

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1998.09.04**

(30) Prioridade(s): **1997.09.05 US 925815**
1998.01.16 US 71733 P

(43) Data de publicação do pedido: **2000.06.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.12.05**
020/2013

(73) Titular(es):

GENZYME CORPORATION
500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142
US

(72) Inventor(es):

EDWARD MORROW ATKINSON **US**
VICTOR P. FUNG **US**
PERRY C. WILKINS **US**
RYAN K. TAKEYA **US**
THOMAS C. REYNOLDS **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE ELEVADO TÍTULO DE VECTORES DE AAV RECOMBINANTE ISENTAS DE AUXILIAR**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PRODUZIR PREPARAÇÕES DE ELEVADO TÍTULO, SUBSTANCIALMENTE PURIFICADAS, DE VÍRUS ADENO-ASSOCIADO (AAV) RECOMBINANTE QUE PODEM SER UTILIZADAS COMO VECTORES PARA DISTRIBUIÇÃO GÉNICA. NO INÍCIO DA PRODUÇÃO DE VECTORES, AS CÉLULAS PRODUTORAS DE AAV DESTA INVENÇÃO TÍPICAMENTE COMPREENDEM UM OU MAIS GENES DE EMPACOTAMENTO DE AAV, UM VECTOR DE AAV COMPREENDENDO UM TRANSGENE HETERÓLOGO (I. E., NÃO AAV) DE INTERESSE E UM VÍRUS AUXILIAR, TAL COMO UM ADENOVÍRUS. AS PREPARAÇÕES DE VECTOR DE AAV PRODUZIDAS SÃO, EM GERAL, INCOMPETENTES PARA REPLICAÇÃO MAS SÃO CAPAZES DE MEDIAREM A DISTRIBUIÇÃO DE UM TRANSGENE DE INTERESSE (TAL COMO UM GENE TERAPÊUTICO) PARA QUALQUER DE UMA AMPLA VARIEDADE DE TECIDOS E CÉLULAS. AS PREPARAÇÕES DE VECTOR DE AAV PRODUZIDAS DE ACORDO COM ESTA INVENÇÃO TAMBÉM SÃO SUBSTANCIALMENTE ISENTAS DE VÍRUS AUXILIAR, ASSIM COMO PROTEÍNAS VIRAIS DE AUXILIAR E CELULARES E OUTROS CONTAMINANTES. TAMBÉM É PROPORCIONADO UM ENSAIO QUANTITATIVO, DE ALTA CAPACIDADE, ÚTIL NA AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE E REPLICAÇÃO VIRAIS, ASSIM COMO NO RASTREIO DE AGENTES QUE AFECTAM A INFECCIOSIDADE E/OU REPLICAÇÃO VIRAIS.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE ELEVADO TÍTULO DE VECTORES DE AAV RECOMBINANTE ISENTAS DE AUXILIAR"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente divulgação refere-se, em geral, ao campo dos vectores de vírus adeno-associados (AAV) recombinantes e as suas preparações que podem ser utilizados para transferência génica. Mais especificamente, refere-se a métodos para a produção de preparações de elevado título de vectores de AAV recombinante que são substancialmente isentas de vírus auxiliares (*e. g.*, adenovírus), assim como proteínas celulares.

ANTECEDENTES

Os vírus adeno-associados (AAV) têm características únicas que os tornam atractivos como vectores para terapia génica. Os vírus adeno-associados infectam uma ampla gama de tipos de células. Contudo, são não transformantes e não estão implicados na etiologia de qualquer doença humana. A introdução de ADN em células hospedeiras receptoras conduz, em geral, a persistência e expressão de longo prazo do ADN, sem perturbação do normal metabolismo da célula.

Há, pelo menos, três características desejáveis de uma preparação de vector de AAV recombinante para utilização na transferência génica, especialmente em terapia génica humana. Em

primeiro lugar, prefere-se que o vector seja produzido a títulos suficientemente elevados para transduzir uma proporção eficaz de células no tecido alvo. A terapia génica *in vivo* tipicamente requer um elevado número de partículas de vector. Por exemplo, alguns tratamentos podem requerer mais que 10^8 partículas e o tratamento da fibrose cística por distribuição directa nas vias respiratórias pode requerer mais do que 10^{10} partículas. Em segundo lugar, prefere-se que as preparações de vector devam ser essencialmente isentas de AAV competente para replicação (*i. e.*, AAV fenotipicamente de tipo selvagem que pode ser replicado na presença de vírus auxiliar ou funções de vírus auxiliar). Em terceiro lugar, prefere-se que a preparação de vector de rAAV, como um todo, seja essencialmente isenta de outros vírus (tal como um vírus auxiliar utilizado na produção de AAV), assim como vírus auxiliar e proteínas celulares e outros componentes, tais como lípidos e hidratos de carbono, de modo a minimizar ou eliminar qualquer risco de produção de uma resposta imunitária no contexto da terapia génica. Este último ponto é especialmente significativo no contexto do AAV, porque o AAV é um vírus "dependente de auxiliar" que requer co-infecção com um vírus auxiliar (tipicamente adenovírus) ou outra provisão de funções de vírus auxiliar, de modo a ser eficazmente replicado e empacotado durante o processo de produção de AAV; e, além disso, observou-se que, no contexto de aplicações de terapia génica, o adenovírus produz uma resposta imunitária de hospedeiro (ver, *e. g.*, Byrnes *et al.*, *Neuroscience* 66:1015, 1995; McCoy *et al.*, *Human Gene Therapy* 6:1553, 1995; e Barr *et al.*, *Gene Therapy* 2:151, 1995). Os métodos da presente divulgação abordam estas e outras características desejáveis das preparações de vector de rAAV, como descrito e ilustrado em detalhe abaixo.

Revisões gerais de virologia e genética de AAV estão disponíveis em qualquer outra parte. O leitor pode recorrer, *inter alia*, a Carter, "Handbook of Parvoviruses", Vol. I, p. 169-228 (1989) e Berns, "Virology", p. 1743-1764, Raven Press, (1990). O que se segue é uma breve sinopse para a conveniência do leitor. O AAV é um vírus de replicação defeituosa, que significa que depende de um vírus auxiliar de modo a completar o seu ciclo de replicação e empacotamento numa célula hospedeira. O genoma de AAV compreende, em geral, os genes de empacotamento *rep* e *cap*, com outras funções necessárias sendo proporcionadas *in trans* a partir do vírus auxiliar e da célula hospedeira.

As partículas de AAV são constituídas por uma cápside proteinácea tendo três proteínas de cápside, VP1, VP2 e VP3, que abarcam um genoma de ADN de cadeia simples linear de ~4,6 kb. Partículas individuais empacotam apenas uma cadeia de molécula de ADN, mas esta pode ser a cadeia mais ou menos. As partículas contendo qualquer das cadeias são infecciosas e a replicação ocorre por conversão da cadeia simples infectante parental numa forma de cadeia dupla, e subsequente amplificação, a partir da qual as cadeias simples de descendência são deslocadas e empacotadas dentro de cápsides. As cópias de cadeia dupla ou simples dos genomas de AAV (por vezes designadas por "ADN proviral" ou "provírus") podem ser inseridas em plasmídeos ou fagos bacterianos e transfectadas em células infectadas por adenovírus.

A título de ilustração, o genoma linear do serotipo AAV2 é terminado em cada extremidade por uma sequência de repetição terminal invertida (ITR). Entre as ITR estão três promotores de transcrição p5, p 19 e p40 que são utilizados para expressar os

genes *rep* e *cap* (Laughlin *et al.*, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5567-5571). As sequências de ITR são requeridas em *cis* e são suficientes para proporcionar uma origem de replicação funcional, integração no genoma celular e excisão e resgate eficientes de cromossomas ou plasmídeos recombinantes da célula hospedeira. Os produtos génicos de *rep* e *cap* proporcionam funções para replicação e encapsidação de genoma viral, respectivamente, e é suficiente que estejam presentes em *trans*.

O gene *rep* é expresso a partir de dois promotores, p5 e p19, e produz quatro proteínas designadas Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40. Apenas Rep78 e Rep68 são requeridos para replicação de ADN de cadeia dupla de AAV, mas Rep52 e Rep40 parecem ser necessários para acumulação de ADN de cadeia simples de descendência (Chejanovsky *et al.*, *Virology* 173:120, 1989). Rep68 e Rep78 ligam-se especificamente à conformação de gancho da ITR de AAV e possuem várias actividades enzimáticas requeridas para resolução da replicação nos terminais de AAV. A Rep78 e Rep68, também exibem actividades reguladoras pleiotrópicas, incluindo regulação positiva e negativa de genes de AAV e expressão a partir de alguns promotores heterólogos, assim como efeitos inibidores no crescimento celular. O gene *cap* codifica as proteínas de cápside VP1, VP2 e VP3. Estas proteínas partilham uma sequência de sobreposição comum, mas VP1 e VP2 contêm sequências amino terminais adicionais transcritas a partir do promotor p40, por utilização de codões de iniciação alternativos. Todas as três proteínas são requeridas para produção efectiva da cápside.

Os genomas de AAV têm sido introduzidos em plasmídeos bacterianos por processos, tais como colocação de cauda de GC (Samulski *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2077-

2081), adição de ligantes sintéticos contendo sítios de clivagem de endonuclease de restrição (Laughlin *et al.*, 1983, *Gene*, 23:65-73) ou por ligação directa de extremidades rombas (Senapathy & Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666). A transfecção desses plasmídeos recombinantes de AAV para as células de mamífero com um vírus auxiliar apropriado resulta em resgate e excisão do genoma de AAV isento de qualquer sequência plasmídica, replicação do genoma resgatado e produção de partículas infecciosas de AAV de descendência.

Os vectores de AAV recombinante compreendendo um polinucleótido heterólogo de interesse terapêutico podem ser construídos pela substituição de porções da sequência codificante de AAV em plasmídeos bacterianos com o polinucleótido heterólogo. Os princípios gerais da construção de vector de rAAV também estão revistos em qualquer outra parte. Ver, *e. g.*, Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 3:533-539; e Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbiol. and Immunol.*, 158:97-129). As ITR de AAV são, em geral, retidas, dado que o empacotamento do vector requer que estejam presentes *em cis*. Contudo, outros elementos do genoma de AAV, em particular um ou mais dos genes de empacotamento, podem ser omitidos. O plasmídeo vector pode ser empacotado numa partícula de AAV proporcionando os genes de empacotamento omitidos *em trans*, por meio de uma fonte alternativa.

Numa abordagem, a sequência flanqueada por ITR de AAV (a sequência de vector de rAAV) e os genes de empacotamento de AAV a serem proporcionados *em trans* são introduzidos na célula hospedeira em plasmídeos bacterianos separados. Os exemplos desta abordagem são descritos em 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); e Lebkowski *et al.*, 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski *et al.* (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828) descreveram um plasmídeo de empacotamento denominado pAAV/Ad, o qual consiste nas regiões codificantes de Rep e Cap incluídas pelas ITR de adenovírus. Células epiteliais de vias respiratórias humanas de um doente de fibrose cística foram transduzidas com um vector de AAV, preparado utilizando o plasmídeo de empacotamento de pAAV/Ad e um plasmídeo compreendendo o gene marcador selectivo neo, expresso via o promotor p5 de AAV (Flotte *et al.*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349, 1992).

Uma segunda abordagem é proporcionar a sequência de vector, ou os genes de empacotamento de AAV, na forma de um plasmídeo episomal numa célula de mamífero utilizada para replicação de AAV. Por exemplo, a Patente U.S. 5173414 descreve uma linha celular na qual a sequência de vector está presente como um plasmídeo episomal de cópia elevada. As linhas celulares podem ser transduzidas com as funções *rep* e *cap* de AAV de complementação *em trans*, para a produção de preparações de vector de AAV. Esta abordagem não é ideal, porque o número de cópia por célula não pode ser rigorosamente controlado e é muito provável que o ADN episomal sofra rearranjo, conduzindo à produção de subprodutos de vector.

Uma terceira abordagem é proporcionar a sequência de vector, ou os genes de empacotamento de AAV, ou ambos, integrados de um modo estável no genoma da célula de mamífero utilizada para replicação.

Uma técnica exemplificativa é delineada no pedido de patente internacional WO 95/13365 (Targeted Genetics Corporation and Johns Hopkins University) e correspondente Patente U.S. Nº 5658776 (de Flotte *et al.*). Este exemplo utiliza uma célula de mamífero com, pelo menos, uma cópia intacta de um vector de rAAV integrado de um modo estável, em que o vector compreende uma ITR de AAV e um promotor de transcrição ligado, de um modo operativo, a um polinucleótido alvo, mas em que a expressão de *rep* é limitante. Num caso preferido, um plasmídeo de empacotamento de AAV compreendendo o gene *rep* ligado, de um modo operativo, a um AAV heterólogo é introduzido na célula e, depois, a célula é incubada sob condições que permitem a replicação e empacotamento da sequência de vector de AAV em partículas.

Uma segunda técnica exemplificativa é delineada no pedido de patente WO 95/13392 (Trempe *et al.*). Este exemplo utiliza uma linha celular de mamífero estável com um gene *rep* de AAV ligado, de um modo operativo, a um promotor heterólogo, de modo a ser capaz de expressar proteína Rep funcional. Em diversos casos preferidos, o gene *cap* de AAV pode ser igualmente proporcionado de um modo estável, ou pode ser introduzido de um modo transiente (e. g., num plasmídeo). Um vector de AAV recombinante também pode ser introduzido de um modo estável ou de um modo transiente.

Outra técnica exemplificativa é delineada no pedido de patente WO 96/17947 (de Targeted Genetics Corporation. J. Allen). Este exemplo utiliza uma célula de mamífero que compreende um gene *cap* de AAV integrado de um modo estável e um gene *rep* de AAV integrado de um modo estável ligado, de um modo operativo, a um promotor heterólogo e indutível por vírus

auxiliar. Em diversos casos preferidos, um plasmídeo compreendendo a sequência de vector também é introduzido nas células (de um modo estável ou de um modo transiente). O resgate das partículas de vector de AAV é, depois, iniciado por introdução do vírus auxiliar.

Estes diversos exemplos abordam a questão de proporcionar AAV a título suficientemente elevado, minimizando a recombinação entre vector e componentes de empacotamento, e reduzindo ou evitando as potenciais dificuldades associadas à expressão do gene *rep* de AAV na linha celular de mamífero (dado que as proteínas Rep podem, não apenas limitar a sua própria expressão, mas também podem afectar o metabolismo celular). Contudo, o empacotamento de um vector de AAV em partículas virais baseia-se, ainda, na presença de um vírus auxiliar adequado para AAV ou na provisão de funções de vírus auxiliar. Os vírus auxiliares capazes de suportarem a replicação de AAV são exemplificados por adenovírus, mas incluem outros vírus, tais como vírus herpes e pox. A presença de quantidades significativas de vírus auxiliar infeccioso numa preparação de vectores de AAV é problemática, na medida em que a preparação se destina à utilização na administração a humanos. Mesmo a presença de componentes de vírus auxiliar não replicativos pode causar uma reacção imunológica inaceitável no indivíduo tratado.

Os potenciais problemas deduzidos por antigénio de vírus auxiliar foram ilustrados em vários estudos recentes. Bymes *et al.* (*Neuroscience* 66:1015, 1995) injectaram um adenovírus tipo 5 não replicante humano, com a região de E1 delecionada, no cérebro de ratos consanguíneos. Foi observada uma resposta de inflamação que foi atribuída às partículas administradas e não à expressão de novas proteínas virais devido a infecção viral das

células. A presença do vírus foi associada à expressão aumentada de MHC de Classe I e uma forte infiltração de macrófagos e células T. McCoy *et al.* (*Human Gene Therapy* 6:1553, 1995) instilaram os pulmões de murganhos com adenovírus intacto, adenovírus com genomas incompletos ou adenovírus inactivados com luz ultravioleta. Todos induziram inflamação pulmonar e o número de células inflamatórias no tecido pulmonar foi quantitativamente semelhante para todas as três formas do vírus. Experiências comparativas utilizando construções de adenovírus em murganhos normais e imunodeficientes realizadas por Barr *et al.* (*Gene Therapy* 2:151, 1995) indicam que a resposta imunitária anti-adenovírus é principalmente mediada por célula T e dá origem a uma resposta de memória que afecta doses subsequentes.

Consequentemente, no desenvolvimento de vectores de AAV recombinante, tal como aqueles para utilização em terapia génica, há uma necessidade para estratégias que minimizem a quantidade de vírus auxiliar, assim como proteínas de vírus auxiliares e proteínas celulares, presente na preparação final alcançando-se, ao mesmo tempo, ainda um elevado título de AAV, para que os métodos possam ser eficazmente empregues numa escala que seja adequada para a aplicação prática de técnicas de terapia génica.

Dado que elevados títulos de preparações de vector de rAAV são particularmente úteis, mas a produção de elevados títulos de rAAV, particularmente em processos de grande escala, pode conduzir à produção de quantidades significativas de vírus auxiliar contaminante (e. g., adenovírus ou "Ad"), proteínas de vírus auxiliares (e. g., proteínas Ad) e/ou proteínas celulares, tornou-se especialmente importante conceber métodos escaláveis

para a produção de rAAV que possam ser utilizados para a produção de preparações de elevado título que sejam substancialmente isentas de vírus contaminante e/ou proteínas virais ou celulares. A presente divulgação proporciona métodos para alcançar estes objectivos concorrentes e demonstra que essas técnicas podem ser empregues para a produção em grande escala de preparações de vector de AAV recombinante.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta divulgação proporciona métodos e materiais para a produção de preparações de elevado título de vírus adeno-associado (AAV) que são substancialmente isentas de vírus auxiliares, proteínas de vírus auxiliares e proteínas celulares e outros componentes.

Os casos da divulgação incluem mas não estão limitados aos seguintes:

Um método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV), compreendendo as etapas de: a) proporcionar uma célula produtora de AAV que compreende: (i) um ou mais genes de empacotamento de AAV, em que cada gene de empacotamento de AAV referido codifica uma proteína de replicação ou encapsidação de AAV; (ii) um pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não AAV heterólogo flanqueado por, pelo menos, uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV; e (iii) um vírus auxiliar para AAV; b) incubação da célula produtora proporcionada na etapa a) sob condições que são permissivas para replicação de AAV; c) lise da célula

produtora após a incubação da etapa b) para produzir um lisado de célula produtora de AAV; e d) submeter o lisado de célula produtora de AAV da etapa c) a cromatografia numa pluralidade de resinas de permuta iónica compreendendo, pelo menos, uma resina de permuta aniónica carregada positivamente e, pelo menos, uma resina de permuta catiónica carregada negativamente, para produzir uma população purificada de partículas de vector de rAAV, ou submeter o lisado de célula produtora de AAV da etapa c) a cromatografia numa resina de permuta aniónica, seguida de caudal tangencial

Um método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com o método anterior, em que o referido vírus auxiliar é um adenovírus, ou um vírus auxiliar sensível à temperatura e a referida etapa de incubação da célula produtora é conduzida a uma temperatura que é permissiva para replicação de AAV mas não permissiva para replicação do vírus auxiliar sensível à temperatura.

