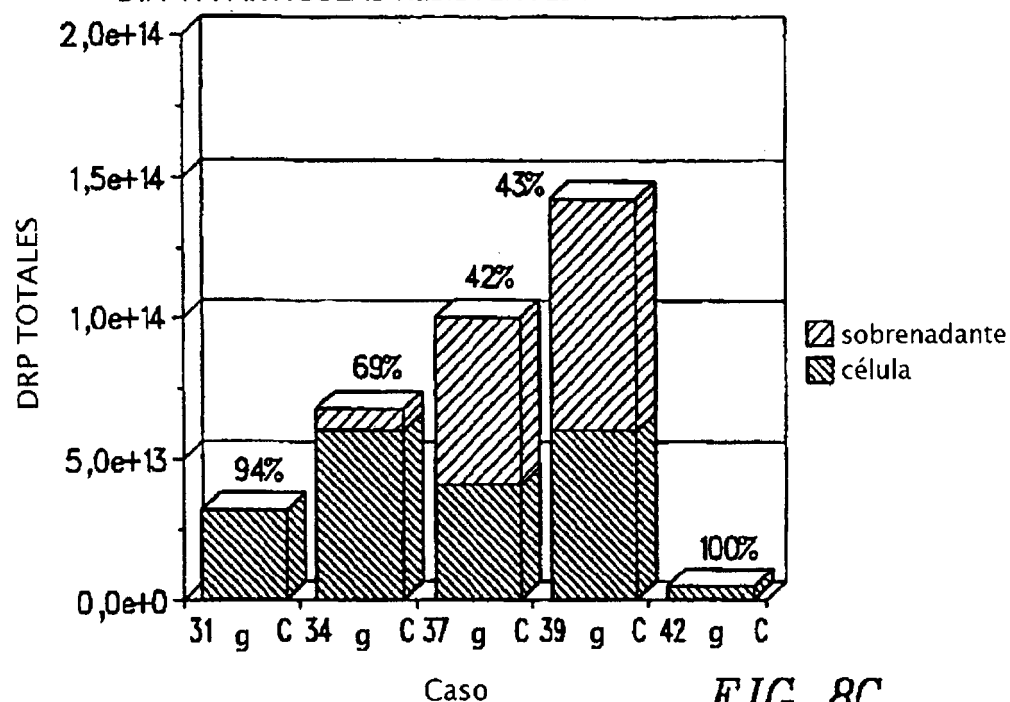


FIG. 8C

EXPERIMENTO DE TEMPERATURA EN REACTOR DE CFTR JL-14
DÍA 2. UNIDADES REPLICATIVAS TOTALES

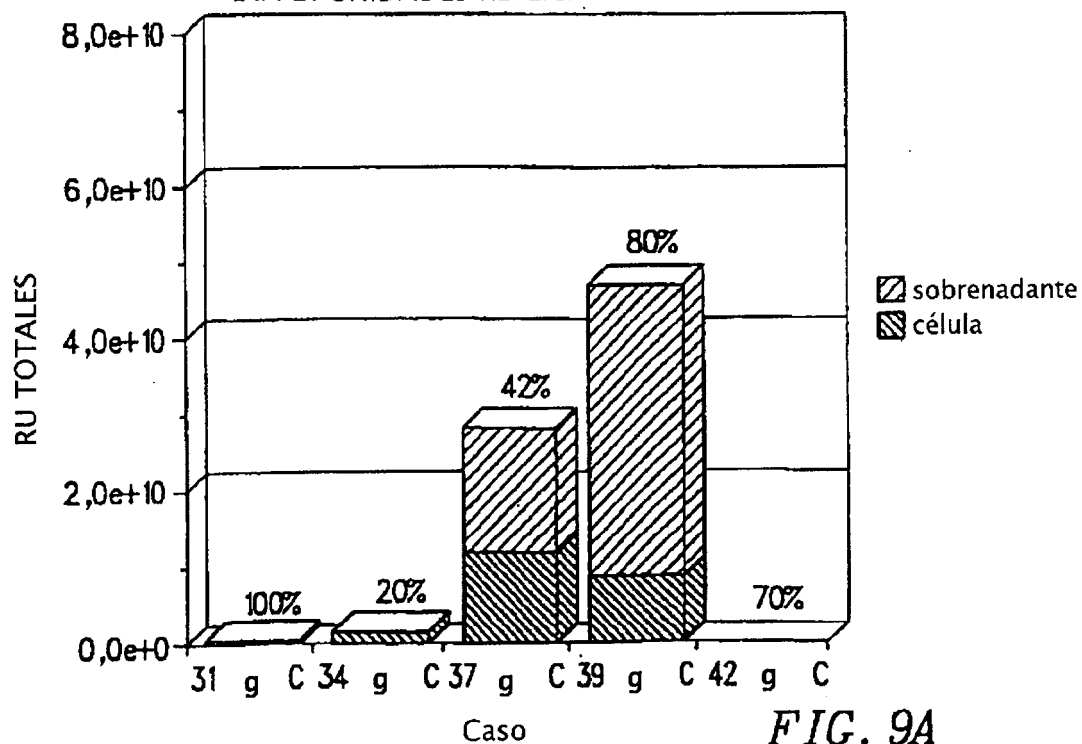


FIG. 9A

EXPERIMENTO DE TEMPERATURA EN REACTOR DE CFTR JL-14
DÍA 3. UNIDADES REPLICATIVAS TOTALES

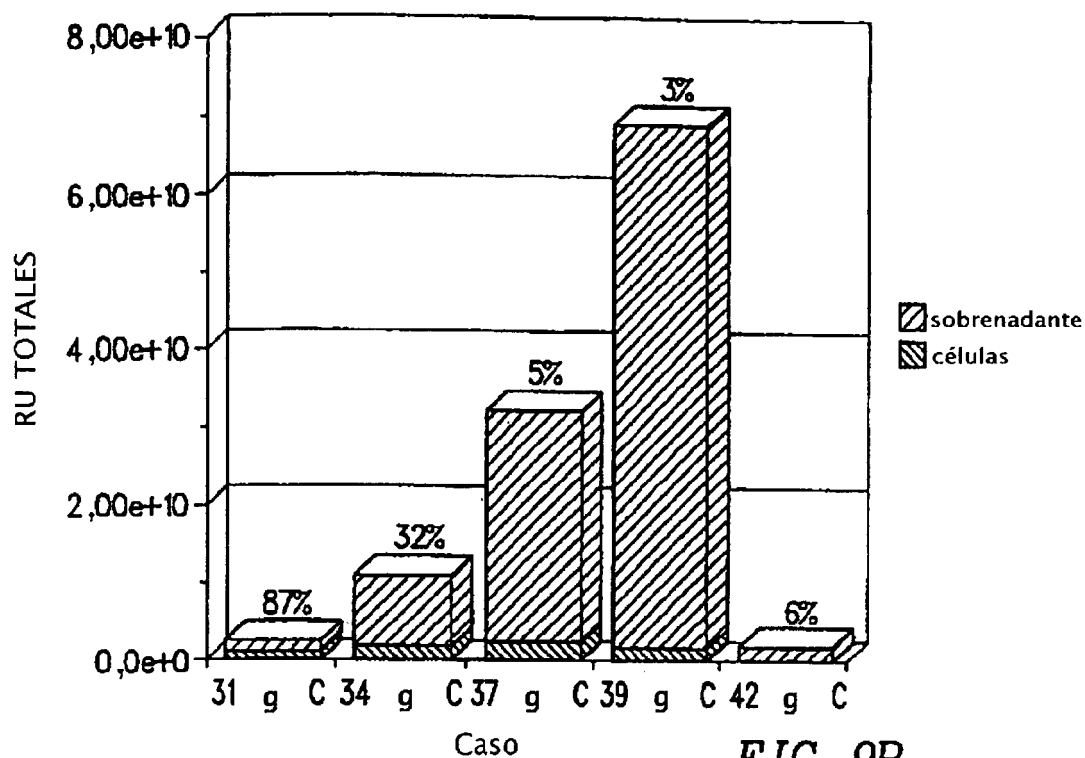


FIG. 9B

EXPERIMENTO DE TEMPERATURA EN REACTOR DE CFTR JL-14