Um método de produção de uma população de partículas de rAAV, em que a incubação da célula produtora é conduzida num recipiente seleccionado do grupo consistindo num frasco de cultura de tecidos, um frasco rotativo, um frasco *spinner*, um tanque reactor, um fermentador e um biorreactor, opcionalmente utilizando um microtransportador e, de um modo preferido, utilizando uma linha celular de mamífero adaptada a suspensão.

Um método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV), compreendendo as etapas de: a) proporcionar uma célula produtora de AAV que compreende: (i) um ou mais genes de empacotamento de AAV, em que

cada gene de empacotamento de AAV referido codifica uma proteína de replicação ou encapsidação de AAV; (ii) um pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não AAV heterólogo flanqueado por, pelo menos, uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV; e (iii) um vírus auxiliar para AAV ou uma sequência polinucleotídica do referido vírus auxiliar que codifica, pelo menos, uma função de vírus auxiliar; b) submeter a célula produtora proporcionada na etapa a) a um stress subletal; e c) incubar a célula produtora submetida a stress da etapa b) sob condições que são permissivas para replicação de AAV. As formas possíveis de stress subletal podem ser seleccionadas mas não estão limitadas às no grupo consistindo num stress nutricional, um stress osmótico, um stress de pH, um stress de temperatura, um stress aeróbico, um stress mecânico, um stress de radiação e um stress tóxico. Um exemplo não limitativo pelo que o stress nutricional é imposto é pelo cultura das células produtoras num meio que é deficiente num ou mais aminoácidos. Ilustrações adicionais são proporcionadas abaixo.

Um método de produção de uma população de partículas de rAAV, em que a referida população purificada de partículas de vector de rAAV é substancialmente isenta de AAV competente para replicação e de vírus auxiliar e proteínas celulares.

Um método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV), compreendendo as etapas de: a) proporcionar uma célula produtora de AAV que compreende: (i) um ou mais genes de empacotamento de AAV, em que cada gene de empacotamento de AAV referido codifica uma proteína de replicação ou encapsidação de AAV; (ii) um pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não AAV

heterólogo flanqueado por, pelo menos, uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV; e (iii) um vírus auxiliar para AAV; b) incubação da célula produtora proporcionada na etapa a) sob condições que são permissivas para replicação de AAV e que compreendem a indução de um stress subletal na célula produtora de AAV; c) lise da célula produtora após a incubação da etapa b) para produzir um lisado de célula produtora de AAV; e d) purificação do lisado de célula produtora de AAV para produzir uma população de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV). Os métodos de purificação adequados incluem os descritos em qualquer outra parte nesta divulgação. Um processo de purificação exemplificativo compreende submeter o lisado de célula produtora de AAV da etapa c) a cromatografia em, pelo menos, uma resina cromatográfica seleccionada do grupo consistindo numa resina de permuta aniónica carregada positivamente e uma resina de permuta catiónica carregada negativamente, para produzir uma população purificada de partículas de vector de rAAV (os métodos preferidos incluem permuta aniónica, seguida de permuta catiónica ou filtração de caudal tangencial (TFF)). Os processos cromatográficos ilustrativos, incluindo cromatografia de permuta iónica e purificação cromatográfica em sulfato de heparina, são proporcionados abaixo a título exemplificativo.

Uma célula hospedeira para produção de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) a elevada eficiência, compreendendo: a) um ou mais genes de empacotamento de AAV, em que cada gene de empacotamento de AAV referido codifica uma proteína de replicação ou encapsidação de AAV; b) um polinucleótido heterólogo introduzido na referida célula hospedeira utilizando um pro-vector de rAAV, em que o pro-vector de rAAV compreende o polinucleótido heterólogo flanqueado por,

pelo menos, uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV e é deficiente no(s) referido(s) gene(s) de empacotamento de AAV; c) um vírus auxiliar, tal como um vírus auxiliar sensível à temperatura (tsHV) para AAV, em que o referido tsHV é sensível à temperatura para auto-replicação.

Uma população de partículas de rAAV, produzida de acordo com qualquer dos métodos de produção desta divulgação. De um modo preferido, a população de partículas contém não mais de cerca de uma partícula de adenovírus infecciosa por mil partículas de rAAV infecciosas, de um modo preferido menos de uma por 10^6 rAAV, de um modo ainda mais preferido menos do que cerca de uma em 10^9 .

Também são proporcionadas técnicas de ensaio de alta capacidade que podem ser utilizadas, por exemplo, na titulação das preparações de vírus, assim como no rastreio de agentes que afectam a replicação viral.

Agora, com base na divulgação aqui contida, a presente invenção proporciona um método de produção de uma população partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV), compreendendo as etapas de:

(a) incubação de uma célula produtora de AAV sob condições que são permissivas para replicação de AAV e que compreendem a indução de um stress subletal na célula produtora de AAV, de modo a melhorar o nível de produção de AAV, em que a célula produtora de AAV é uma célula de mamífero e em que a referida célula compreende:

- (i) um ou mais genes de empacotamento de AAV, em que cada gene de empacotamento de AAV referido codifica uma proteína de replicação ou encapsidação de AAV;
 - (ii) um pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não AAV heterólogo flanqueado por, pelo menos, uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV; e
 - (iii) um vírus auxiliar para AAV,
- (b) lise da célula produtora após a incubação da etapa a) para produzir um lisado de célula produtora de AAV; e
- (c) purificação do lisado de célula produtora de AAV para produzir uma população de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV),

em que o stress subletal é seleccionado de:

(I) um stress nutricional imposto por um ou mais do seguinte:

- (i) cultura da célula produtora num meio que é deficiente em um ou mais aminoácidos, opcionalmente ácido aspártico ou ácido glutâmico;
 - (ii) cultura da célula produtora num meio que contém menos de 10 $\mu\text{mol/L}$ de ácido aspártico;
 - (iii) cultura da célula produtora num meio que contém menos de 2 $\mu\text{mol/L}$ de ácido glutâmico; ou
 - (iv) cultura da célula produtora num meio que é deficiente para soro;
- ou

(II) um stress de temperatura imposto pelo cultura da célula produtora, durante 3-6 dias, a:

(i) uma temperatura inferior à temperatura de crescimento óptima da célula produtora; ou

(ii) uma temperatura superior à temperatura de crescimento óptima da célula produtora;

ou

(III) um stress osmótico imposto por:

(i) cultura da célula produtora num meio hiposmótico; ou

(ii) cultura da célula produtora num meio hiperosmótico;

ou

(IV) um stress de pH, em que o stress de pH compreende submeter a célula produtora a um pH acima de pH 7,2 continuamente durante a cultura;

ou

(V) um stress tóxico, em que o stress tóxico compreende a exposição da célula produtora a um agente genotóxico, seleccionado de um carcinogénio químico, radiação, UV, um inibidor metabólico da síntese de ADN e um fármaco que afecta as topoisomerasas.

Estas e outras formas de realização da invenção são delineadas na descrição que se segue.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma reprodução de meiotom de uma análise de Southern para produção de vector de rAAV, utilizando uma sonda para um gene terapêutico de CF modelo contido no vector. A banda proeminente a 1,4 kb indica presença de rAAV na preparação. A função de auxiliar foi proporcionada pelo adenovírus subtipo 5 (Ad5) ou pela estirpe ts 149 de adenovírus sensível à temperatura.

A Figura 2 é uma reprodução de meiotom de uma análise de transferência de *slot* para produção de vector de rAAV, para quantificação do nível de rAAV presente em cada preparação. Quando a função de auxiliar é proporcionada por ts149, a quantidade de rAAV produzida sob condições de cultura padrão é vários log abaixo da produzida na presença de Ad5.

A Figura 3 é uma reprodução de meiotom de uma análise de Southern para rAAV, indicando que o aumento do nível de ts149 não melhora o nível de produção de rAAV.

A Figura 4 é um gráfico de barras indicando um *aumento* dramático na quantidade de rAAV produzido na presença de ts149 (barras a sombreado), se os períodos de cultura forem prolongados para além de 5 dias. Tal está em contraste marcado com a *diminuição* substancial em rAAV que ocorre para além do dia 5, quando adenovírus não sensível à temperatura é utilizado para proporcionar a função de auxiliar (barras a cheio).

A Figura 5 é um gráfico de linhas mostrando a densidade celular viável (VCD) de células HeLa S3 cultivadas em cultura de suspensão, a 37 °C (círculos) ou 32 °C (quadrados).

A Figura 6 é um gráfico de linhas mostrando o efeito da filtração de caudal tangencial a duas taxas diferentes em células HeLa S3 cultivadas em cultura de suspensão.

A Figura 7 é um gráfico de barras mostrando a produção de ts149 detectada em células HeLa S3 infectadas cultivadas, durante 3-7 dias, em suspensão, à temperatura permissiva de 32 °C, comparada com o nível detectado no dia 7 após microfluidização (MF).

A Figura 8 é um gráfico de combinação mostrando a purificação de ts149 por cromatografia de permuta aniónica em matriz de PI, eluída com um gradiente linear de NaCl a 900-1300 mcq, a pH 8,0.

A Figura 9 é um gráfico de combinação mostrando a purificação de Adenovírus em matriz de permuta aniónica de PI, eluída com um gradiente de NaCl a 800-1300 meq, a pH 8,0. Barras: Actividade viral medida num ensaio de infecciosidade; Traço cheio: A₂₈₀ (uma medida de proteína total); Tracejado: condutividade de tampão (ms).

A Figura 10 é um gráfico de combinação mostrando a separação de Adenovírus e AAV recombinante. O painel superior mostra a separação em matriz de permuta aniónica de PI, eluída com um gradiente de NaCl a 0-1000 meq, a pH 8,0. O painel inferior mostra a subsequente separação de Adenovírus de contaminantes em matriz de permuta catiónica de HS, eluída com um gradiente de NaCl a 0-500 meq, a pH 8,0.

A Figura 11 são dois gráficos de barras, mostrando o efeito dos níveis (FBS) de soro bovino fetal no meio de cultura na produção de rAAV. A deficiência de soro no meio de cultura é um de um número de factores de stress a que as células produtoras podem ser submetidas, de modo a melhorar a produção de partículas virais.

A Figura 12 é uma reprodução de meiotom de uma análise de gel de SDS-poliacrilamida para proteínas de AAV durante etapas de purificação. A preparação de AAV foi submetida a filtração de caudal tangencial após cromatografia numa coluna de permuta aniónica (POROS 50 PI). O gel corado com prata mostra as proteínas de cápside de AAV altamente purificadas, VP1, VP2 e VP3, no material em bruto final.

A Figura 13 é um cromatograma mostrando a concentração de AAV numa coluna de sulfato de heparina. O pico acentuado em absorvência a 280 nm (eixo esquerdo), a cerca de 18 minutos de tempo de eluição, representa a fracção de AAV (após permuta aniónica e filtração de caudal tangencial) como eluída a partir de sulfato de heparina com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M (condutividade em ms mostrada no eixo direito).

DESCRIÇÃO DETALHADA

É um objectivo desta divulgação proporcionar métodos e materiais para a produção de preparações de elevado título de vírus adeno-associado (AAV) que são substancialmente isentas de vírus auxiliar, proteínas de vírus auxiliares e proteínas celulares e outros componentes.

Diversos métodos para a produção e processamento de partículas de AAV em células de mamífero são descritos em detalhe abaixo e ilustrações da utilização dessas técnicas são proporcionadas nos Exemplos seguintes. Os métodos da presente invenção são definidos pelas reivindicações anexas.

A título de introdução, é típico utilizar um hospedeiro ou "célula produtora" para replicação e empacotamento de vector de rAAV. Essa célula produtora (habitualmente, uma célula hospedeira de mamífero), em geral, compreende, ou é modificada para compreender, vários tipos diferentes de componentes para produção de rAAV. O primeiro componente é um genoma de vector viral adeno-associado recombinante (rAAV) (ou "pro-vector de rAAV") que pode ser replicado e empacotado em partículas de vector pela célula de empacotamento hospedeira. O pro-vector de rAAV irá, normalmente, compreender um polinucleótido heterólogo (ou "transgene"), com o qual se deseja que altere geneticamente outra célula no contexto da terapia génica (dado que o empacotamento desse transgene em partículas de vector de rAAV pode ser eficazmente utilizado para distribuir o transgene a uma variedade de células de mamífero). O transgene é, em geral, flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITR) de AAV que compreendem sequências que são reconhecidas durante a excisão, replicação e empacotamento do vector de AAV, assim como durante a integração do vector no genoma de uma célula hospedeira. Um segundo componente é um vírus auxiliar que pode proporcionar funções de auxiliar para replicação de AAV. Embora seja geralmente utilizado o adenovírus, também podem ser utilizados outros vírus auxiliares como é conhecido na técnica. Alternativamente, as funções de vírus auxiliar requeridas podem ser isoladas geneticamente de um vírus auxiliar e os genes codificantes podem ser utilizados para proporcionar funções de vírus auxiliar *in trans*. Os elementos do vector de AAV e o vírus auxiliar (ou funções de vírus auxiliar) podem ser introduzidos na célula hospedeira simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem. Os componentes finais para a produção de AAV a ser proporcionados na célula produtora são os "genes de empacotamento de AAV", tais como os genes *rep* e *cap* de AAV, que

proporcionam proteínas de replicação e encapsidação, respectivamente. Podem ser proporcionadas várias versões diferentes de genes de empacotamento de AAV (incluindo cassetes de rep-cap de tipo selvagem, assim como cassetes de *rep* e/ou *cap* modificadas, nas quais os genes *rep* e/ou *cap* podem ser deixados sob o controlo dos promotores nativos ou ligados de um modo operativo a promotores heterólogos). Esses genes de empacotamento de AAV podem ser introduzidos, de um modo transiente ou de um modo estável, na célula de empacotamento hospedeira, como é conhecido na técnica e descrito em maior detalhe abaixo.

Após cultura das células hospedeiras sob condições que permitem a replicação e encapsidação de AAV, as células e fracções subcelulares podem ser processadas para a produção de preparações de elevado título de vírus adeno-associado (AAV) que são substancialmente isentas de vírus auxiliar, proteínas de vírus auxiliares e proteínas celulares. As descrições detalhadas de técnicas de processamento e protocolos ilustrativos empregando essas técnicas são proporcionadas abaixo.

Definições

Um "vector", como aqui utilizado, refere-se a uma macromolécula ou associação de macromoléculas que compreendem ou se associam com um polinucleótido e que podem ser utilizadas para mediar a distribuição do polinucleótido a uma célula. Os vectores ilustrativos incluem, por exemplo, plasmídeos, vectores virais, lipossomas e outros transportadores de distribuição génica.

"AAV" é uma abreviatura para vírus adeno-associado e pode ser utilizado para referir o próprio vírus ou os seus derivados. O termo abrange todos os subtipos e as formas de ocorrência natural e recombinantes, excepto onde requerido de outro modo. A abreviatura "rAAV" refere-se a vírus adeno-associado recombinante, também referido como um vector de AAV recombinante (ou "vector de rAAV").

Um "vector de rAAV", como aqui utilizado, refere-se a um vector de AAV compreendendo uma sequência polinucleotídica não de origem AAV (*i. e.*, um polinucleótido heterólogo para AAV), tipicamente uma sequência de interesse para a transformação genética de uma célula. Em construções de vector preferidas desta divulgação, o polinucleótido heterólogo é flanqueado por, pelo menos uma, de um modo preferido, duas sequências de repetição terminais invertidas (ITR) de AAV. O termo vector de rAAV abrange partículas de vector de rAAV e plasmídeos de vector de rAAV.

Um "vírus de AAV" ou "partícula viral de AAV" refere-se a uma partícula viral composta por, pelo menos, uma proteína de cápside de AAV (de um modo preferido, pela totalidade das proteínas de cápside de um AAV de tipo selvagem) e um polinucleótido encapsidado. Se a partícula compreender um polinucleótido heterólogo (*i. e.*, um polinucleótido diferente de um genoma de AAV de tipo selvagem, tal como um transgene a ser distribuído a uma célula de mamífero), é tipicamente referida como uma "partícula de vector de rAAV" ou, simplesmente, um "vector de rAAV".

"Empacotamento" refere-se a uma série de eventos intracelulares que resultam no agrupamento e encapsidação de uma partícula de AAV.

Genes "*rep*" e "*cap*" de AAV refere-se a sequências polinucleotídicas codificando proteínas de replicação e encapsidação de vírus adeno-associado. Foram encontradas em todos serotipos de AAV examinados e são descritas abaixo e na técnica. *Rep* e *cap* de AAV são aqui referidos como "genes de empacotamento" de AAV.

Um "vírus auxiliar" para AAV refere-se a um vírus que permite que o AAV (e. g., AAV de tipo selvagem) seja replicado e empacotado por uma célula de mamífero. É conhecida na técnica uma variedade desses vírus auxiliares para AAV, incluindo adenovírus, vírus do herpes e poxvírus, tal como vaccinia. Os adenovírus abrangem um número de diferentes subgrupos, embora o Adenovírus de tipo 5 do subgrupo C seja mais geralmente utilizado. Numerosos adenovírus de origem humana, não humana de mamífero e aviária são conhecidos e disponíveis a partir de depositários, tal como a ATCC. Os vírus da família herpes incluem, por exemplo, vírus herpes simplex (HSV) e vírus de Epstein-Barr (EBV), assim como citomegalovírus (CMV) e vírus da pseudo-raiva (PRV): que também estão disponíveis a partir de depositários, tal como a ATCC.

O termo "tsHV" refere-se a um vírus auxiliar sensível à temperatura que pode proporcionar funções de auxiliar para replicação e empacotamento de AAV mas é sensível à temperatura em relação à sua própria replicação (*i. e.*, pode replicar-se a uma temperatura "permissiva" mas replica-se a eficiência inferior ou, de um modo preferido, não se replica de todo, a uma

temperatura "não permissiva"). A capacidade do tsHV proporcionar auxílio para replicação de AAV também pode ser sensível à temperatura, mas o tsHV preferido para utilização quando se realiza a presente divulgação incluindo a presente invenção, suporta eficientemente a replicação de AAV a temperaturas a que o AAV pode replicar-se mas que são não permissivas para replicação do tsHV. Os exemplos desse tsHV são descritos abaixo.

Um vírus ou partícula viral "infeccioso" é aquele que compreende um componente polinucleotídico que é capaz da distribuição para uma célula relativamente à qual a espécie viral é trófica. O termo não implica necessariamente qualquer capacidade de replicação do vírus. Os ensaios para a contagem de partículas virais infecciosas são descritos em qualquer outra parte nesta divulgação e na técnica.

Um vírus "competente para replicação" (e. g., um AAV competente para replicação, por vezes abreviado como "RCA") refere-se a um vírus fenotipicamente de tipo selvagem que é infeccioso e também é capaz de ser replicado numa célula infectada (*i. e.*, na presença de um vírus auxiliar ou funções de vírus auxiliar). No caso de AAV, a competência de replicação requer, em geral, a presença de genes de empacotamento de AAV funcionais. Os vectores de rAAV preferidos, como aqui descritos, são incompetentes para replicação em células de mamífero (especialmente em células humanas), em virtude da ausência de um ou mais genes de empacotamento de AAV. De um modo preferido, esses vectores de rAAV são desprovidos de quaisquer sequências génicas de empacotamento de AAV, de modo a minimizar a possibilidade de que os RCA sejam produzidos por recombinação entre genes de empacotamento de AAV e um vector de rAAV de chegada. As preparações de vector de rAAV preferidas, como aqui

descrito, são as que contêm menos, se é que contêm qualquer RCA (de um modo preferido, menos do que cerca de 1 RCA por 10^2 partículas de rAAV, de um modo mais preferido, menos do que cerca de 1 RCA por 10^4 partículas de rAAV, de um modo ainda mais preferido, menos do que cerca de 1 RCA por 10^8 partículas de rAAV, de um modo ainda mais preferido, menos do que cerca de 1 RCA por 10^{12} partículas de rAAV, de um modo muito preferido, sem RCA).

O termo "polinucleótido" refere-se a uma forma polimérica de nucleótidos de qualquer comprimento, incluindo desoxirribonucleótidos ou ribonucleótidos ou os seus análogos. Um polinucleótido pode compreender nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e análogos nucleotídicos, e pode estar interrompido por componentes não nucleotídicos. Se presentes, as modificações à estrutura nucleotídica podem ser conferidas antes ou após agrupamento do polímero. O termo polinucleótido, como aqui utilizado, refere-se, com o mesmo significado, a moléculas de cadeia dupla e simples. Salvo especificado ou requerido em contrário, qualquer caso da divulgação aqui descrita que seja um polinucleótido abrange a forma de cadeia dupla e cada das duas formas de cadeia simples complementares conhecidas ou previstas como constituindo a forma de cadeia dupla.

Um "gene" refere-se a um polinucleótido contendo, pelo menos, uma fase de leitura aberta que, após ser transcrita e traduzida, é capaz de codificar uma proteína particular.

"Recombinante", como aplicado a um polinucleótido, significa que o polinucleótido é o produto de diversas combinações de etapas de clonagem, restrição ou ligação e outros

processos que resultam numa construção que é distinta de um polinucleótido encontrado na natureza. Um vírus recombinante é uma partícula viral compreendendo um polinucleótido recombinante. Os termos incluem, respectivamente, replicados da construção polinucleotídica original e descendência da construção de vírus original.

Um "elemento de controlo" ou "sequência de controlo" é uma sequência nucleotídica envolvida numa interacção de moléculas que contribui para a regulação funcional de um polinucleótido, incluindo replicação, duplicação, transcrição, excisão, tradução ou degradação do polinucleótido. A regulação pode afectar a frequência, velocidade ou especificidade do processo e pode ser de melhoramento ou inibidora em natureza. Os elementos de controlo conhecidos na técnica incluem, por exemplo, sequências reguladoras transcricionais, tais como promotores e estimuladores. Um promotor é uma região de ADN capaz, sob determinadas condições, de ligação de ARN polimerase e iniciação de transcrição de uma região codificante, habitualmente localizada a jusante (na direcção 3') do promotor.

"Ligado operativamente" ou "ligado de um modo operativo" refere-se a uma justaposição de elementos genéticos, em que os elementos estão numa relação permitindo-lhes operar do modo esperado. Por exemplo, um promotor está ligado operativamente a uma região codificante se o promotor auxiliar a iniciar a transcrição da sequência codificante. Desde que esta relação funcional seja mantida, podem existir resíduos intermédios entre o promotor e região codificante.

Um "vector de expressão" é um vector compreendendo uma região que codifica um polipéptido de interesse e é utilizado

para afectar a expressão da proteína numa célula alvo pretendida. Um vector de expressão também compreende elementos de controlo ligados operativamente à região codificante para facilitar a expressão da proteína no alvo. A combinação de elementos de controlo e um gene ou genes a que estão ligados de um modo operativo para expressão é, por vezes, designada por uma "cassete de expressão", das quais se conhece um grande número e estão disponíveis na técnica ou podem ser facilmente construídas a partir de componentes que estão disponíveis na técnica.

"Heterólogo" significa derivado de uma entidade genotipicamente distinta da do resto da entidade à qual está a ser comparada. Por exemplo, um polinucleótido introduzido por técnicas de engenharia genética num plasmídeo ou vector derivado de uma espécie diferente é um polinucleótido heterólogo. Um promotor removido da sua sequência codificante nativa e ligado operativamente a uma sequência codificante com a qual não se encontra ligado naturalmente é um promotor heterólogo.

"Alteração genética" refere-se a um processo em que um elemento genético é introduzido numa célula que não por mitose ou meiose. O elemento pode ser heterólogo à célula, ou pode ser uma cópia adicional ou versão melhorada de um elemento já presente na célula. A alteração genética pode ser efectuada, por exemplo, pela transfecção de uma célula com um plasmídeo recombinante ou outro polinucleótido através de qualquer processo conhecido na técnica, tais como electroporação, precipitação por fosfato de cálcio ou colocação em contacto com um complexo de polinucleótido-lipossoma. A alteração genética também pode ser efectuada, por exemplo, por transdução ou infecção com um vírus de ADN ou ARN ou vector viral. De um modo preferido, o elemento genético é introduzido num cromossoma ou

minicromossoma na célula; mas qualquer alteração que mude o fenótipo e/ou genótipo da célula e sua descendência está incluída neste termo.

Diz-se que uma célula é alterada, transduzida ou transformada "de um modo estável" com uma sequência genética, se a sequência estiver disponível para desempenhar a sua função durante cultura prolongada da célula *in vitro*. Em exemplos preferidos, essa célula é alterada "de um modo herdável", na medida em que é introduzida uma alteração genética que também é herdável pela descendência da célula alterada.

Os termos "polipéptido" "péptido" e "proteína" são aqui utilizados com o mesmo significado para referir polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. Os termos também abrangem um polímero de aminoácido que tenha sido modificado: por exemplo, formação de ligação dissulfureto, glicosilação, lipidação ou conjugação com um componente de marcação.

Polipéptidos, tais como "CFTR", "p53", "E I A" e semelhantes, quando discutidos no contexto da terapia génica e composições para esse fim, referem-se ao respectivo polipéptido intacto, ou qualquer seu fragmento ou derivado geneticamente manipulado, o qual retém a função bioquímica desejada da proteína intacta. De modo semelhante, as referências a genes de CFTR, p53, E1A e outros desses genes, para utilização em terapia génica (tipicamente referidos como "transgenes" para serem distribuídos a uma célula receptora), incluem polinucleótidos codificando o polipéptido intacto ou qualquer fragmento ou derivado geneticamente manipulado possuindo a função bioquímica desejada.

Um plasmídeo, vírus ou outra substância "isolada" refere-se a uma preparação da substância desprovida de, pelo menos, alguns dos outros componentes que também podem estar presentes onde a substância ou uma substância semelhante ocorre naturalmente ou é dela inicialmente preparada. Deste modo, por exemplo, uma substância isolada pode ser preparada pela utilização de uma técnica de purificação para enriquecê-la a partir de uma mistura fonte. O enriquecimento pode ser medido num base absoluta, tal como peso por volume de solução, ou pode ser medido em relação a uma segunda substância, potencialmente interferente, presente na mistura fonte. Enriquecimentos crescentes dos casos desta divulgação são crescentemente mais preferidos. Deste modo, por exemplo, um enriquecimento de 2 vezes é preferido, enriquecimento de 10 vezes é mais preferido, enriquecimento de 100 vezes é mais preferido, enriquecimento de 1000 vezes é ainda mais preferido.

Diz-se que uma preparação de AAV é "substancialmente isenta" de vírus auxiliar, se a razão de partículas infecciosas de AAV para partículas infecciosas de vírus auxiliar for, pelo menos, cerca de $10^2:1$; de um modo preferido, pelo menos, cerca de $10^4:1$, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de $10^6:1$; de um modo ainda mais preferido, pelo menos, cerca de $10^8:1$. As preparações também são, de um modo preferido, isentas de quantidades equivalentes de proteínas de vírus auxiliares (*i. e.*, proteínas como estariam presentes como resultado desse nível de vírus auxiliar se as impurezas de partículas de vírus auxiliar notadas acima estivessem presentes na forma dissociada). A contaminação de proteína viral e/ou celular pode, em geral, ser observada como a presença de bandas de coloração de Coomassie em géis de SDS (*e. g.*, o surgimento de bandas que

não as correspondentes às proteínas VP1, VP2 e VP3 de cápside de AAV).

"Eficiência", quando utilizada na descrição de produção, replicação ou empacotamento viral, refere-se a propriedades úteis do método: em particular, à taxa de crescimento e ao número de partículas de vírus produzidas por célula. Produção de "elevada eficiência" indica a produção de, pelo menos, 100 partículas virais por célula: de um modo preferido, pelo menos, cerca de 10000 e, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 100000 partículas por célula, ao longo do curso do período de cultura especificado.

Um "indivíduo" ou "sujeito", tratado de acordo com esta divulgação, refere-se a vertebrados, particularmente membros de uma espécie de mamífero e inclui, mas não está limitado a animais domésticos, animais desportivos e primatas, incluindo humanos.

"Tratamento" de um indivíduo ou uma célula é qualquer tipo de intervenção, numa tentativa para alterar o curso natural do indivíduo ou célula, no momento em que o tratamento é iniciado. Por exemplo, o tratamento de um indivíduo pode ser empreendido para diminuir ou limitar a patologia causada por qualquer estado patológico, incluindo (mas não limitado) uma deficiência genética herdada ou induzida, infecção por um organismo viral, bacteriano ou parasítico, um estado neoplásico ou aplástico ou uma disfunção do sistema imunitário, tais como auto-imunidade ou imunossupressão. O tratamento inclui (mas não está limitado) a administração de uma composição, tal como uma composição farmacêutica, e a administração de células compatíveis que foram tratadas com uma composição. O tratamento pode ser realizado profilacticamente ou terapêuticamente; ou seja, antes ou

subsequente à iniciação de um evento patológico ou contacto com um agente etiológico.

Técnicas gerais

A prática da presente divulgação, incluindo a presente invenção, salvo indicação em contrário, irá utilizar técnicas convencionais de biologia molecular, virologia, cultura de células animais e bioquímica que estão dentro do estado da técnica. Essas técnicas são explicadas totalmente na literatura. Ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edição (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, ed., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *et al.*, ed., 1987); "Current Protocols in Protein Science" (John E Coligan, *et al.* ed. Wiley and Sons, 1995); e "Protein Purification: Principles and Practice" (Robert K. Scopes, Springer-Verlag, 1994).

Seleção e Preparação de Vector de AAV e Genes de Empacotamento de AAV

Um vector de AAV recombinante desta divulgação compreende um polinucleótido heterólogo (*i. e.*, não AAV) de interesse no lugar dos genes *rep* e/ou *cap* de AAV que normalmente constituem a maior parte do genoma de AAV. Contudo, como no genoma de AAV de tipo selvagem, o pro-vector de rAAV é, de um modo preferido, flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITR) de AAV, como notado acima. Variações nas quais uma construção de

rAAV é flanqueada por apenas uma única (tipicamente modificada) ITR também foram descritas na técnica e podem ser utilizadas na presente divulgação, incluindo a presente invenção.

Os vírus adeno-associados de qualquer serotipo são adequados, dado que os diversos serotipos são funcionalmente e estruturalmente relacionados, mesmo ao nível genético (ver, e. g., Blacklow, p. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J.R Pattison, ed. (1988); e Rose, *Comprehensive Virology* 3:1, 1974). Todos os serotipos de AAV aparentemente exibem propriedades de replicação semelhantes, mediadas por genes *rep* homólogos; e todos transportam, em geral, três proteínas de cápside relacionadas, tal como as expressas em AAV2. O grau de parentesco é ainda sugerido por análise de heterocadeia dupla que revela extensa hibridação cruzada entre serotipos ao longo do comprimento do genoma; e a presença de segmentos de auto-hibridação análogos nas terminações que correspondem às ITR. Os padrões de infecciosidade semelhantes também sugerem que as funções de replicação em cada serotipo estão sob controlo regulatório semelhante. Entre os diversos serotipos de AAV, o AAV2 é o mais geralmente utilizado.

Um vector de AAV desta divulgação irá, tipicamente, compreender um polinucleótido que é heterólogo ao AAV. O polinucleótido é tipicamente de interesse, devido a uma capacidade de proporcionar uma função a uma célula alvo no contexto da terapia génica, tais como regulação positiva ou negativa, da expressão de um determinado fenótipo. Esse polinucleótido heterólogo ou "transgene" irá, em geral, ser de comprimento suficiente para proporcionar a função desejada ou sequência codificante. Para encapsidação em partículas de AAV2, o transgene terá, de um modo preferido, menos do que cerca de

5 kb, embora possam ser empregues outros serotipos e/ou modificações para permitir que sequências maiores sejam empacotadas nas partículas virais de AAV.

Onde se deseje a transcrição do polinucleótido heterólogo na célula alvo pretendida, pode estar ligado, de um modo operativo, ao seu próprio ou a um promotor heterólogo, dependendo, por exemplo, do nível e/ou especificidade desejados de transcrição na célula alvo, como é conhecido na técnica. Diversos tipos de promotores e estimuladores são adequados para utilização neste contexto. Os promotores constitutivos proporcionam um nível continuado de transcrição génica e são preferidos quando se deseja que o polinucleótido terapêutico seja expresso numa base continuada. Os promotores indutíveis exibem, em geral, baixa actividade na ausência do indutor e são regulados positivamente na presença do indutor. Podem ser preferidos quando a expressão for desejada apenas em determinados momentos ou em determinadas localizações, ou quando é desejável titular o nível de expressão utilizando um agente de indução. Os promotores e estimuladores também podem ser específicos de tecido: ou seja, exibem a sua actividade apenas em determinados tipos de células, presumivelmente devido aos elementos regulatórios génicos encontrados unicamente nessas células.

São exemplos ilustrativos de promotores o promotor tardio de SV40 do vírus símio 40, o elemento estimulador/promotor poliedro de Baculovírus, timidina cinase de Vírus Herpes Simplex (tk de HSV), o promotor precoce imediato de citomegalovírus (CMV) e diversos promotores retrovirais, incluindo elementos de LTR. Os promotores indutíveis incluem promotores indutíveis de ião de metal pesado (tais como o promotor do vírus do tumor

mamário de murganho (mMTV) ou diversos promotores da hormona do crescimento) e os promotores do fago T7 que são activos na presença de T7 ARN polimerase. A título de ilustração, exemplos de promotores específicos de tecido incluem diversos promotores de surfactina (para expressão no pulmão), promotores de miosina (para expressão no músculo) e promotores de albumina (para expressão no fígado). É conhecida uma grande variedade de outros promotores e está, em geral, disponível na técnica, e as sequências para muitos desses promotores estão disponíveis em bases de dados de sequências, tal como a base de dados GenBank.

Onde a tradução também seja desejada na célula alvo pretendida, o polinucleótido heterólogo também irá, de um modo preferido, compreender elementos de controlo que facilitam a tradução (tal como um sítio de ligação de ribossoma ou "RBS" e um sinal de poliadenilação). Consequentemente, o polinucleótido heterólogo irá, em geral, compreender, pelo menos, uma região codificante ligada operativamente a um promotor adequado e também pode compreender, por exemplo, um estimulador, sítio de ligação de ribossoma e sinal poli-A ligados operativamente. O polinucleótido heterólogo pode compreender uma região codificante ou mais de uma região codificante, sob o controlo do mesmo ou diferentes promotores. A unidade integral, contendo uma combinação de elementos de controlo e região codificante é, frequentemente, referida como uma cassette de expressão.

O polinucleótido heterólogo é integrado por técnicas recombinantes dentro ou, de um modo preferido, no lugar da região codificante genómica de AAV (*i. e.*, no lugar dos genes *rep* e *cap* de AAV), mas é, em geral, flanqueado de cada lado por regiões de repetição terminal invertida (ITR) de AAV. Isto significa que uma ITR surge a montante e a jusante da sequência

codificante, em justaposição directa, de um modo preferido (embora não necessariamente) sem qualquer sequência intermédia de origem de AAV, de modo a reduzir a probabilidade de recombinação que poderá regenerar um genoma de AAV competente para replicação. Evidência recente sugere que uma única ITR pode ser suficiente para efectuar as funções normalmente associadas a configurações compreendendo duas ITR (documento WO 94/13788) e as construções de vector com apenas uma ITR podem, deste modo, ser utilizadas em conjunto com os métodos de empacotamento e produção da presente divulgação, incluindo os métodos da presente invenção.

Os promotores nativos para *rep* são de auto-regulação e podem limitar a quantidade de partículas de AAV produzidas. O gene *rep* também pode estar ligado, de um modo operativo, a um promotor heterólogo, se o *rep* for proporcionado como parte da construção de vector, ou separadamente. Qualquer promotor heterólogo que não seja fortemente regulado negativamente por expressão génica de *rep* é adequado; mas os promotores indutíveis são preferidos, porque a expressão constitutiva do gene *rep* pode ter um impacto negativo na célula hospedeira. Uma grande variedade de promotores indutíveis é conhecida na técnica; incluindo, a título de ilustração, promotores indutíveis de ião de metal pesado (tal como promotores de metalotioneína); promotores indutíveis de hormona esteróide (tais como o promotor de MMTV ou promotores da hormona do crescimento): e promotores, tal como os do fago T.7 que são activos na presença de T7 ARN polimerase. Uma subclasse especialmente preferida de promotores indutíveis são os que são induzidos pelo vírus auxiliar que é utilizado para complementar a replicação e empacotamento do vector de rAAV. Um número de promotores indutíveis de vírus auxiliar também foi descrito, incluindo o promotor do gene

precocemente de adenovírus que é indutível pela proteína E1A de adenovírus: o promotor tardio principal de adenovírus; o promotor de vírus do herpes que é indutível por proteínas de vírus do herpes, tais como VP16 ou ICP4; assim como promotores indutíveis de vaccinia ou poxvírus.

Os métodos para a identificação e teste de promotores indutíveis por vírus auxiliar foram descritos num pedido pendente em co-propriedade, publicado como WO96/17947, pela Targeted Genetics Corporation (Allen et al.). Deste modo, são conhecidos métodos na técnica para determinar se os promotores candidatos são ou não indutíveis por vírus auxiliar e se serão ou não úteis na produção de células de empacotamento de elevada eficiência. Resumidamente, um desses métodos envolve a substituição do promotor p5 do gene *rep* de AAV com o putativo promotor indutível por vírus auxiliar (conhecido na técnica ou identificado utilizando técnicas bem conhecidas, tal como ligação a genes "repórter" sem promotor). Os genes *rep-cap* de AAV (com p5 substituído), de um modo preferido ligados a um marcador seleccionável positivo, tal como um gene de resistência a antibiótico, são, depois, integrados de um modo estável numa célula hospedeira adequada (tais como as células HeLa ou A549 exemplificadas abaixo). As células que são capazes crescer relativamente bem sob condições de selecção (e. g., na presença do antibiótico) são, depois, testadas para a sua capacidade de expressarem os genes *rep* e *cap* após adição de um vírus auxiliar. Como um teste inicial para a expressão de *rep* e/ou *cap*, as células podem ser facilmente rastreadas utilizando imunofluorescência para detectar as proteínas Rep e/ou Cap. A confirmação das capacidades e eficiências de empacotamento pode ser, depois, determinada por testes funcionais para replicação e empacotamento de vectores de rAAV de chegada. Utilizando este

método, um promotor indutível por vírus auxiliar derivado do gene de metalotioneína de murganho foi identificado como uma substituição adequada para o promotor p5 e utilizado para produção de elevados títulos de partículas de rAAV (como descrito no documento WO 96/17947. Targeted Genetics Corporation).