DÍA 4. UNIDADES REPLICATIVAS TOTALES

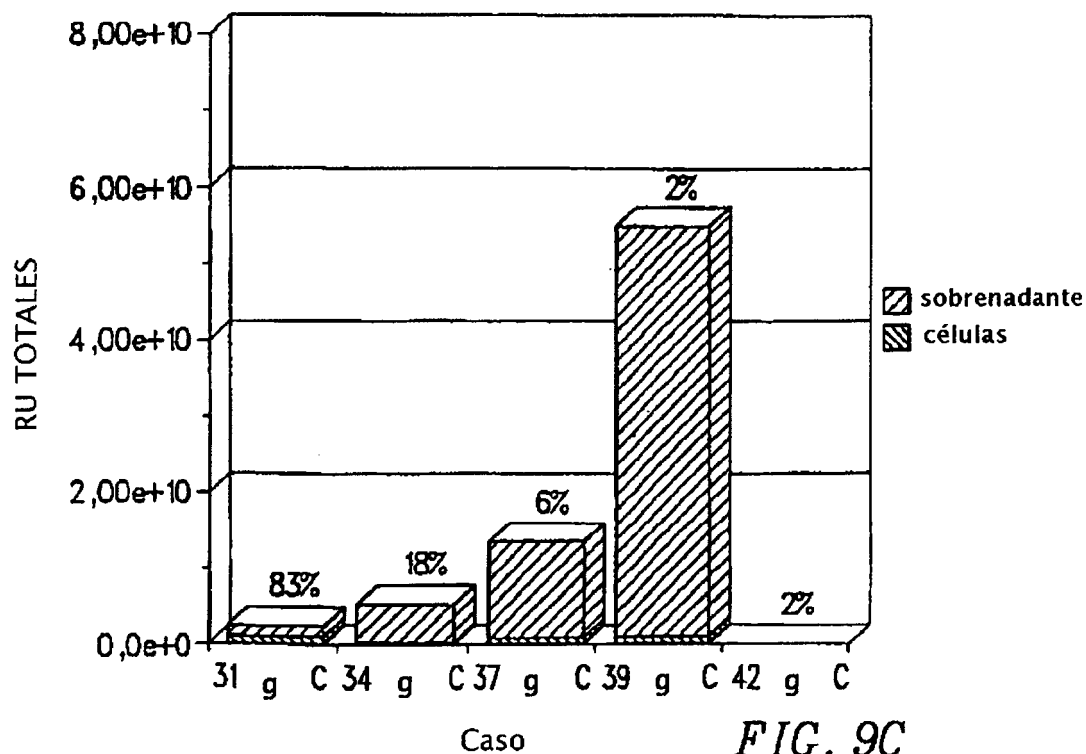


FIG. 9C

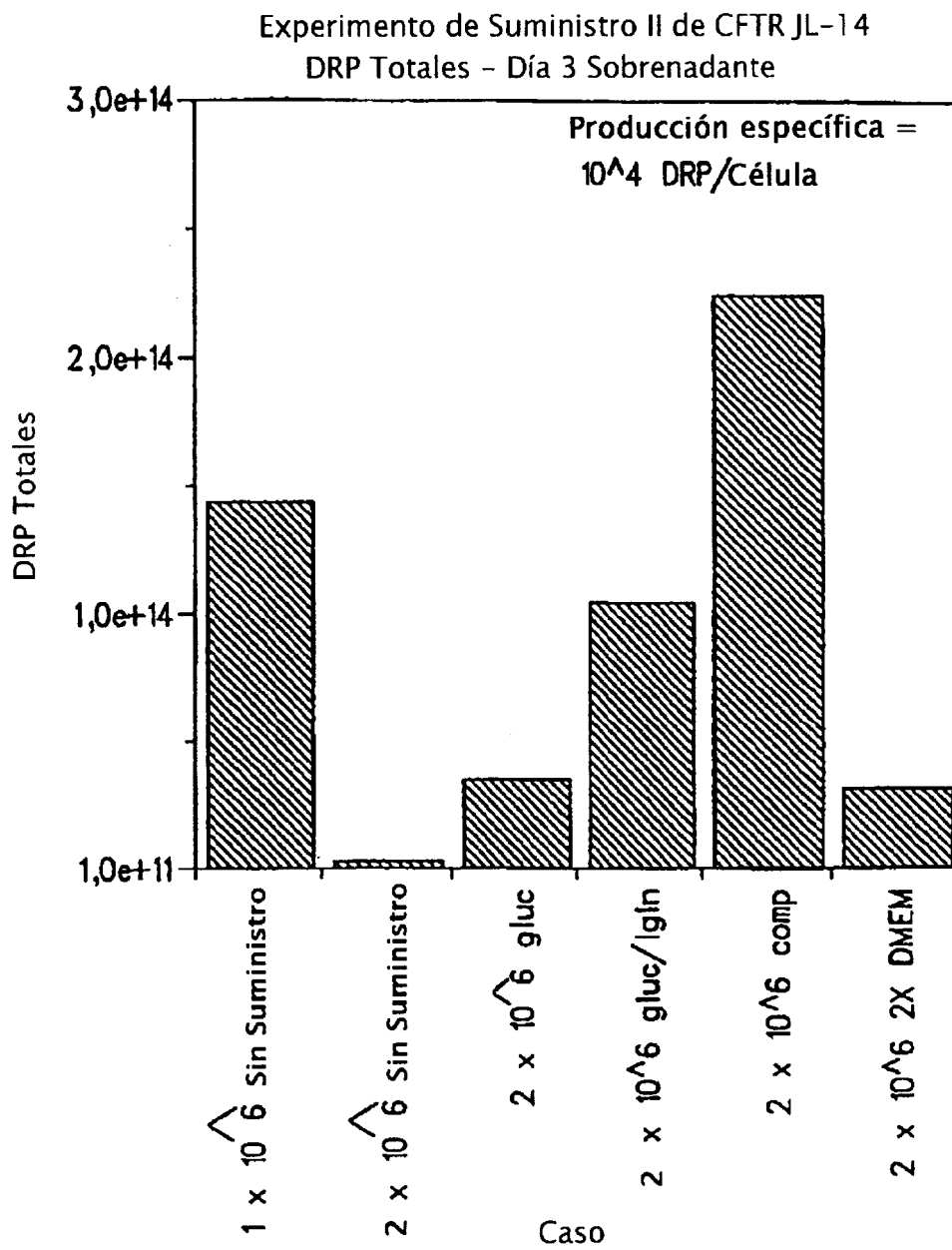


FIG. 10

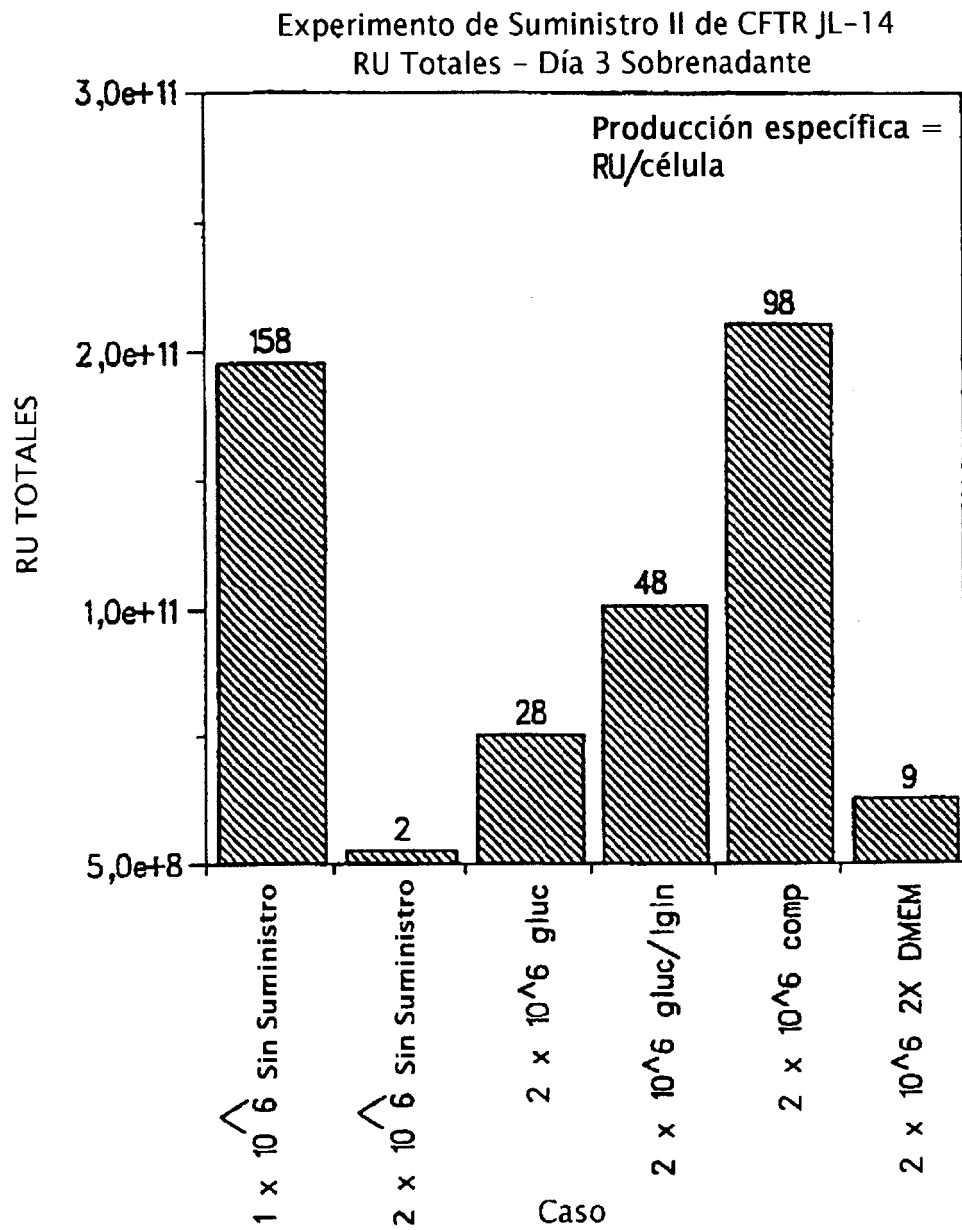


FIG. 11

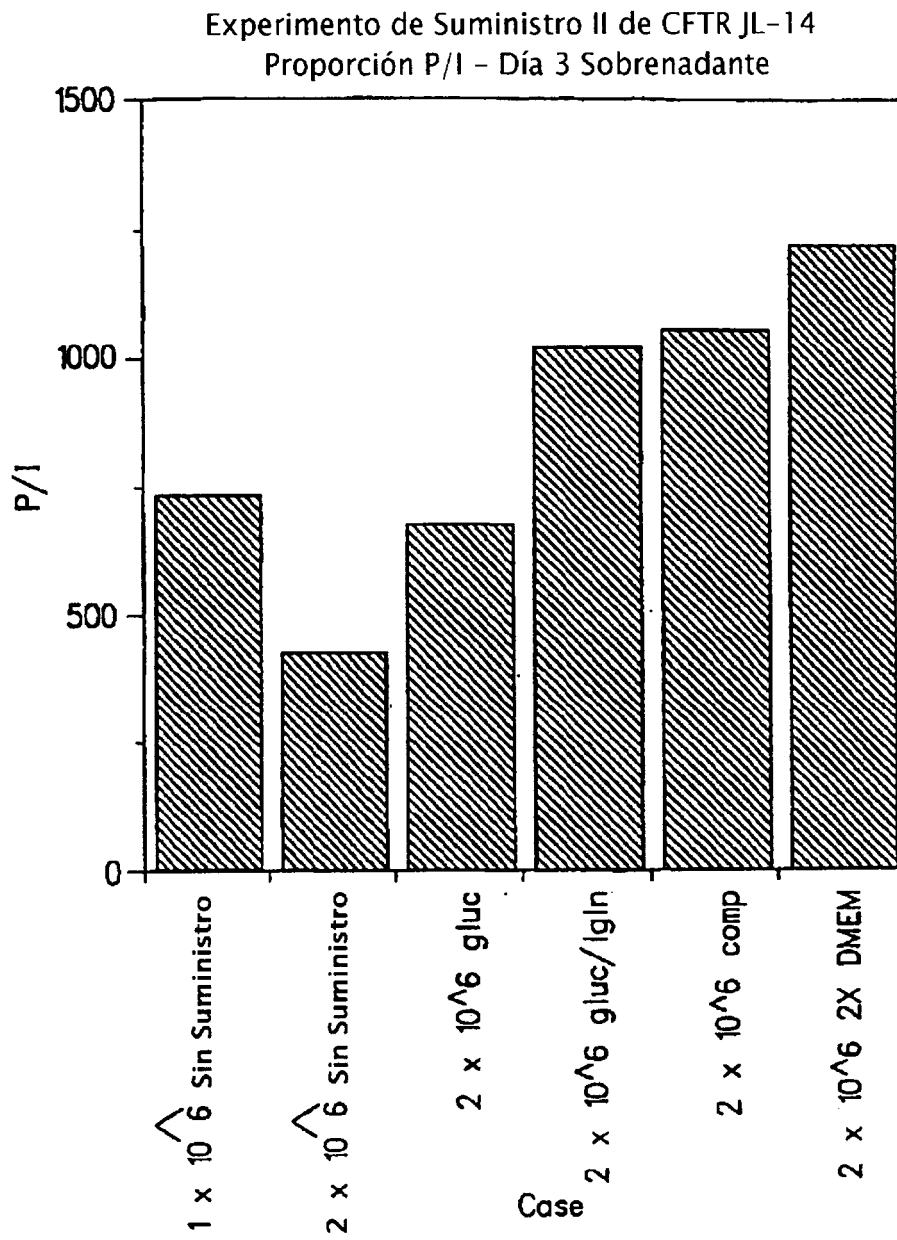


FIG. 12

Soluciones de Aminoácidos de MEM ²			
Base N° de Cat.	11136	21135	
Componente	50X Líquido	50X Líquido	
AMINOÁCIDOS:			