Dados os limites relativos de tamanho de encapsidação de diversos genomas de AAV, a inserção de um polinucleótido heterólogo de grandes dimensões no genoma necessita de remoção de uma porção da sequência de AAV. A remoção de um ou mais genes de AAV é, em todo o caso, desejável, para reduzir a probabilidade de produção de AAV competente para replicação ("RCA"). Consequentemente, as sequências codificantes ou promotoras para *rep*, *cap* ou ambas são, de um modo preferido, removidas, dado que as funções proporcionadas por estes genes podem ser proporcionadas em *trans*.

O vector resultante é referido como sendo "defeituoso" nestas funções. De modo a replicar e empacotar o vector, as funções em falta são complementadas com um gene de empacotamento, ou uma sua pluralidade, que, em conjunto, codificam as funções necessárias para os diversos produtos génicos de *rep* e/ou *cap* em falta. Os genes de empacotamento ou cassetes génicas são, de um modo preferido, não flanqueados pelas ITR de AAV e, de um modo preferido, não partilham qualquer homologia substancial com o genoma de rAAV. Deste modo, para minimizar a recombinação homóloga durante a replicação entre a sequência de vector e genes de empacotamento proporcionados separadamente, é desejável evitar a sobreposição das duas sequências polinucleotídicas. O nível de homologia e correspondente frequência de recombinação aumentam com o

comprimento crescente das sequências homólogas e com o seu nível de identidade partilhada. O nível de homologia que colocará uma preocupação num dado sistema pode ser determinado teoricamente e confirmado experimentalmente, como é conhecido na técnica. Tipicamente, contudo, a recombinação pode ser substancialmente reduzida ou eliminada se a sequência de sobreposição for uma sequência com menos do que cerca de 25 nucleótidos se for, pelo menos, 80% idêntica ao longo do seu comprimento integral, ou sequência com menos do que cerca de 50 nucleótidos se for, pelo menos, 70% idêntica ao longo do seu comprimento integral. Certamente, são preferidos mesmo níveis inferiores de homologia, dado que irão reduzir, ainda, a probabilidade de recombinação. Parece que, mesmo sem qualquer homologia de sobreposição, há alguma frequência residual de produção de RCA. Reduções adicionais na frequência de produção de RCA (e. g., por recombinação não homóloga) podem ser obtidas por "separação" das funções de replicação e encapsidação de AAV, como descrito por Allen *et al.*, no pedido de patente U.S. 08/769728, apresentado em 18 de Dezembro de 1996, publicado internacionalmente como W098/27204 em 25 de Junho de 1998 (Targeted Genetics Corporation)).

A construção de vector de rAAV e as construções de gene de empacotamento complementares podem ser implementadas quando se realiza a presente divulgação, incluindo a invenção, num número de diferentes formas. Partículas virais, plasmídeos e células hospedeiras transformadas de um modo estável podem ser todos utilizados para introduzir essas construções na célula de empacotamento, de um modo transiente ou de um modo estável.

Em determinados casos desta divulgação, e. g., em determinadas formas de realização desta invenção, o vector de

AAV e gene(s) de empacotamento complementar(es), se é que existem, são proporcionados na forma de plasmídeos bacterianos, partículas de AAV ou qualquer sua combinação. Noutros casos e formas de realização, a sequência de vector de AAV, o(s) gene(s) de empacotamento ou ambos, são proporcionados na forma de células eucarióticas geneticamente alteradas (de um modo preferido, alteradas de um modo herdável). O desenvolvimento de células hospedeiras alteradas de um modo herdável para expressarem a sequência de vector de AAV, genes de empacotamento de AAV, ou ambos, proporciona uma fonte estabelecida do material que é expresso a um nível fiável.

Uma variedade de diferentes células alteradas geneticamente pode, deste modo, ser utilizada no contexto desta divulgação, incluindo a invenção. A título de ilustração, uma célula hospedeira de mamífero pode ser utilizada com, pelo menos, uma cópia intacta de um vector de rAAV integrado de um modo estável. Um plasmídeo de empacotamento de AAV compreendendo, pelo menos, um gene *rep* de AAV ligado de um modo operativo a um promotor pode ser utilizado para proporcionar funções de replicação (como descrito num pedido em co-propriedade de Flotte *et al.*, agora Patente U.S. 5658776). Alternativamente, uma linha celular de mamífero estável, com um gene *rep* de AAV ligado de um modo operativo a um promotor, pode ser utilizada para proporcionar funções de replicação (ver, *e. g.*, Trempe *et al.*, (documento USSN 08/362608, 9 de Janeiro de 1995, documento WO95/13392, 18 de Maio de 1995); Burstein *et al.*, (documento USSN 08/770122, apresentado em 18 de Dezembro de 1996, documento WO98/23018, 25 de Junho de 1998); e Johnson *et al.*, (documento USSN 08/254358, apresentado em 6 de Junho de 1994, concedido com o Nº U.S. 5656785, 19 de Agosto de 1997)). O gene *cap* de AAV, proporcionando as proteínas de encapsidação, como descrito

acima, pode ser proporcionado juntamente com um gene *rep* de AAV ou separadamente (ver, e. g., os pedidos e patentes acima referenciados, assim como Allen *et al.*, documento USSN 08/769728, apresentado em 18 de Dezembro de 1996, documento W098/27204 em 25 de Junho de 1998 (Targeted Genetics Corporation)). São possíveis outras combinações e estão incluídas no âmbito desta divulgação, incluindo a invenção.

Introdução de Material Genético nas Células

Como é descrito na técnica e ilustrado aqui e nas referências citadas acima, o material genético pode ser introduzido nas células (tal como células "produtoras" de mamífero para a produção de AAV) utilizando qualquer de uma variedade de meios para transformar ou transduzir essas células. A título de ilustração, essas técnicas incluem, por exemplo, transfecção com plasmídeos bacterianos, infecção com vectores virais, electroporação, precipitação por fosfato de cálcio e introdução utilizando qualquer de uma variedade de composições à base de lípido (um processo frequentemente referido como "lipofecção"). Os métodos e composições para a realização destas técnicas foram descritos na matéria e estão largamente disponíveis.

A selecção de células adequadamente alteradas pode ser conduzida por qualquer técnica na matéria. Por exemplo, as sequências polinucleotídicas utilizadas para alterar a célula podem ser introduzidas simultaneamente ou ligadas, de um modo operativo, a um ou mais marcadores detectáveis ou seleccionáveis, como é conhecido na técnica. A título de ilustração, pode utilizar-se um gene de resistência a fármacos

como um marcador seleccionável. As células resistentes aos fármacos podem ser, depois, repicadas e cultivadas e, depois, testadas para expressão da sequência desejada - *i. e.*, um produto génico de empacotamento ou um produto do polinucleótido heterólogo, conforme apropriado. O teste para aquisição, localização e/ou manutenção de um polinucleótido introduzido pode ser realizado utilizando técnicas baseadas na hibridação de ADN (tais como transferência de Southern e outros processos como conhecidos na técnica). O teste para expressão pode ser facilmente realizado por análise de Northern de ARN extraído de células geneticamente alteradas, ou por imunofluorescência indirecta para o correspondente produto génico. O teste e confirmação das capacidades e eficiências de empacotamento podem ser obtidas pela introdução na célula dos restantes componentes funcionais de AAV e um vírus auxiliar, para testar para produção de partículas de AAV. Onde uma célula é alterada de um modo herdável com uma pluralidade de construções polinucleotídicas é, em geral, mais conveniente (embora não essencial) introduzi-las na célula separadamente e validar cada etapa ponto por ponto. As referências descrevendo essas técnicas incluem as aqui citadas.

Seleção e Preparação de Vírus Auxiliar

Como discutido acima, o AAV é um parvovírus que é defeituoso para auto-replicação e deve, em geral, apoiar-se num vírus auxiliar para proporcionar determinadas funções replicativas. Foi identificado um número desses vírus auxiliares, incluindo adenovírus, vírus do herpes (incluindo mas não limitado a HSV1, citomegalovírus e HHV-6) e poxvírus (particularmente vaccinia). Qualquer desses vírus pode ser

utilizado quando se realiza esta divulgação, incluindo a invenção.

Frequentemente, o vírus auxiliar será um adenovírus de um tipo e subgrupo que pode infectar a célula hospedeira pretendida. É geralmente utilizado o adenovírus humano do subgrupo C, particularmente serotipos 1, 2, 4, 6 e 7. É, em geral, preferido o serotipo 5.

As características e padrões de crescimento de adenovírus são conhecidos na técnica. O leitor pode, por exemplo, recorrer a Horowitz, "Adenoviridae and their replication", p. 771-816, em "Fundamental Virology", Fields *et al.*, ed. O genoma de adenovírus empacotado é uma molécula de ADN linear, ligada pelas ITR de adenovírus às terminações esquerda e direita, através de um complexo de proteína terminal para formar um círculo. As regiões de controlo e codificação para os componentes precoces, intermediário e tardio sobrepõem-se no genoma. Os genes da região precoce estão implicados na replicação do genoma de adenovírus e estão agrupados dependendo da sua localização nas regiões E1, E2, E3, e E4.

Embora não essencial, em princípio é desejável que a estirpe de vírus auxiliar seja defeituosa para replicação no indivíduo que, em última análise, recebe a terapia genética. Deste modo, qualquer vírus auxiliar residual presente numa preparação de rAAV será incompetente para replicação. Os adenovírus a partir dos quais a região E 1A ou a E 1A e a E3 foi removida são não infecciosos para a maioria das células humanas. Podem ser replicados numa linha celular permissiva (e. g., a linha celular 293 humana) que é capaz de complementação da actividade em falta. As regiões de adenovírus que parecem estar

associadas à função de auxiliar, assim como as regiões que não estão, foram identificadas e descritas na técnica (ver, e. g., P. Colosi *et al.*, documento W097/17458 e referências aí citadas).

Utilização de um Vírus Auxiliar Condicionalmente Sensível

Como aqui descrito, um vírus auxiliar "condicionalmente sensível" também pode ser empregue para proporcionar actividade de vírus auxiliar. Essa estirpe de vírus auxiliar deve, minimamente, ter a propriedade de ser capaz de suportar replicação de AAV numa célula hospedeira sob, pelo menos, um conjunto de condições onde ela própria não sofra replicação genómica eficiente. Onde a actividade de vírus auxiliar é proporcionada como partículas de vírus intacto, também é, em geral, necessário que o vírus seja capaz de replicação numa célula hospedeira sob um segundo conjunto de condições. O primeiro conjunto de condições irá diferir do segundo conjunto de condições numa característica facilmente controlável, tal como a presença ou ausência de um cofactor requerido (tal como um catião), na presença ou ausência de um fármaco inibidor ou uma mudança numa condição ambiental, tal como temperatura. Muito convenientemente, a diferença entre as duas condições é a temperatura e esse vírus condicionalmente sensível é, deste modo, referido como um vírus auxiliar sensível à temperatura (tsHV).

Para os efeitos desta divulgação, um vírus auxiliar "sensível à temperatura" ou "ts" é aquele que é capaz de replicação do seu material genético numa célula eucariótica, a uma determinada gama de temperaturas (a gama de temperatura

"permissiva"), tipicamente cerca de 15°-35 °C e, de um modo preferido, cerca de 20-32 °C. Contudo, à temperatura "não permissiva", mesmo quando outras condições são mantidas iguais, a taxa de replicação de material genético é substancialmente inferior, pelo menos, 10 vezes inferior; habitualmente, pelo menos, cerca de 100 vezes inferior: e, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 1000 vezes inferior. Esta temperatura é, tipicamente, cerca de 35°-50 °C, em geral cerca de 42 °C. Num exemplo típico desse vírus auxiliar ts, o vírus é capaz de replicação eficiente a temperaturas relativamente baixas, tal como temperaturas de cerca de 20-32 °C, mas é incapaz de replicação eficiente a temperaturas relativamente elevadas, tal como temperaturas de cerca de 37-42 °C. Compreende-se que a célula infectada com vírus pode, não obstante, exibir alguns processos metabólicos atribuíveis ao vírus, à temperatura não permissiva, incluindo mas não limitados à função de auxiliar para produção de AAV.

Um vírus auxiliar sensível à temperatura pode ser produzido em quantidades em bruto pela cultura de células infectadas a uma temperatura permissiva. O vector de AAV pode ser, depois, produzido pela cultura de células compreendendo elementos de vector e o vírus auxiliar sensível à temperatura a uma temperatura não permissiva. A preparação de vector será substancialmente isenta de componentes de vírus auxiliar.

Um grande número de variantes de adenovírus sensíveis à temperatura foi descrito na técnica; ver, e. g., os variantes descritos 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); e Shiroki *et al.*, (*Virology* 61:474, 1974); entre outros. A

análise de complementação indica que essas variantes se dividem numa pluralidade de diferentes grupos de complementação (Ginsberg *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34:419, 1974). Isto sugere que um número de etapas no ciclo replicativo de adenovírus pode ser tornado sensível à temperatura.

Dado que a função de auxiliar para a replicação de AAV requer que apenas parte do ciclo de adenovírus esteja intacto, a testagem para a função de auxiliar de diversos mutantes à temperatura não permissiva proporciona um meio para mapeamento da função de auxiliar. Por exemplo, Ishibashi *et al.* (*Virology* 45:317, 1971) referiram que variantes de adenovírus aviário sensível à temperatura suportam replicação de AAV1 e AAV2. Ito *et al.* referiram que o mutante ts13 sensível à temperatura do adenovírus 7 humano (Ad7ts13) auxilia na replicação de AAV à temperatura não permissiva tão eficientemente como a estirpe selvagem. Drake *et al.* (*Virology* 60: 230, 1974) referiram complementação da síntese de antigénio de AAV4 por 3 grupos de mutantes sensíveis à temperatura do vírus herpes simplex de tipo 1 (HSV 1). Handa *et al.* (*J. Gen. Viro.* 29:239, 1975) referiram actividade de auxiliar para produção de vírus AAV 1 pelos mutantes de adenovírus humano Ad5ts36, Ad5ts125, Ad5ts149, Ad12tsA275, Ad12tsB221 e Ad12tsC295. Ostrove *et al.* (*Virology* 104:502, 1980) referiram que os mutantes sensíveis à temperatura Ad5ts125, Ad5ts135, Ad5ts157, Ad5ts116 e Ad5ts142 e os mutantes da gama de hospedeiro hr6, mas não hr3, suportam replicação de AAV. Mayor *et al.* (*J. Gen Virol.* 35:545, 1977) referiram que Ad31 ts13, mas não Ad31ts94, suportam produção de AAV 1 à temperatura não permissiva.

Straus *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:742, 1976) referiram que o Ad5ts125 suporta replicação de AAV2, sob condições onde o próprio adenovírus não se replicou. Utilizaram esta propriedade para estudar intermediários de ADN formados durante a replicação de AAV. Myers *et al.* (*J. Virol.* 35:65, 1980) realizaram um estudo quantitativo sobre a função de auxiliar e mostraram que o Ad5ts149 suportou a produção de 20000 partículas infecciosas de AAV por célula à temperatura não permissiva, ao passo que o Ad5ts107 produziu apenas ~100 partículas por célula. Dado que o Ad5ts107 tem uma mutação na região codificante da proteína de ligação de ADN de 72 kDa, concluíram que esta proteína desempenhou um papel na expressão de ARN de AAV. Mais recentemente, Carter *et al.* (*Virology* 191:473; 1992) propuseram que uma proteína de 72 kDa totalmente funcional é requerida para expressão pós-transcricional quantitativa dos genes *rep* e *cap* de AAV.

Como delineado na secção dos antecedentes, a existência de adenovírus sensível à temperatura é conhecida há já algum tempo. Contudo, não tem existido ensinamento ou sugestão efectivos com respeito à efectiva utilização de vírus auxiliares condicionais na produção de vectores de AAV recombinante, tal como os que poderão ser utilizados para terapia génica.

Parte da explicação pode ser a dificuldade na obtenção de títulos exequíveis de AAV quando se utilizam vectores recombinantes. Entre outras coisas, as proteínas Rep de AAV aparentemente regulam negativamente a sua própria expressão através do promotor p5 (Tratschin *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 6:2884, 1986). Além disso, foi observado que a expressão do gene *rep* em linhas celulares de empacotamento, tal como as que poderão ser utilizadas para a produção de vector de AAV

recombinante, tende a inibir o crescimento e/ou metabolismo das células (ver, e. g., Targeted Genetics Corporation. Documento W096/17947, de Allen *et al.*).

Quando consideradas em termos de produção, as diferenças entre a produção de vectores de AAV de tipo selvagem e AAV recombinante tendem a ser bastante dramáticas. Em particular, foi observado que a produção de vectores de AAV recombinante tende a ser substancialmente inferior à produção de partículas de AAV de tipo selvagem e que mesmo a presença ou produção de pequenas quantidades de AAV de tipo selvagem contaminante tende a resultar numa produção preferencial de vírus de tipo selvagem, que pode eventualmente exceder em número os vectores de AAV recombinante.

Estes fenómenos são ainda ilustrados pelos resultados descritos nos Exemplos 1 e 2 desta divulgação e na Figura 1. O mutante ts149 sensível à temperatura de adenovírus é referido em qualquer outra parte como suportando a replicação de partículas de AAV (Myers *et al.* *J. Virol.* 35:65, 1980). Contudo, o Exemplo 2 mostra que quando este mutante é utilizado para suportar a produção de um vector de AAV com um promotor heterólogo sob condições padrão, o nível de produção é *várias ordens de grandeza* inferior ao que é suportado por adenovírus de tipo selvagem.

Esta divulgação mostra que o vírus auxiliar sensível à temperatura pode, de facto, ser utilizado para preparar vectores de AAV recombinante a títulos exequíveis, superando os aparentes obstáculos de produção. As descrições que se seguem ilustram de que modo seleccionar um vírus auxiliar sensível à temperatura e

optimizar condições para proporcionar AAV suficiente para os efeitos de terapia génica.

Em particular, mostra-se que, quando se utiliza tsAd com auxiliar, o prolongamento do período de replicação para AAV aumenta drasticamente a quantidade de vector de AAV que é produzido (Exemplo 3). Isto é um contra senso, porque prolongando-se o período de replicação quando se utiliza Ad de tipo selvagem no mesmo modo *diminui* a quantidade de vector de AAV em, pelo menos, uma ordem de grandeza. Um profissional especialista na técnica, procurando optimizar as condições para produção de AAV optaria, logicamente, por tempos de cultura mais curtos e concentrações mais elevadas de vírus auxiliar; mostrando-se aqui que são ambos ineficazes.

Esta divulgação proporciona, ainda, métodos melhorados de cultura e separação, para preparação de quantidades quantitativas de adenovírus sensível à temperatura. Embora não estritamente requerido para a prática de determinados casos desta divulgação, e. g., para a prática de determinadas formas de realização desta invenção, as preparações de adenovírus sensível à temperatura obtidas por estes métodos são particularmente adequadas para a produção de AAV, *inter alia*, para os efeitos de terapia génica.

Os variantes sensíveis às condições da estirpe seleccionada de vírus auxiliar podem ser produzidos por uma estratégia apropriada de mutagenização e selecção. Por exemplo, o vírus pode ser mutagenizado com nitrosoguanidina, ácido nitroso, hidroxilamina ou 5-bromo-2-desoxiuridina. São seleccionados os candidatos que podem multiplicar-se numa célula eucariótica adequada, sob as condições permissivas desejadas, mas não sob as

condições não permissivas desejadas. Como uma ilustração, podem ser obtidos mutantes sensíveis à temperatura de adenovírus que se multiplicam, e. g., a 32 °C, mas não a 39,5 °C. As razões de eficiência de plaqueamento a 39,5 °C versus 32 °C são, de um modo preferido, inferiores a 10^{-4} e, de um modo mais preferido, inferiores a 10^{-5} . Ilustração adicional de processos de selecção adequados para adenovírus sensível à temperatura pode ser consultada, por exemplo, em Ensinger *et al.*, *J. Virol.* 10:328, 1972; e Williams *et al.*, *J. Gen Virol.* 11:95, 1971. A descrição de variantes de adenovírus que não são sensíveis à temperatura, mas sensíveis à gama de hospedeiro, pode consultar-se em Harrison *et al.*, *Virology* 77:319, 1977. Os mutantes sensíveis à temperatura eficazes para utilização quando se realiza esta divulgação, incluindo a invenção, podem ser preparados, por exemplo, a partir de vírus auxiliares alternativos, como o herpes simplex 1 (HSV1) ou herpes simplex 2 (HSV2). Ver, e. g., Schaffer *et al.*, *Virology* 52:57, 1973 para HSV1; Esparza *et al.*, *Virology* 57:554, 1974 para HSV2. Como indicado na secção de antecedentes, foi descrito um grande número de vírus auxiliares sensíveis às condições e podem ser adquiridos aos cientistas que os desenvolveram ou descreveram ou a partir de depositário público.

Nem todos os variantes sensíveis às condições dos vírus listados acima funcionarão com a presente invenção. Em particular, a estirpe deve ser tornada sensível às condições numa fase do seu ciclo replicativo, de modo a que a função que é bloqueada sob condições não permissivas não seja aquela que é requerida para replicação de elevada eficiência de AAV. A escolha da estirpe de vírus auxiliar a utilizar pode ser feita por referência à biologia conhecida do vírus auxiliar e aos requisitos replicativos de AAV.

Um vírus auxiliar exemplificativo para utilização quando se realiza a presente divulgação, incluindo a presente invenção, é o adenovírus ts149 sensível à temperatura do serotipo Ad5 (Ad5ts149). Como mostrado na secção de exemplos, sob condições optimizadas, esta estirpe pode ser utilizada para produzir rAAV a níveis que correspondem ou excedem os suportados por Ad5 de tipo selvagem. O ts149 tem uma única transição de C-G em A-T na posição 7563 (Roovers *et al.*, *Virus Genes* 4:53, 1990). Isto resulta numa alteração do aminoácido leucina, no resíduo 411 da ADN polimerase, para fenilalanina. A ADN polimerase está contida na unidade de transcrição E2 de adenovírus. Contudo, outros mutantes ts mapeando para esta região são menos adequados. Em particular, a unidade de transcrição E2 também compreende a região codificante para a proteína de ligação de ADN de 72 kDa (DBP). Uma estirpe que não produz DBP detectável (Add/802) suporta replicação de AAV, mas a um nível que é reduzido numa ordem de grandeza (Carter *et al.*, *Virology* 191:473, 1992). A Adts125, que também compreende uma mutação mapeando para a região codificante de DBP, suporta replicação de AAV (Straus *et al.*, *J. Virol.* 17:140, 1976), embora os níveis sejam, em geral, muito mais baixos do que com Ad5 de tipo selvagem (Myers *et al.*, *J. Virol.* 35:65, 1980). Consequentemente, os vectores de adenovírus sensíveis à temperatura adequados para utilização quando se realiza a presente divulgação, incluindo a presente invenção, incluem aqueles para os quais a sensibilidade mapeia para a região E2A do genoma, de um modo preferido para a região codificante de ADN polimerase.

O especialista pode facilmente determinar que estirpes virais são adequadas para utilização como vírus auxiliar, pela condução de um ensaio de replicação de rAAV, utilizando um painel de estirpes de vírus auxiliar candidatas numa célula

candidata, sob condições que são não permissivas para auto-replicação do auxiliar. Para variantes sensíveis à temperatura, o rastreio é realizado à temperatura não permissiva de acordo com propriedades conhecidas da estirpe. As temperaturas não permissivas são, em geral, superiores às temperaturas permissivas, tipicamente cerca de 35°-50 °C, de um modo preferido 38°-45 °C, de um modo mais preferido cerca de 39,5 °C. Os variantes suportando replicação de AAV, a um nível que está dentro de uma ordem de grandeza suportada pelo correspondente vírus de tipo selvagem, são preferidos. Na condução do rastreio, o especialista deve incorporar os outros ensinamentos desta divulgação. Em particular, o rastreio pelo cultura durante tempos que conferem pico de replicação de AAV com vírus de tipo selvagem é insuficiente. Deve ser implementada uma matriz cinética, na qual os vírus auxiliares candidatos são utilizados durante períodos mais longos e, depois, comparados com o vírus de tipo selvagem no pico do tempo de recolha. Uma ilustração mais detalhada desta análise é proporcionada no Exemplo 3 desta divulgação.

Uma vez seleccionada uma estirpe de vírus auxiliar adequada, pode ser implementada nesta invenção num número de formas diferentes. Partículas virais, plasmídeos virais e células hospedeiras transformadas de um modo estável podem todos ser utilizados.

Numa forma de realização, o genoma do vírus auxiliar (ou, minimamente, as regiões do genoma do vírus auxiliar codificando a função de auxiliar) é introduzido numa célula hospedeira a ser utilizada para replicação do vector de rAAV na forma de um plasmídeo de ADN, ou uma pluralidade de plasmídeos que proporcionam funções complementares. Os processos para

manipulação experimental de adenovírus são conhecidos na técnica. O leitor é remetido para Graham et al., "Manipulation of adenovirus vectors". Em: Murray EJ, ed. *Methods in molecular biology: Gene transfer and expression protocols*, vol. 7. Clifton, NJ: The Human Press, 1991:109-128, a qual proporciona protocolos detalhados para propagação, titulação e purificação de adenovírus, co-transfecção e recombinação *in vivo*. Os plasmídeos de adenovírus estão disponíveis comercialmente a partir de Microbix Biosystems Inc., Toronto, Canadá.

Noutra forma de realização, a célula hospedeira é transfectada de um modo estável com genes de adenovírus, ou geneticamente alterada para proporcionar as funções requeridas para replicação de rAAV. Alternativamente, a célula hospedeira pode ser geneticamente alterada apenas com uma porção do genoma de adenovírus e é subsequentemente infectada ou transfectada com uma partícula ou plasmídeo de adenovírus. Os pedidos de patente WO 95/27071 e WO 95/34671 descrevem células hospedeiras alteradas de um modo herdável para proporcionar função de adenovírus que complementa a propriedade replicativa de diversas construções de adenovírus defeituosas.

Ainda noutra forma de realização, a célula hospedeira utilizada para replicação de AAV é infectada com um vírus auxiliar que é capaz de auto-replicação, mas não sob condições não permissivas. Pode ser utilizada qualquer preparação da estirpe requerida proporcionando uma MOI suficiente. De acordo com as GMP e outros requisitos reguladores e para facilitar o aumento de escala para efeitos comerciais, as preparações de vírus auxiliar compreendem, de um modo preferido, uma elevada densidade de partículas infecciosas e são substancialmente

isentas de detritos celulares e outros contaminantes. As propriedades desejáveis incluem as seguintes:

- Uma densidade de, pelo menos, 10^6 , de um modo preferido, pelo menos, cerca de 10^8 , de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 10^{10} IU/mL, como determinada num ensaio de TCID₅₀.
- Uma razão de ADN de adenovírus para proteína total ou hexão de adenovírus que indica que, pelo menos, 10%, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 50%, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 80% das partículas virais contêm ADN de adenovírus.
- Menos de 20%, de um modo preferido menos do que cerca de 10%, de um modo mais preferido menos do que cerca de 1% de contaminação por material não adenovírus ao nível de proteína ou ADN, como detectado por géis de SDS corados para proteína, ou géis de agarose de digestões com nuclease de restrição corados com brometo de etídio.
- Um total de, pelo menos, 10^9 , de um modo preferido, pelo menos, cerca de 10^{11} , de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 10^{13} IU por lote de produção.

O vírus auxiliar pode ser preparado em qualquer célula que seja permissiva para replicação viral. Para adenovírus, as células preferidas incluem células 293 e células HeLa. Tradicionalmente, quando estas células foram utilizadas para replicação de adenovírus, foram utilizadas em culturas de placas. Contudo, como mostrado no Exemplo 4, estes métodos, em geral, suportam replicação de adenovírus sensível à temperatura a níveis que são *um ou dois logs mais baixos* do que para adenovírus de tipo selvagem.

Consequentemente, é preferido utilizar técnicas de cultura que permitam um aumento na densidade de sementeira. Estão disponíveis células 293 e variantes de células HeLa que foram adaptados a cultura de suspensão. Por razões de crescimento, viabilidade e morfologia celulares em suspensão, prefere-se HeLa. Como mostrado no Exemplo 5, estas células podem ser cultivadas a densidade suficiente (2×10^6 por mL) para compensar a taxa de replicação inferior da estirpe de adenovírus sensível à temperatura. Uma vez estabelecidas, as células são infectadas com o vírus e cultivadas à temperatura permissiva durante um período suficiente; em geral, 3-7 dias e, tipicamente, cerca de 5 dias.

A filtração de caudal tangencial é uma técnica utilizada na matéria para processamento de grandes volumes de células de mamífero para os efeitos da sua perfusão, concentração e recolha. Ver, e. g., Dorin et al., *Biotechnol. Prog.* 6:494, 1990; Maiorella et al., *Biotechnol. Bioeng.* 37:121, 1991. É recomendado que esta técnica seja utilizada com culturas de suspensão, para a preparação de vírus auxiliar, para utilização quando se realiza a presente divulgação, incluindo a presente invenção. O Exemplo 5 demonstra que as células HeLa S3 resistem a forças de cisalhamento de $750\text{--}1500 \text{ seg}^{-1}$, permitindo a concentração das células e diafiltração dos meios gastos.

O vírus é recolhido da cultura a partir dos meios gastos ou por microfluidização das células. O nível de vírus auxiliar produzido na cultura é, tipicamente, pelo menos, 10^7 IU/mL e, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 3×10^7 IU/mL.

O vírus auxiliar preparado de acordo com a descrição anterior pode ser utilizado directamente para infecção das células hospedeiras utilizadas para replicação de rAAV. Mais habitualmente, o vírus é isolado e concentrado antes da utilização. Os métodos correntes para purificação e concentração de vírus auxiliar tipicamente envolvem gradientes de CsCl isopícnicos. Este método é intensivo em termos de tempo e trabalho, requer numerosas etapas de processamento aberto e é difícil de aumentar de escala. Como alternativa, recomenda-se a purificação por cromatografia. O leitor é remetido, em geral, para Prior *et al.*, *Pharmaceut. Technol.* 19:30, 1995: e Huyghe *et al.*, *Human Gene Therapy* 6:1403, 1995. É particularmente preferida para isolamento de estirpes sensíveis à temperatura de adenovírus a cromatografia de permuta aniónica, especialmente numa resina de polietilenoimina, utilizando um gradiente de NaCl contínuo, a pH 7,4. Uma ilustração detalhada do método de separação de polietilenoimina é proporcionada no Exemplo 6.

Proporcionando uma Célula Hospedeira Compreendendo Vírus Auxiliar e AAV

Vários critérios influenciam a selecção de células para utilização na produção de partículas de rAAV, como aqui descrito. Como uma matéria inicial, quando se utiliza o vírus auxiliar seleccionado, a célula deve ser permissiva para replicação e empacotamento do vector de rAAV. Contudo, dado que a maioria das células de mamífero pode ser produtivamente infectada por AAV e muitas também podem ser infectadas por vírus auxiliares, tal como adenovírus, é claro que uma grande variedade de células e linhas celulares de mamífero satisfazem eficazmente estes critérios. Entre estas, as células e linhas

celulares mais preferidas são as que podem ser facilmente cultivadas em cultura, de modo a facilitar a produção em grande escala de preparações de vector de AAV recombinante. De novo, contudo, muitas dessas células satisfazem eficazmente este critério. Onde se deseje a produção em grande escala, a escolha do método de produção também irá influenciar a selecção da célula hospedeira. Por exemplo, como descrito em maior detalhe abaixo e na técnica, algumas técnicas de produção e recipientes ou câmaras de cultura são concebidos para crescimento de células aderentes ou conjugadas, ao passo que outros são concebidos para crescimento de células em suspensão. No último caso, a célula hospedeira, deste modo, estaria de um modo preferido, adaptada ou adaptável ao crescimento em suspensão. Contudo, mesmo no caso de células e linhas celulares que são consideradas como aderentes ou dependentes de ancoragem, é possível (como descrito abaixo) derivar variantes adaptados a suspensão de uma linha parental dependente de ancoragem, por selecção em série para células capazes de crescimento em suspensão.

Onde se utilize um vírus auxiliar sensível à temperatura, a célula deve ser capaz de replicar eficazmente o vector de rAAV, sob condições que são não permissivas para replicação do vírus auxiliar. A título de ilustração, quando o adenovírus ts149 é utilizado como um vírus auxiliar ts (como descrito e ilustrado abaixo), a célula deve ser capaz de suportar a replicação e empacotamento de rAAV a temperaturas bem acima de 32 °C, de um modo preferido cerca de 39,5 °C. As células 293 humanas são um exemplo de uma linha celular preenchendo estes critérios, mas numerosas outras células e linhas celulares são capazes da replicação de rAAV a esta temperatura relativamente elevada.

Em última análise, o vírus auxiliar, a sequência de vector de rAAV e todas as sequências de AAV necessárias para replicação e empacotamento devem estar presentes na mesma célula. Onde um ou mais genes de empacotamento de AAV são proporcionados separadamente do vector, é proporcionada uma célula hospedeira que compreende: (i) um ou mais genes de empacotamento de AAV, em que cada gene de empacotamento de AAV referido codifica uma proteína de replicação ou encapsidação de AAV; (ii) um polinucleótido heterólogo introduzido na referida célula hospedeira utilizando um vector ou pro-vector de rAAV, em que o referido vector ou pro-vector de rAAV compreende o referido polinucleótido heterólogo flanqueado por, pelo menos, uma ITR de AAV e é deficiente no(s) referido(s) gene(s) de empacotamento de AAV; e (iii) um vírus auxiliar ou sequência codificando as funções de vírus auxiliar requeridas. Deve notar-se, contudo, que um ou mais destes elementos pode estar combinado num único replicação. A título de ilustração, um vírus auxiliar também pode compreender um pro-vector de rAAV ou um gene de empacotamento de AAV.

O vírus auxiliar é, de um modo preferido, introduzido na cultura celular a um nível suficiente para infectar a maioria das células em cultura mas pode, de outro modo, ser mantido a um mínimo, de modo a limitar a quantidade de vírus auxiliar presente na preparação resultante. Pode ser utilizada uma multiplicidade de infecção ou "MOI" de 1-100, mas uma MOI de 5-10 é tipicamente adequada.

De modo semelhante, se o vector de AAV e/ou genes de empacotamento forem introduzidos, de um modo transiente, na célula de empacotamento (em oposição a serem introduzidos de um modo estável) são introduzidos, de um modo preferido, a um nível

suficiente para alterar geneticamente a maioria das células em cultura. As quantidades requeridas são, em geral, da ordem de 10 µg por 10^6 células, se proporcionadas como um plasmídeo bacteriano; ou 10^8 partículas por 10^5 células, se proporcionadas como uma partícula de AAV. A determinação de uma quantidade óptima é um exercício de titulação de rotina que está dentro dos conhecimentos gerais do especialista.

Estes elementos podem ser introduzidos na célula, simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem. Onde a célula é alterada de um modo herdável por qualquer dos elementos, a célula pode ser seleccionada e deixada proliferar, antes da introdução do elemento seguinte.

Num caso preferido, e. g., numa forma de realização preferida, o vírus auxiliar é introduzido na célula em último lugar para resgatar e empacotar um vector de rAAV residente. A célula já estará, em geral, suplementada na medida necessária com genes de empacotamento de AAV. De um modo preferido, o vector de rAAV ou os genes de empacotamento e, de um modo mais preferido, estão ambos integrados de um modo estável na célula. É facilmente entendido que são possíveis outras combinações. Essas combinações estão incluídas no âmbito da invenção.

Uma vez proporcionada a célula hospedeira com os elementos requeridos, a célula é cultivada sob condições que são permissivas para a replicação de AAV, para permitir a replicação e empacotamento do vector de rAAV. O tempo de cultura é, de um modo preferido, ajustado para corresponder a níveis de pico de produção e é, tipicamente, 3-6 dias. De um modo preferido, são produzidas, pelo menos, 100 partículas virais por célula; de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 1000 por célula, de um

modo ainda mais preferido, pelo menos, cerca de 10000 por célula. De um modo preferido, pelo menos, $0,5 \times 10^6$, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 1×10^6 , de um modo ainda mais preferido, pelo menos, cerca de 2×10^6 RU/mL de vectores de AAV são produzidos por 2×10^5 células durante o período de cultura. Opcionalmente, podem ser utilizados métodos de produção em grande escala, tais como cultura de suspensão e filtração de caudal tangencial. As partículas de AAV são, depois, recolhidas e isoladas das células utilizadas para as preparar.

As preparações de partículas de rAAV da presente divulgação compreendem, de um modo preferido, uma elevada densidade de partículas infecciosas de AAV e são substancialmente isentas de vírus auxiliar, proteínas de vírus auxiliares e detritos celulares e outros contaminantes. As propriedades desejáveis incluem as seguintes:

- Uma concentração de, pelo menos, 10^7 , de um modo preferido, pelo menos, cerca de 10^8 , de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 10^9 RU/mL, como determinada num ensaio de replicação ou comparação de hibridação quantitativa com um padrão conhecido.
- Não mais de 10^3 , de um modo preferido não mais de cerca de 10^2 , de um modo mais preferido não mais de cerca de 10^1 partículas infecciosas de vírus auxiliar por 10^8 RU de partículas de rAAV.
- Menos de 5%, de um modo preferido menos do que cerca de 1%, de um modo mais preferido menos do que cerca de 0,01%, de um modo ainda mais preferido menos do que cerca de 0,001% de contaminação por vírus auxiliar numa base de proteína (p/p), detectada por análise densitométrica de géis de SDS, ou por imunoensaio para proteína específica de

vírus auxiliar (tais como fibra de hexão ou pentão de adenovírus).

- Menos de 5%, de um modo preferido menos do que cerca de 1%, de um modo mais preferido menos do que cerca de 0,01%, de um modo ainda mais preferido menos do que cerca de 0,001% de contaminação por vírus auxiliar ou proteína celular (p/p), detectada por análise densitométrica de géis de SDS, ou por imunoensaio para proteínas específicas de vírus auxiliar ou celulares.
- De um modo preferido, a preparação também é substancialmente isenta de outros potenciais constituintes celulares, tais como lípidos celulares, hidratos de carbono e/ou ácidos nucleicos.