L-Arginina	mg/L	mg/L	
L-Cistina	6320,00	6320,00	
L-Glutamina	1200,00	1200,00	
L-Histidina-HCl-H ₂ O	-	14600,00	
L-Isoleucina	2100,00	2100,00	
L-Leucina	2625,00	2625,00	
L-Lisina-HCl	2620,00	2620,00	
L-Metionina	3625,00	3625,00	
L-Fenilalanina	755,00	755,00	
L-Treonina	1650,00	1650,00	
L-Triptófano	2380,00	2380,00	
L-Tirosina	510,00	510,00	
L-Valina	1800,00	1800,00	
	2340,00	2340,00	

Referencias:

1. Eagle, H. (1955) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 362.
2. Eagle, H. (1959) Science 130, 432

Hidrolizado de Lactoalbúmina con Sales de Earle (ELH)			
Base N° de Cat.	11250	11800	
Componente	1X Líquido	Polvo	
SALES INORGÁNICAS:			
CaCl ₂ (anhyd.)	mg/L	mg/L	
KCl	200,00	200,00	
MgSO ₄ (anhyd.)	400,00	400,00	
NaCl	97,67	97,70	
NaHCO ₃	6800,00	6800,00	
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	2200,00	-	
OTROS COMPONENTES:			
D-Glucosa	140,00	140,00	
Hidrolizado de Lactoalbúmina	1000,00	1000,00	
Rojo Fenol	6500,00	5000,00	
	10,00	10,00	

FIG. 13A

Soluciones MEM de Vitaminas ²		
Base N° de Cat.	11120	50X Líquido
Componente		mg/L
NaCl		8500,00
D-Ca Pantotenato		100,00
Cloruro de Colina		100,00
Ácido Fólico		100,00
[-Inositol		200,00
Nicotinamida		100,00
Piridoxal-HCl		100,00
Riboflavina		10,00
Tiamina HCl		100,00

Solución MEM de Aminoácidos No Esenciales ²		
Base N° de Cat.	11140	100X Líquido
Componente		mg/L
AMINOÁCIDOS:		
L-Alanina		890,00
L-Asparagina		1500,00
L-Aspártico		1330,00
L-Glutamina		1470,00
Glicina		750,00
L-Prolina		1150,00
L-Serina		1050,00

FIG. 13B