Os métodos delineados nesta divulgação são adequados para a preparação de pequenos lotes experimentais ou lotes preparativos de 10-100 litros ou mais. Para preparações de lotes de grande escala, a seguinte propriedade também é desejável:

- Um total de, pelo menos, 10^{10} , de um modo preferido 10^{12} e, de um modo mais preferido, 10^{14} RU de partículas de vector de AAV na preparação.

Opcionalmente, os vectores de rAAV podem ser ainda processados para enriquecer para partículas de rAAV, deplecionar partículas de vírus auxiliar ou, de outro modo, torná-las adequadas para administração a um indivíduo. As técnicas de purificação podem incluir centrifugação de gradiente isopícnico e técnicas cromatográficas. A redução da actividade infecciosa de vírus auxiliar pode incluir inactivação por tratamento térmico ou por tratamento de pH, como é conhecido na técnica. Outros processos podem incluir concentração, filtração,

diafiltração ou mistura com um tampão ou excipiente farmacêutico adequado. As preparações podem ser divididas em alíquotas de dose unitária e multidoses para distribuição, que irão reter as características essenciais do lote, tal como a homogeneidade do teor antigénico e genético e a proporção relativa de vírus auxiliar contaminante.

As técnicas exemplificativas para a produção de preparações de vírus auxiliar e AAV exibindo diversas propriedades desejáveis, como descrito acima, são proporcionadas nas seguintes secções e nos exemplos subsequentes.

Diversos métodos para a determinação do título infeccioso de uma preparação viral são conhecidos na técnica. Contudo, um método preferido para a determinação do título é um ensaio de titulação de alta capacidade como aqui proporcionado. Num ensaio de titulação de alta capacidade exemplificativo, é estabelecida uma matriz de poços de cultura, cada compreendendo uma alíquota de células de mamífero e uma alíquota de preparação de vírus (assim como poços de controlo compreendendo, e. g., células isoladamente, vírus isoladamente e nada). A matriz de poços de cultura pode, por exemplo, ser na forma de um recipiente de microtitulação. Tipicamente, as alíquotas (e. g., alíquotas diluídas serialmente) da preparação de vírus a ser titulada são adicionadas às células e, depois, as células e vírus são incubados sob condições que permitem a replicação do vírus (tipicamente, condições de crescimento adequadas para a célula hospedeira de mamífero). Após a replicação do vírus, é, em geral, libertado ácido nucleico viral por lise das células de mamífero (utilizando condições ou agentes que promovem a lise conforme necessário). Em casos preferidos, o ácido nucleico (incluindo ácido nucleico viral) na multiplicidade de lisados é

transferido e fixo a uma membrana, sob condições que ligam o ácido nucleico (lavagem, conforme apropriado, para remover proteínas e outros contaminantes). A membrana é, de um modo preferido, uma réplica ou imagem de espelho da matriz de cultura, na qual os poços individuais da matriz original são subsequentemente representados por "agregados" de ácido nucleico (do lisado de cada poço de cultura) que estão ligados nas correspondentes posições na membrana. A hibridação da membrana com uma sonda marcada específica de vírus (ou específica de inserto viral) pode ser, depois, utilizada para identificar e quantificar a quantidade relativa de ácido nucleico específico viral em cada dos pontos na matriz e, por correspondência, em cada dos poços de cultura originais. As condições e materiais para transferência, ligação, lavagem e hibridação de ácido nucleico podem ser adaptados de técnicas de biologia molecular de rotina, tal como hibridação de "transferência pontual" (como descrito na técnica, ver, e. g., as técnicas de biologia molecular em Sambrook *et al.*, supra, e Ausubel *et al.*, supra). As aplicações ilustrativas destas técnicas são apresentadas abaixo.

Estes métodos proporcionam, deste modo, um ensaio de infecciosidade de alta capacidade que pode ser utilizado na determinação do título infeccioso de uma preparação de vírus. Como mostrado no Exemplo 4, os títulos de vírus determinados por este método rápido e quantitativo correspondem de perto aos títulos determinados por técnicas mais clássicas. Além disso, contudo, este método de alta capacidade permite o processamento e análise concorrente de muitas reacções de replicação viral e, deste modo, tem muitas outras utilizações incluindo, por exemplo, o rastreio de linhas celulares permissivas ou não permissivas para replicação e infecciosidade viral, assim como o

rastreio de agentes que afectam a replicação viral, como discutido mais abaixo.

Técnicas Preferidas de Produção e Purificação de Vírus Auxiliar para utilização na Presente Invenção

Em diversos aspectos preferidos da presente divulgação, os métodos de produção e purificação são utilizados para a produção vírus auxiliar adequado para utilização na produção de vectores de rAAV, como aqui descrito. Um vírus auxiliar geralmente utilizado para a produção de AAV é o adenovírus, tipicamente Ad5, embora outros vírus auxiliares também possam ser empregues, como aqui discutido e na técnica.

Para efeitos de ilustração, é conveniente dividir a discussão da produção e purificação de vírus em fases a "montante" e "jusante". O processo a "montante" refere-se, em geral, à produção do vírus em células hospedeiras adequadas e libertação ou remoção do vírus das células para produzir uma preparação de vírus "em bruto", tal como um lisado. O processamento a "jusante" pode ser utilizado para purificar a preparação de vírus em bruto (e. g., para isolá-la de proteínas celulares e/ou outros contaminantes).

É conhecida uma variedade de técnicas para a produção e processamento de vírus auxiliar, incluindo adenovírus (e. g., centrifugação de CsCl, assim como outras técnicas, tal como as descritas no documento WO 96/27677). O vírus auxiliar produzido utilizando essas técnicas pode ser, depois, utilizado na produção de vectores de rAAV, como aqui descrito.

As seguintes secções descrevem, para efeitos de ilustração, técnicas que podem ser utilizados para a produção de adenovírus, embora sejam conhecidas outras técnicas na matéria e podem ser aqui utilizadas.

(i) A Montante do Vírus Auxiliar

O vírus auxiliar, tal como Ad5, pode ser facilmente produzido pela infecção de células de mamífero (e. g., células humanas). Em exemplos ilustrativos descritos abaixo, as células são cultivadas em meios e recipientes de cultura adequados para crescimento da célula hospedeira, concentrados antes da infecção e, depois, infectados com vírus auxiliar (e. g., a uma MOI de 1-5) com agitação suave. Após infecção, as células podem ser ressuspensas em meio fresco e incubadas durante um período de tempo adicional (tipicamente, cerca de 2 dias), de modo a permitir a replicação e empacotamento do vírus auxiliar. Após incubação, as células podem ser recolhidas e lisadas para libertar o vírus auxiliar. Após a lise, o lisado celular é, de um modo preferido, tratado com uma nuclease para degradar ácido nucleico livre (e. g., ácido nucleico celular), sem degradar ácido nucleico que está encapsidado em partículas virais. O lisado pode ser clarificado (e. g., por filtração e/ou centrifugação) e também pode ser submetido a técnicas de purificação adicionais, de modo a purificar e concentrar o vírus auxiliar na preparação, como descrito e ilustrado abaixo.

Como um exemplo ilustrativo desse processo, as células podem ser cultivadas em meios, a uma densidade de cerca de 1×10^6 célula/mL, num recipiente, tal como um frasco *spinner*. Após incubação, as células podem ser, depois, concentradas a

cerca de 10^7 células/mL e infectadas com Ad5, a 1-2 unidades infecciosas/célula, com agitação suave. As células podem ser, depois, ressuspensas em meio, a cerca de 10^6 células/mL e deixadas produzir vírus, ao longo de um período de incubação de cerca de 2 dias. As células podem ser, depois, recolhidas, ressuspensas em meio ou tampão (e. g., a cerca de 5×10^6 células/mL) e, depois, dissociadas, e. g., por lise mecânica, tal como por passagem através de um microfluidizador, a 8000 psi, ou técnica equivalente (e. g., congelação-descongelação ou sonicação). O lisado pode ser tratado com uma nuclease (e. g., Benzonase), durante uma hora, a 37 °C. O lisado pode ser clarificado através de um filtro, tal como um filtro de 1,0 μ , ou por centrifugação. Técnicas análogas e as suas modificações são ainda descritas abaixo.

(ii) A Jusante do Vírus Auxiliar

As técnicas preferidas para o processamento a jusante de vírus auxiliar, tal como adenovírus, utilizam processos cromatográficos de permuta iónica para a purificação do vírus auxiliar.

A título de ilustração, o filtrado de adenovírus, como descrito acima, pode ser carregado numa resina de permuta aniónica, tais como uma resina amino ou imino carregada em N (e. g., POROS 50 PI, ou qualquer resina de DEAE, TMAE, amina terciária ou quaternária ou baseada em PEI) numa coluna de cromatografia equilibrada com tampão (tal como TMEG, também aqui referido como Tampão de Cromatografia A: Tris a 50 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ a 5 mM, EDTA a 1 mM, glicerol a 5%).

A coluna pode ser, depois, lavada com múltiplos volumes de coluna de TMEG (e. g., 5-6 volumes), seguida de múltiplos volumes de uma lavagem de solução salina (e. g., 5-6 volumes de TMEG com NaCl a 800 mM (Tampão de Cromatografia "B": TMEG a 60% e TMEG a 40%, com NaCl a 2 M). O Adenovírus pode ser eluído com TMEG, com NaCl a 1300 mM. (35% de Tampão de Cromatografia A, 65% de Tampão de Cromatografia B).

O pico de adenovírus pode ser identificado nas fracções por um ensaio de infecciosidade ou por uma hibridação ou imunoensaio de ácido nucleico, como foram descritos na técnica. O pico pode ser esterilizado por filtração através de um filtro estéril de 0,2 μ . Opcionalmente, o pico pode ser concentrado por filtração de caudal tangencial, por exemplo numa unidade Filtron Ultrasette ou Millipore Pellicon. O pico ou concentrado pode ser diafiltrado neste sistema para dentro de um tampão adequado, tal como PBS + sacarose a 5%. Alternativamente, o adenovírus pode ser deixado em tampão de eluição. O produto de adenovírus final pode ser esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 μ e armazenado para utilização. Como aqui descrito e ilustrado, também pode ser utilizado um vírus auxiliar sensível à temperatura (tal como um adenovírus sensível à temperatura).

Exemplos descrevendo a preparação e utilização desses vírus auxiliares são proporcionados abaixo para efeitos de ilustração adicional.

Técnicas Preferidas de Produção e Purificação de AAV para utilização na Presente Invenção

Como com o vírus auxiliar, é conveniente, para efeitos de ilustração, dividir a discussão da produção e purificação de AAV em fases de processo a "montante" e "jusante", com o processo a "montante" referindo-se, em geral, à produção de AAV em células hospedeiras adequadas e libertação ou remoção do vírus das células para produzir uma preparação de AAV "em bruto". O processamento a "jusante" pode ser utilizado para purificar a preparação de AAV (e. g., para isolar o AAV de proteínas celulares e/ou outros contaminantes).

Em aspectos preferidos da presente divulgação, e. g., em aspectos preferidos da presente invenção, o processamento a montante e jusante de AAV é conduzido num modo concebido para reduzir e/ou eliminar substancialmente proteínas celulares contaminantes, assim como qualquer vírus auxiliar (e. g., Ad) ou proteínas de vírus auxiliares contaminantes, qualquer deles poderá contribuir para a dedução de uma resposta imunitária, se presente a níveis substanciais na preparação final de vector de rAAV a ser utilizada para transferência génica.

As seguintes secções descrevem, para efeitos de ilustração, técnicas que podem ser utilizadas para a produção de AAV.

(i) Processamento a Montante de AAV

Um vector de AAV pode ser produzido a partir de uma linha celular de mamífero que contém os genes de empacotamento de AAV necessários (e. g., um gene *rep* e *cap* de AAV); um pro-vector de

AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não AAV heterólogo flanqueado por, pelo menos, uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV; e um vírus auxiliar para AAV (e. g., um adenovírus). Estes componentes podem ser introduzidos na célula numa variedade de configurações, como descrito acima e ilustrado abaixo. Dado que o AAV pode ser replicado e empacotado em qualquer de uma variedade de células de mamífero, há um grande número de linhas celulares que podem ser modificadas e utilizadas para a produção de AAV.

A título de ilustração, o vector de AAV pode ser produzido a partir de uma linha celular, tal como "C12" (como descrito por K.R. Clark *et al.*, *Gene Therapy*, 3: 1124-1132, 1996) ou a linha "C137.5" (descrita num pedido pendente co-propriedade de Targeted Genetics Corporation, J. Allen *et al.*, WO 96/17947), que foi manipulada para conter uma construção de *rep* e/ou uma construção de *cap*, assim como uma construção de vector. Opcionalmente, uma linha celular, tais como C12 ou c137, que contém uma construção de *rep* e/ou uma construção de *cap*, pode ser transfectada com um plasmídeo que contém uma construção de vector, tal como ptgAAV-CF. Ou uma célula pode ser transfectada com um plasmídeo que contém *rep* e *cap*, tal como pRS5, assim como um plasmídeo que contém uma construção de vector. A célula pode ser infectada com Adenovírus, ou transfectada com ADN que contém genes de adenovírus.

Uma variedade dessas células "produtoras" de AAV pode ser produzida, como descrito nas referências aqui citadas e na técnica.

As células produtoras de AAV podem ser cultivadas sob condições (incluindo meios, temperatura e semelhantes) que são, em geral, adequadas para crescimento das células de mamífero que também são, em geral, permissivas para a replicação de AAV. Por exemplo, o meio de suspensão DMEM/F12 é preferido para crescimento das células e o meio DMEM isolado é preferido para produção do vector de AAV. Como é conhecido na técnica, alguns tipos de células e linhas celulares tendem a ser dependentes de conjugação, ao passo que outras são capazes de crescimento em suspensão; e muitas células dependentes de conjugação também podem ser "adaptadas" para crescimento em suspensão, pela ciclicização das células sob condições de suspensão, como um meio de enriquecimento e, em última análise, selecção para variantes que são capazes de crescimento de suspensão. Consequentemente, o crescimento de células para produção de AAV pode ser conduzido em qualquer de uma variedade de recipientes dependendo, em parte, se a linha celular produtora seleccionada for relativamente dependente de conjugação ou for adaptada para suspensão. Esses recipientes para o crescimento de células dependentes de conjugação incluem, por exemplo, frascos de cultura de tecidos, frascos rotativos, microtransportadores e biorreactores (tais como biorreactores de fibra oca, de leito empacotado ou leito fluidizado). Os recipientes para linhas celulares de mamífero adaptados para suspensão incluem, por exemplo, frascos *spinner*, tanques reactores e fermentadores arejados.

A replicação de AAV prossegue durante um período de tempo, assim como até um ponto no ciclo de crescimento onde a produção viral é óptima, de um modo preferido crescimento logarítmico médio a tardio (tipicamente, um a três dias), tempo após o que as células podem ser recolhidas e lisadas para libertação de

vírus de descendência. Por exemplo, as células podem ser ressuspensas em meios de crescimento até cerca de $1-10 \times 10^6$ células/mL e deixadas a produzir durante 48 horas. As células podem ser, depois, recolhidas (e. g., por centrifugação) e ressuspensas em tampão (e. g., TMEG (ou "Tampão de Cromatografia A"): Tris a 50 mM, pH 8,0, $MgCl_2$ a 0,5 mM, EDTA a 1 mM, glicerol a 5%) a cerca de $1-10 \times 10^6$ células/mL.

O AAV pode replicar-se até elevado número de cópia (e. g., 10^5-10^6 genomas/célula) em células transduzidas, se as proteínas Rep de AAV e funções de vírus auxiliar necessárias forem proporcionadas relativamente simultaneamente. Se as proteínas Cap também forem proporcionadas, as partículas de AAV são agrupadas no núcleo das células infectadas, onde tendem a ser agrupadas em matrizes cristalinas. A primeira etapa na recuperação de produto é, por conseguinte, a dissociação celular. Embora a congelação-descongelação e/ou sonicação possam ser utilizadas para dissociar as células (como com o adenovírus), essas técnicas não são muito adequadas à preparação em grande escala. A lise mecânica, utilizando técnicas, tal como microfluidização, é, deste modo, preferida nesses aspectos. Detergentes e outros agentes químicos também podem ser empregues para mediar ou facilitar a lise. Verificou-se que o tratamento de lisados com nucleases (tal como Benzonase) é útil para a redução da viscosidade e melhoramento da filtrabilidade. A clarificação, e. g., por microfiltração para separar o vector de, pelo menos, alguma porção dos detritos celulares, também é útil para a promoção da recuperação e purificação.

A título de ilustração, as células podem ser mecanicamente lisadas após o período de incubação por passagem sequencial através de um microfluidizador (tipicamente, a cerca de

8000 psi, utilizando duas passagens). Outras técnicas geralmente utilizadas incluem ciclagem de congelamento-descongelamento e sonicação, como é conhecido na técnica. O lisado também pode ser tratado com uma nuclease, para degradar ácido nucleico (tal como ácido nucleico celular ou viral) que não é eficazmente "protegido", em virtude de estar empacotado numa partícula viral. É, tipicamente, utilizada a digestão com Benzonase, durante cerca de uma hora, a 37 °C. O lisado também pode ser clarificado. Os métodos para clarificação incluem passagem através de um filtro, tal como um filtro de 1,0 µ, e centrifugação.

A filtração de caudal tangencial (TFF) pode ser benéficamente empregue para processamento e recolha de grandes volumes de células. A TFF pode ser utilizada para perfundir, concentrar e recolher células animais. Por exemplo, a TFF pode ser utilizada para processar células sob condições de caudal laminar, a taxas médias de cisalhamento de parede de até 3000 por segundo (ver, e. g., Maiorella, B., et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 37: 121-126, 1991). A concentração em grande escala de vírus utilizando ultrafiltração de TFF foi descrita por R. Paul et al. *Human Gene Therapy*, 4:609-615, 1993.

Corridas de produção ilustrativas empregando essas técnicas são descritas abaixo.

(ii) Processamento a Jusante de AAV

Como descrito acima, seria particularmente vantajoso obter-se preparações de AAV que fossem substancialmente isentas

de partículas de vírus auxiliares (tal como partículas de Ad). Além disso, as preparações de vector de AAV também serão, de um modo preferido, substancialmente isentas de proteínas de vírus auxiliares e celulares (que também podem ser imunogénicas). Contudo, há um conjunto adicional de constrangimentos que influenciam a adequação das técnicas para produção de AAV. Nomeadamente, de modo a serem particularmente úteis para a produção de AAV para terapia génica, é muito desejável que as técnicas sejam "escaláveis", i. e., aplicáveis em conjunto com dispositivos e processos de preparação em grande escala. Este último conjunto de constrangimentos reduz eficazmente a utilidade das técnicas padrão disponíveis, tal como separação por cloreto de cério (que não está bem adaptada para processos de preparação em grande escala).

A requerente desverificou e cobriu uma combinação de processos que são escaláveis e notavelmente eficazes para a produção de preparações de AAV que são substancialmente isentas de partículas de vírus auxiliar, assim como proteínas de vírus auxiliares e celulares e outros desses contaminantes. A presente combinação preferida de processos emprega processos de cromatografia de permuta iónica que contrastam com diversos processos mencionados na técnica para a potencial purificação de, e. g., AAV ou Ad. Em particular, esses processos, como descrito na técnica, tipicamente empregam um único tipo de separação iónica, por vezes em combinação com outros géneros de processos cromatográficos (ver, e. g., K. Tamayose *et al.*, *Human Gene Therapy* 7: 507-513 (1996), e documento W096/27677, 12 de Setembro de 1996). Contudo, no caso da produção de AAV, a requerente verificou que uma combinação de cromatografia de permuta iónica de oposição sequencial é particularmente eficaz para a produção de preparações de AAV que são substancialmente

isentas de partículas e proteínas de vírus auxiliar, assim como proteínas celulares.

Em consideração destas descobertas, parece que o AAV não está apenas "adaptado" à cromatografia de permuta aniónica e permuta catiónica, mas que essa combinação das permutas iónicas de oposição é particularmente eficaz para eliminação da totalidade dos diversos contaminantes de partículas e proteínas que, tipicamente, ocorrem na produção ou preparações de vector de AAV. Qualquer de uma variedade de resinas de permuta catiónica e aniónica pode ser utilizada em conjunto com estes processos, cujas propriedades fundamentais são a disponibilidade de grupos carregados negativamente e positivamente, respectivamente, aos quais o AAV se pode ligar, pelo menos até algum grau (de um modo muito preferido, até um grau que difere substancialmente da relativa afinidade de ligação de um ou mais dos contaminantes referidos acima, *i. e.*, partículas e proteínas de Ad, assim como proteínas celulares de mamífero). Sem se desejar estar ligado a uma teoria, considera-se que a etapa de permuta aniónica é particularmente eficaz para separação de AAV do Adenovírus; ao passo que se considera que ambas as etapas (mas, especialmente, a etapa de permuta catiónica) são particularmente eficazes para separação de AAV de proteínas celulares. A requerente também empregou permuta aniónica seguida de filtração de caudal tangencial, como descrito e ilustrado abaixo. Como ainda descrito abaixo, a requerente verificou que as preparações de AAV podem ser altamente concentradas por cromatografia em sulfato de heparina.

A título de ilustração, um lisado de AAV clarificado, como descrito acima, pode ser carregado numa coluna de permuta aniónica carregada positivamente, tais como uma resina amino ou

imino carregada em N (e. g., POROS 50 PI ou qualquer resina de DEAE, TMAE, amina terciária ou quaternária, ou baseada em PEI) ou uma coluna de permuta catiónica carregada negativamente (tal como HS, SP, CM ou qualquer resina catiónica à base de sulfo, fosfo ou carboxi). A coluna pode ser lavada com um tampão (tal como tampão de cromatografia A/TMEG). A coluna pode ser eluída com um gradiente de concentração crescente de NaCl e as fracções podem ser recolhidas e ensaiadas para a presença de AAV e/ou contaminantes.

Outros processos podem ser utilizados em vez ou, de um modo preferido, além dos processos de permuta aniónica e catiónica descritos acima, com base em associações intermoleculares mediadas por características que não a carga, como é conhecido na técnica. Esses outros processos incluem associações intermoleculares baseadas em pares de ligando-receptor (tais como interações de anticorpo-antigénio ou lectina-hidrato de carbono), assim como separações baseadas noutros atributos das moléculas, tal como cromatografia de crivo molecular baseada no tamanho e/ou forma. Para tomar apenas um único exemplo, o filtrado ou preparação de AAV parcialmente purificada pode ser carregado numa coluna que contém um anticorpo específico de AAV. Esta coluna pode ligar-se a AAV. A coluna pode ser enxaguada com tampão para remover proteínas contaminantes e, depois, eluída com um gradiente ou etapa de concentração crescente de NaCl e as fracções podem ser recolhidas. Alternativamente, essa coluna pode ser eluída com um tampão de pH diferente daquele do tampão de carregamento.

Os picos de AAV e adenovírus podem ser identificados nas fracções por ensaios de infecciosidade ou por uma hibridação ou imunoensaio de ácido nucleico. Os picos podem ser agregados e o

agregado pode ser diluído ou dialisado ou diafiltrado com um tampão (e. g., TMEG ou equivalente), para reduzir a concentração de sal.

Este agregado pode ser injectado numa coluna de permuta aniónica carregada positivamente e/ou uma coluna de permuta catiónica carregada negativamente (tal como as referidas acima). A coluna pode ser lavada com um tampão (tal como tampão de cromatografia A/TMEG). A coluna pode ser eluída com um gradiente de concentração crescente de NaCl e as fracções podem ser recolhidas. Os picos de AAV e adenovírus podem ser identificados nas fracções por um ensaio de infecciosidade ou por uma hibridação ou imunoensaio de ácido nucleico. Os picos podem ser agregados com base nos resultados de qualquer destes ensaios.

O agregado das fracções contendo AAV eluído de uma coluna de permuta aniónica, como descrito acima, pode ser concentrado e purificado por filtração de caudal tangencial (TFF), por exemplo numa unidade Filtron Ultrasette ou Millipore Pellicon. Uma membrana de exclusão de peso molecular adequada (tal como uma exclusão de 100000 ou 300000) é, tipicamente, composta por um polímero, tais como celulose regenerada ou polietersulfona. A preparação é filtrada através da membrana e o produto é retido. O material retido pode ser diafiltrado utilizando a membrana com lavagens sucessivas de um tampão adequado, tal como Solução Salina Equilibrada de Ringer + glicerol a 5%. A amostra final está altamente enriquecida para o produto e pode ser esterilizada por filtração através de um filtro de 0,2 μ e armazenada para utilização.

Na purificação e concentração de AAV com filtração de caudal tangencial a partir de material de coluna de permuta pós-aniônica, a membrana de exclusão de peso molecular de 300000 resultou em rendimentos mais elevados de unidades replicativas do que a membrana de exclusão de peso molecular de 100000.

Uma etapa adicional que pode ser empregue para remoção de adenovírus, se desejado, envolve o tratamento do agregado eluente com uma etapa de inativação por calor (como aqui descrito) e, depois, filtração (e. g., antes de submeter a preparação TFF). Contudo, a requerente verificou que o processo de "permuta aniônica-TFF" descrito acima resultou numa preparação de AAV que estava isenta de adenovírus detectável e resultou em melhores rendimentos de AAV purificado.

Corridas de produção ilustrativas empregando essas técnicas são descritas abaixo.

Alteração das Condições de Crescimento das Células Produtoras de AAV para Melhorar a Produção

Durante o curso dos presentes testes de produção com AAV em diversos meios e recipientes de cultura, a requerente tipicamente monitorizou as culturas com respeito a diversos parâmetros de crescimento e/ou metabólicos, tais como densidade celular, disponibilidade de glucose e aminoácidos e a produção de subprodutos metabólicos, tais como amônia e ácido láctico. Esses componentes podem ser facilmente monitorizados utilizando técnicas padrão, tais como ensaios de HPLC e enzimáticos, como descrito na técnica.

Como descrito nos Exemplos abaixo, a requerente descobriu que determinados aminoácidos, particularmente aspartato e glutamato, eram rapidamente deplecionados em culturas em descontínuo e de perfusão. De facto, em diversas experiências em descontínuo e perfusão, a requerente observou que, nessas culturas, desde 90 a 99% do asp e glu disponível é substancialmente eliminado após 24 a 48 horas. Dado que, nesses meios, os níveis de asp e glu pareceram ser subóptimos, a requerente, por conseguinte, proporcionou quantidades adicionais de um ou ambos os aminoácidos. Técnicas de manutenção e optimização de cultura, tal como estas, têm sido rotineiramente aplicadas no contexto da bioprodução em grande escala (ver, e. g., Glacken, M.W. et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 28: 1376-1389, 1986; Glacken, M.W., *Bio/Technology* 6: 1041-1050, 1988; Bibila, T.A., et al., *Biotechnol. Prog.*, 10:87-96, 1994; e Borys, M.C., et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 43: 505-514, 1994).

Surpreendentemente, a substituição destes aminoácidos deplecionados resultou numa queda acentuada na produção de AAV. Por exemplo, em experiências descritas abaixo, a suplementação do meio padrão (DMEM) com asp e glu adicional diminuiu a eficiência de produção em mais de uma ordem de grandeza (de cerca de 1800 partículas resistentes a DNase (DRP) por célula para cerca de 140 DRP por célula), embora a viabilidade fosse ligeiramente melhorada.

Outro componente comum dos meios para o crescimento de células produtoras de mamífero é um componente de soro, tal como soro bovino fetal (FBS), que é tipicamente incluído em meios a um nível de cerca de 10%. Como descrito abaixo, quando o nível de soro para produção de AAV foi aumentado (para 20%), a

produção de vector de AAV caiu em mais de 2 vezes. Em contraste, quando as células foram submetidas a níveis crescentemente inferiores de soro, a produção de vector de AAV aumentou drasticamente. Por exemplo, quando os níveis de soro foram reduzidos para um décimo dos níveis de partida normais (*i. e.*, para 1%), a produção de vector aumentou em mais de 4 vezes.

Sem se desejar estar ligado a uma teoria, parece, agora, que stressar as células produtoras, metabolicamente ou por outro meio, como descrito abaixo, pode melhorar drasticamente a produção de vector de AAV.

O stress pode ser eficazmente caracterizado e testado com base no efeito negativo da condição de stress ou agente de stress no crescimento e/ou metabolismo celulares. Com efeito, o stress pode ser alcançado pela introdução de qualquer condição ou agente que iniba o crescimento e/ou metabolismo celulares, ou pela alteração do nível de uma condição ou agente preexistente, de modo a que se torne suboptimal com respeito ao crescimento e/ou metabolismo celulares. Uma grande variedade dessas condições é conhecida e/ou evidente, incluindo stress nutricional (um ou mais nutrientes presentes a níveis suboptimais para crescimento e/ou metabolismo), stress de temperatura (temperatura suboptimal que pode incluir o cultura das células a temperaturas mais baixas ou mais elevadas, ou submeter as células a choques temporários de temperatura, tais como choque de frio ou choque de calor), stress osmótico (nível osmótico suboptimal que pode ser hiposmótico ou hiperosmótico), stress de pH (pH suboptimal que pode ser ácido ou alcalino), stress de arejamento (*e. g.*, níveis suboptimais de troca de oxigénio ou gás), stress mecânico (*e. g.*, stress de cisalhamento como ocorre na mistura da cultura), stress de radiação e stress

tóxico (presença de uma ou mais substâncias químicas ou outros agentes que inibem o crescimento e/ou metabolismo). Com a maioria, se não a totalidade, desses agentes e condições, é possível submeter as células a continuamente ou temporariamente. A título de ilustração, no caso de stress de temperatura, as células podem ser cultivadas a temperaturas que estão acima ou abaixo do óptimo (tipicamente, o óptimo é, aproximadamente, a temperatura corporal normal do animal a partir do qual as células são derivadas), ou as células podem ser submetidas a choque temporário de temperatura, tais como um choque de frio ou um choque de calor. Os exemplos presentemente preferidos dessas condições de stress incluem: stresses nutricionais, tais como limitação de aminoácido ou soro, a alteração de níveis de arejamento e agitação, a alteração de níveis osmóticos (e. g., utilizando hidratos de carbono não metabolizáveis, tal como sorbitol) e inclusão de agentes químicos, tais como ácidos carboxílicos alifáticos saturados (e. g., ácidos propiónico, butírico, isobutírico, valérico e capróico e os seus sais com bases orgânicas ou inorgânicas), diaminas N,N'-diaciladas (tais como pentametenobisacetamida, hexametenobisacetamida e heptametenobisacetamida), compostos de enxofre orgânico (tal como dimetilsulfóxido) e glucocorticóides (tais como hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, aldosterona, triamcinolona e cortexolona). Outros desses agentes incluem agentes genotóxicos, tais como carcinogénios químicos, UV, choque de calor, inibidores metabólicos da síntese de ADN (e. g., hidroxiureia, metotrexato, afidicolina, fármacos que afectam topoisomerasas (e. g., amsacrina, camptecina, etoposido e novobiocina).

Como notado acima, as células produtoras também podem ser submetidas a stress subletal pela alteração do pH. Como exemplificado abaixo, a requerente verificou que o stress de pH induzido pela elevação do pH médio aumentou, não apenas o AAV, mas também causou um desvio drástico nas proporções relativas de AAV que foram libertadas para o meio de cultura. Como ainda descrito abaixo, esta técnica pode ser, deste modo, utilizada para facilitar a purificação de AAV, assim como melhorar a produção.

Os processos ilustrativos para optimização da produção de AAV pelo emprego de diversas condições de stress são proporcionados abaixo; como são os resultados demonstrando que a aplicação de uma variedade de diferentes condições de stress pode ser utilizada para melhorar eficazmente os níveis de produção de AAV.

Os métodos da presente invenção envolvem a incubação de uma célula produtora de AAV, sob condições que são permissivas para replicação de AAV e que compreendem a indução de stress subletal no AAV que a presente invenção apresenta nas reivindicações anexas.

Utilização de rAAV para terapia génica

São aqui descritas composições de vector compreendendo polinucleótidos com uma sequência genética terapeuticamente relevante. Os vectores virais de AAV desta divulgação podem ser utilizados para administração a um indivíduo para efeitos de terapia génica. As doenças adequadas para terapia génica incluem mas não estão limitadas às induzidas por infecções virais,

bacterianas ou parasíticas, diversas malignidades e condições hiperproliferativas, condições auto-imunes e deficiências congénitas.

A terapia génica pode ser conduzida para melhorar o nível de expressão de uma proteína particular, dentro ou segregada pela célula. Os vectores desta divulgação podem ser utilizados para alterar geneticamente as células, para marcação génica, substituição de um gene em falta ou defeituoso, ou inserção de um gene terapêutico. Alternativamente, pode ser proporcionado um polinucleótido à célula que diminua o nível de expressão. Este pode ser utilizado para a supressão de um fenótipo indesejável, tal como o produto de um gene amplificado ou superexpresso durante o curso de uma malignidade, ou um gene introduzido ou superexpresso durante o curso de uma infecção microbiana. Os níveis de expressão podem ser diminuídos proporcionando um polinucleótido terapêutico compreendendo uma sequência capaz, por exemplo, de formar um híbrido estável com o gene ou transcrito de ARN alvo (terapia anti-sentido), capaz de actuar como uma ribozima para clivar o ARNm relevante ou capaz de actuar como um engodo para um produto do gene alvo.

É de interesse particular a correcção do defeito genético da fibrose cística, proporcionando um regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR) funcionando adequadamente para o epitélio das vias respiratórias. Afione *et al.* (*J. Virol.* 70:3235, 1996) e Conrad *et al.* (*Gene Therapy*: no prelo. 1996) mostraram transferência génica de CFTR estável *in vivo* para o pulmão de primata, utilizando vectores de AAV de dose única. Há uma variedade de polipéptidos de CFTR que são capazes da reconstrução de deficiências funcionais de CFTR em células derivadas de doentes de fibrose cística. Rich *et al.*,

Science, 253: 205 (1991) descreveram um derivado de CFTR desprovido dos resíduos de aminoácido 708-835, que era capaz de transportar cloreto e capaz de corrigir um defeito de CFTR de ocorrência natural. Egan *et al.*, *Nature*, 358:581 (1992) descreveram outro derivado de CFTR (compreendendo cerca de 25 aminoácidos de uma proteína não relacionada, seguidos da sequência de CFTR nativo começando no resíduo 119) que também era capaz de restaurar as características electrofisiológicas de CFTR normal. Arispe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1539 (1992) mostraram que um fragmento de CFTR, compreendendo os resíduos 433-586, era suficiente para reconstituir um canal de cloreto correcto em bicamadas lipídicas. Sheppard *et al.*, *Cell* 76: 1091 (1994) mostraram que um polipéptido de CFTR, truncado no resíduo 836 até cerca de metade do seu comprimento, ainda era capaz de construir um canal de cloreto regulado. Deste modo, os vectores de AAV com sequências codificantes para a proteína de CFTR nativa e os seus mutantes e fragmentos, são todos casos preferidos desta divulgação.

Também é de interesse particular a correcção do gene supressor tumoral p53, localmente defeituoso em determinados tipos de tumor, proporcionando um gene p53 funcionando adequadamente para o local do tumor (Huyghe *et al.*, *Human Gene Therapy* 6:1403,1995).

As composições desta divulgação podem ser utilizadas *in vivo* assim como *ex vivo*. A terapia génica *in vivo* compreende administrar os vectores desta divulgação directamente a um indivíduo. As composições farmacêuticas podem ser proporcionadas como soluções ou suspensões líquidas, como emulsões ou como formas sólidas, adequadas para dissolução ou suspensão em líquido, antes da utilização. Para administração no aparelho

respiratório, um modo preferido de administração é por aerossol, utilizando uma composição que proporciona um aerossol sólido ou líquido, quando utilizado com um dispositivo aerossolizador apropriado. Outro modo preferido de administração no aparelho respiratório é a utilização de um broncoscópio de fibra óptica flexível para instilar os vectores. Tipicamente, os vectores virais estão num tampão apirogénico farmacêuticamente adequado, tal como solução salina equilibrada de Ringer (pH 7,4). Embora não requerido, as composições farmacêuticas podem, opcionalmente, ser proporcionadas na forma de dosagem unitária adequada, para administração de uma quantidade precisa.

Dependendo dos objectivos de tratamento, é administrada uma quantidade eficaz de vírus. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em doses únicas ou divididas. Onde uma baixa percentagem de transdução possa curar uma deficiência genética, então o objectivo de tratamento é, em geral, cumprir ou exceder este nível de transdução. Em alguns casos, este nível de transdução pode ser alcançado por transdução de apenas cerca de 1 a 5% das células alvo mas é, de um modo mais típico, 20% das células do tipo de tecido desejado, habitualmente, pelo menos, cerca de 50%, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 80%, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 95% e, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, cerca de 99% das células do tipo de tecido desejado. Como um guia, o número de partículas de vector presente numa dose única administrada por broncoscopia será, em geral, de, pelo menos, cerca de 1×10^8 e é, de um modo mais típico, 5×10^8 , 1×10^{10} e, em algumas ocasiões, 1×10^{11} partículas, incluindo partículas resistentes a DNase e susceptíveis a DNase. Em termos de partículas resistentes a DNase, a dose será, em geral, entre 1×10^6 e 1×10^{14} partículas, de um modo mais geral entre cerca de

1×10^8 e 1×10^{12} partículas. O tratamento pode ser repetido tão frequentemente quanto de duas em duas ou três em três semanas, como requerido, embora o tratamento uma vez em 180 dias possa ser suficiente.

A eficácia da alteração genética pode ser monitorizada por vários critérios. As amostras removidas por biopsia ou excisão cirúrgica podem ser analisadas por hibridação *in situ*, amplificação por PCR utilizando sondas específicas de vector, protecção de RNase, imuno-histologia ou contagem celular imunofluorescente. Quando o vector é administrado por broncoscopia, podem ser realizados testes de função pulmonar e a lavagem brônquica pode ser avaliada para a presença de citocinas inflamatórias. O indivíduo tratado também pode ser monitorizado para características clínicas e para determinar se as células expressam a função pretendida a ser transmitida pelo polinucleótido terapêutico.

A decisão de se utilizar terapia *in vivo* ou *ex vivo* e a selecção de uma composição, dose e via de administração particulares irá depender de um número de diferentes factores, incluindo mas não limitados a características do estado e do indivíduo a ser tratado. A avaliação dessas características e da concepção de um regime terapêutico apropriado é, em última análise, da responsabilidade do médico que prescreve.

A descrição anterior proporciona, *inter alia*, métodos para a produção de preparações de elevado título de vectores de AAV recombinante que são substancialmente isentos de vírus auxiliar (e. g., adenovírus) e proteínas celulares.

Os exemplos apresentados abaixo são proporcionados como um guia adicional para um profissional com conhecimentos gerais na técnica e não têm, em nenhuma instância, como objectivo serem limitativos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

PRODUÇÃO ILUSTRATIVA DE VECTOR DE AAV RECOMBINANTE UTILIZANDO UM VÍRUS AUXILIAR DE TIPO SELVAGEM (ADS) E UM VÍRUS AUXILIAR SENSÍVEL À TEMPERATURA (AD TS149)

Este exemplo ilustra a utilização de um vírus auxiliar de tipo selvagem (Ad5) e um vírus auxiliar sensível à temperatura (Ad ts149), para proporcionar funções de auxiliar para a replicação de uma partícula de vector de AAV recombinante compreendendo um gene terapêutico modelo.

O plasmídeo ptgAAVCF consiste na ITR esquerda de AAV2; um ADNc regulador transmembranar de fibrose cística de comprimento completo; uma sequência de poliadenilação sintética baseada na sequência de poliadenilação de globina β de murganho; sequências de AAV2 a jusante das sequências codificantes de *cap*; e na ITR direita de AAV2 numa estrutura do plasmídeo pBR322 (Afione *et al.*, 1996). O plasmídeo de empacotamento pGEM-RSS foi derivado do plasmídeo pHIVrep (Antoni *et al.*, 1991) e consiste nas regiões U3 e R da LTR de HIV-1; as regiões *rep* e *cap* de AAV2, incluindo os promotores p19 e p40; sequência dos plasmídeos pBR322 e pGEM para replicação e selecção bacterianas;

e uma pequena região de ADN celular repetitivo Alu humana a montante da LTR de VIH.

O adenovírus de tipo 5 foi cultivado a partir de um stock obtido da American Type Culture Collection (Rockville, Md). O Ad5ts149 (Ensinger *et al.*, *J. Virol.* 10:328, 1972) foi obtido de Harold S. Ginsberg.

Os stocks de trabalho de Ad5 e Ad5ts149 (ts149) foram produzidos a 37 °C e 32 °C; respectivamente, pela infecção de células 293-1, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5 e 1; respectivamente. Após 4 horas, as culturas foram realimentadas com meio fresco e incubadas, a 37 °C, numa incubadora de CO₂ a 10% humidificada. Após setenta e duas horas, as células foram removidas, sedimentadas a 1000 g, a 15 °C, e ressuspensas em PBS contendo 0,1 g/L de MgCl₂ e CaCl₂ a 0,1 g/L. A suspensão celular foi, depois, congelada e descongelada, três vezes, submetida a cisalhamento, três vezes, através de uma agulha de calibre 18 e clarificada por centrifugação a 1000 g, a 15 °C. O lisado clarificado foi, depois, tratado com DNase I, a uma concentração final de 2 mg/mL, durante 30 minutos, a 37 °C. O lisado tratado foi depositado em camadas num gradiente de etapas descontínuo de CsCl em água compreendendo 4,0 mL de CsCl (1,25 g/cm¹), depositado em camadas sobre 2,0 mL de CsCl (1,40 g/cm³) em água e centrifugado a 35000 RPM, durante 1 a 2 horas, num rotor SW41 Beckman. A banda de adenovírus de cada tubo foi removida, agregada e diluída em CsCl a 1,35 g/cm³ em água e centrifugada, de um dia para o outro, a 35000 RPM, num rotor SW55 Beckman. A banda de adenovírus foi agregada, ajustada para glicerol a 10% e dialisada extensivamente contra tampão de Tris a 10 mM, pH 7,5, suplementado com MgCl₂ a 1,0 mM e glicerol a 10%.

As células 293-1 (ATCC CRL 1573) foram mantidas em T-Hasks, numa incubadora de CO₂ a 10% humidificada, em meio com elevado teor de glucose de DMEM (JRH), suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS, Hyclone). Para este exemplo, as células 293-1 foram inoculadas a $4,4 \times 10^4$ células/cm² em frascos de cultura de tecidos com DMEM suplementado com FBS a 10% e L-glutamina a 2,0 mM e incubadas, durante vinte e quatro horas, a 37 °C, numa incubadora de CO₂ a 10% humidificada.

As células (cerca de 10⁷ células por frasco) foram, depois, infectadas com stocks de trabalho de Ad5 ou ts149, durante 1 hora, a uma MOI de 5, seguido de transfecção transiente de vector e plasmídeos de empacotamento. A co-transfecção transiente do plasmídeo vector ptgAAVCF e plasmídeo auxiliar pGEM-RS5 foi realizada utilizando LIPOFECTAMINE™ (Gibco). Nesse processo, 37,5 µg de cada plasmídeo, juntamente com 150 µL de LIPOFECTAMINE™, foram misturados e diluídos em 4,75 mL de MEM isento de soro. O inóculo de adenovírus foi removido e a mistura de plasmídeo-LIPOFECTAMINE™ foi adicionada às células e incubada, durante quatro horas, numa incubadora de CO₂ a 5%, à temperatura apropriada. A mistura de plasmídeo-LIPOFECTAMINE™ foi removida da cultura após quatro horas e substituída com meio fresco.

As células infectadas com vírus de tipo selvagem foram cultivadas a 37 °C e as células infectadas com Adts149 foram incubadas a 39,5 °C. Após 72 horas, as células foram recolhidas, sedimentadas e ressuspensas em Tris a 10 mM, pH 7,5. A suspensão foi, depois, lisada por sonicação num banho de gelo-água, utilizando um sonicador de copo-trompa Branson, utilizando quatro pulsos de 15 segundos e ensaiada para produção de rAAVCF e adenovírus.

EXEMPLO 2

QUANTIFICAÇÃO DE TÍTULOS DE RAAV E ADENOVÍRUS EM PREPARAÇÕES DE VECTOR

Os lisados celulares do exemplo anterior foram ensaiados para produção do vector de rAAVCF por ensaio de replicação de C37 e analisados para produção de adenovírus por hibridação de transferência de *slot*.

HeLa C37 foi construído para permitir a expressão indutível de proteínas Rep de AAV para replicação de vector de rAAV. Resumidamente, foi construída uma cassette de expressão de Rep/Cap de AAV, consistindo no promotor de metalotioneína I de murganho, genes *rep* e *cap* de AAV2 e sítio de terminação de transcrição de AAV. Também foi incluído no plasmídeo um gene de resistência a neomicina, sob o controlo do promotor precoce de SV40, intrão T pequeno de SV40 e o sinal de poliadenilação de SV40. As células HeLa foram transfectadas com o plasmídeo e os clones foram seleccionados em G418. Um painel de clones foi rastreado por um ensaio de amplificação de vector de rAAV. Um clone, C37, demonstrou amplificação consistente e dependente de dose do vector de rAAV após transdução e infecção de adenovírus.

A detecção do vector replicante é alcançada por isolamento de ADN, seguida de hibridação a uma sonda de CFTR. Em detalhe, as células HeLa C37 foram inoculadas a $4,4 \times 10^4$ células/cm² em frascos de cultura de tecidos com DMEM suplementado com FBS a 10% e L-glutamina a 2,0 mM e incubadas, durante vinte e quatro horas, a 37 °C, numa incubadora de CO₂ a 5% humidificada. As células foram, depois, inoculadas com adenovírus (MOI = 5) e diluições de amostra de rAAVCF, durante 72 horas. As células

foram recolhidas por raspagem e preparadas para análise de transferência de Southern. O ADN celular total foi preparado, digerido com EcoRI, submetido a electroforese num gel de agarose a 1%, transferido para uma membrana de nylon 66, seguido de hibridação com um fragmento de restrição de ADNc de CFTR humano marcado com ^{32}P . Esta sonda detecta um fragmento de, aproximadamente, 1,5 kb do vector de AAVCF (correspondendo ao fragmento de EcoRI previsto de 1,488 kb). A replicação de vector foi quantificada relativamente a uma banda de CFTR genómico endógeno e é expresso como unidades de replicação. Uma unidade de replicação (RU) é definida como uma intensidade de sinal equivalente à da banda de CFTR genómico endógeno que tem, aproximadamente, 1,8 kb. Em algumas experiências, a regressão linear de padrões de vector conhecidos serialmente diluídos foi utilizada para extrapolar e calcular a concentração de vector nas amostras.

O ensaio de transferência de *slot* de ADN de adenovírus foi conduzido como se segue. Aliquotas de amostras foram desnaturadas em NaOH a 0,4 M, EDTA a 10 mM, com ADN de esperma de salmão a 1,0 µg/mL, a 65 °C. As amostras e padrões de adenovírus foram diluídos e filtrados sobre membranas de nylon utilizando um colector de transferência de *slot* e lavados com NaOH a 0,4 M. O filtro foi hibridado com uma sonda marcada com ^{32}P correspondendo à sequência génica ElA de adenovírus. O genoma integral de Ad5 está disponível no Genbank, com o número de acesso X02996. A requerente utilizou um fragmento SspI-XbaI de 1 kb (correspondendo aos nucleótidos 339-1339) e analisou as transferências num fosforimager (Molecular Dynamics). Um equivalente de genoma foi considerado como sendo equivalente a uma partícula de adenovírus.

A **Figura 1** mostra os resultados do ensaio de replicação para o vector de rAAVCF, em lisados preparados com Ad5 ou ts149, às temperaturas permissiva (37 °C) e não permissiva (39,5 °C). A produção de vector recombinante foi suportada por ts149, a 39,5 °C, mas a produtividade foi, aproximadamente, 2 a 3 vezes mais baixa do que Ad5.

A **Figura 2** mostra os resultados do ensaio de transferência de *slot* para determinar a quantidade de adenovírus. A produção de genomas de adenovírus foi reduzida 3-4 logs, por utilização do mutante sensível à temperatura, em comparação com o tipo selvagem.

EXEMPLO 3

OPTIMIZAÇÃO DA FUNÇÃO DE AUXILIAR PARA MELHORAR A PRODUÇÃO DE RAAV

Este exemplo ilustra diversas tentativas para melhorar o nível de rAAV obtido quando se utiliza vírus auxiliar sensível à temperatura. O aumento dos níveis de infecção do vírus auxiliar foi inútil, mas o ajuste da cinética foi surpreendentemente eficaz.

Os efeitos do aumento da multiplicidade de infecção na produção de vector foram avaliados em primeiro lugar. As células 293-1 foram infectadas com Ad5 a uma MOI de 5, ou ts149 a diversas MOI, seguido de co-transfecção transiente com vector e plasmídeos de empacotamento. Após 72 horas, as células foram lisadas e ensaiadas para produção do vector de rAAVCF por ensaio de replicação de vector C37 e analisadas para produção de

adenovírus por hibridação de transferência de *slot*. Um intervalo de tempo adicional de 96 horas foi recolhido para células infectadas com ts149, a uma MOI de 5.

A Figura 3 mostra os resultados do ensaio de replicação de rAAVCF, conduzido em lisados celulares preparados com ts149, a diversas MOI. O aumento da MOI do ts149 não restaurou a produtividade de vector para níveis observados com Ad5 (como mostrado pela intensidade da banda de hibridação de 1,4 kb). Contudo, um nível mais elevado de produção de vector foi observado no intervalo de tempo de 96 horas. A concentração de ts149 no lisado, detectada por análise de transferência de *slot*, aumentou com MOI crescente mas, comparada com Ad5, foi ainda 3 a 4 logs inferior.

Após a observação da produtividade de vector aumentada com ts149 às 96 horas na experiência anterior, foi realizado um estudo do ao longo do tempo e cinética de produção. As células 293-1 foram infectadas com Ad5 ou ts149, a uma MOI de 5, seguido de co-transfecção transiente com vector e plasmídeos de empacotamento. As células infectadas com Ad5 e ts 149 foram cultivadas, a 37 °C e 39,5 °C, respectivamente, durante seis dias. Os lisados dos dias 3, 4, 5 e 6 foram ensaiados para produção de vector, por ensaio de replicação de vector e analisados para adenovírus, por hibridação de transferência de *slot*.

A **Figura 4** ilustra a cinética da produção de vector. As barras a cheio representam lisados produzidos utilizando Ad5 de tipo selvagem como auxiliar; as barras a sombreado representam lisados produzidos utilizando ts149 como auxiliar. A produção de vector máxima quando se utiliza Ad5 foi $\sim 2,0 \times 10^6$ RU/mL, com

pico no dia 4. Neste intervalo de tempo, a produção de vector obtida utilizando ts149 foi inferior a $\sim 0,3 \times 10^6$ RU/mL. No dia 5, contudo, houve uma drástica alteração na eficácia relativa dos dois vírus auxiliares. A produção de vector suportada por Ad5 diminuiu para abaixo de $0,3 \times 10^6$ RU/mL. Em contraste, a produção de vector suportada por ts149 aumentou para mais de 2×10^6 RU/mL. Os níveis de genoma de adenovírus observados quando se utiliza ts149 foram significativamente mais baixos do que com Ad5.

EXEMPLO 4

ENSAIO DE TÍTULOS VIRAIS E TÉCNICAS DE ENSAIO DE ALTA CAPACIDADE

Os stocks de adenovírus sensível à temperatura e de tipo selvagem utilizados nos exemplos anteriores foram produzidos em células 293-1 em frascos de cultura de tecidos. Neste exemplo, os níveis de adenovírus sendo produzidos por células 293-1 foram quantificados por ensaio de ponto final de TCID₅₀ ou ensaio de infecciosidade.

O ensaio de TCID₅₀ foi conduzido como se segue: $1,0 \times 10^3$ células 293-1 foram plaqueadas em placas de microtitulação de 96 poços e infectadas com diluições em série de stock de adenovírus e deixadas a incubar, a 37 °C, numa incubadora de CO₂ a 5% humidificada. Oito replicados de 100 µL de

cada diluição foram inoculados sobre as células. Três dias após infecção, as células foram fixas com metanol, lavadas com PBS e coradas com anticorpo anti-hexão conjugado a FITC (Biodesign), seguido de coloração de iodeto de propídio para visualizar os núcleos celulares. Após enxaguamento com PBS, a placa foi examinada sob um microscópio fluorescente e classificada para a presença de células contendo hexão. O título no ponto final foi calculado utilizando uma distribuição de Poisson. Uma diluição de vírus que produz 50% de amostras replicadas positivas para hexão tem 0,5 IU/100 µL de inóculo. O título infeccioso é o produto do inverso desta diluição. 0,5 IU/100 µL e 10 (factor de conversão para mL), para dar o título infeccioso final por mL.

Um ensaio de infecciosidade de microtitulação de alta capacidade para medir o vírus infeccioso foi conduzido como se segue. Aliquotas (10 µL) de sobrenadantes isentos de células serialmente diluídas foram inoculadas sobre células HeLa cultivadas em placas de microtitulação de 96 poços. Após três dias, as células infectadas foram tratadas e lisadas com uma solução de desnaturação (adição de 1/10 de volume de NaOH a 4,0 M, ADN de espermatozoides de salmão a 10 µg/mL e EDTA a 100 mM). O lisado foi transferido para uma placa Silent Monitor BiodyneB (Pall) e filtrado a vácuo sobre a membrana de nylon. A membrana foi lavada, desnaturada, hibridada com fragmento de restrição de ADNc de E1A de adenovírus marcado com ³²P e analisada num fosforimager (Molecular Dynamics). A análise de regressão linear de padrões de adenovírus serialmente diluídos foi utilizada para calcular títulos de adenovírus infeccioso nas amostras, utilizando padrões de adenovírus titulados pelo ensaio de TCID₅₀.

A produtividade específica de vírus foi calculada pela normalização de títulos de vírus infeccioso no lisado para número de células no momento da infecção. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1: Produção de Adenovírus			
Adenovírus	Linha celular	Produtividade específica (IU/célula)	Ensaio
Ad5	293-1	125	TCID ₅₀
	HeLa S3	400	TCID ₅₀
Ad5ts149	293-1	10	TCID ₅₀
	293-1	16	infecciosidade de microtitulação
	293-1	15	infecciosidade de microtitulação
	293-1	10	infecciosidade de microtitulação

Estes resultados mostram que a produção específica de Adts149 em células 293-1 foi um a dois logs mais baixa do que Ad5.

Uma preparação de vírus de Ad5 de título conhecido mostrou uma gama linear, prolongando-se desde 12,5 a 500 IU/poço, com base na regressão linear no ensaio de infecciosidade de microtitulação.

A combinação de um ensaio de infecciosidade viral com um formato de matriz de microtitulação, como descrito acima, resultou numa técnica que é rápida e quantitativa e que é altamente adequada à automatização.

O ensaio de infecciosidade de alta capacidade, como descrito acima, também pode ser aplicado ao ensaio de outros vírus (e. g.. rAAV e wtAAV). O ensaio pode ser realizado, essencialmente como descrito acima, utilizando células de mamífero apropriadas (e. g., células HeLa C37 para rAAV ou células 293 para wtAAV) e sob condições permissivas para a replicação do vírus a ser ensaiado (e. g., na presença de vírus auxiliar para rAAV e wtAAV); e, depois, os lisados podem ser preparados e os ácidos nucleicos nos referidos lisados podem ser transferidos para uma membrana, como descrito acima. A hibridação da membrana contendo a matriz de agregados de ácidos nucleicos ligados (cada agregado sendo libertado das células do correspondente poço de cultura) é tipicamente realizada com uma sonda específica de vírus adequada (e. g., uma sonda específica para *rep* e/ou *cap* de AAV poderá ser utilizada para detectar wtAAV ou, no caso de um vector de AAV recombinante, poderá ser utilizada uma sonda específica para um transgene inserido).

O ensaio de infecciosidade de alta capacidade acima descrito exibiu uma resposta linear na determinação de títulos de rAAV, ao longo de uma gama relativamente alargada de concentrações. Por exemplo, quando uma preparação viral de título conhecido (como determinado por um ensaio de centro infeccioso modificado) foi serialmente diluída 1:2, partindo de 2400 unidades infecciosas ou "IU"/poço, e utilizada como um padrão para a determinação do título de duas preparações de tgAAVCF purificadas, de título desconhecido, cada qual foi

serialmente diluída 1:5, o ensaio de microtitulação mostrou uma gama linear prolongando-se desde 75 até 600 IU/poço, com base na regressão linear. A determinação do título de wtAAV utilizou, de um modo preferido, um formato de diluição limitante (por exemplo, quando oito diluições limitantes em série de uma preparação de wtAAV de título conhecido foram ensaiadas, o título determinado pelo ensaio de microtitulação foi essencialmente o mesmo que o determinado pelo ensaio de TCID₅₀ padrão, 3×10^9 IU/mL).

Com diluição limitante ou por comparação com um padrão conhecido, pode ser determinado um título de vírus infeccioso que corresponde aos títulos determinados por técnicas mais clássicas (e. g., o ensaio de centro infeccioso ou a análise de ponto final de 50% de TCID₅₀). Além da sua utilização na determinação de títulos virais, este ensaio de infecciosidade de alta capacidade tem muitas outras utilizações incluindo, mas não limitadas ao rastreio de linhas celulares permissivas ou não permissivas para replicação e infecciosidade virais (e. g., pela inclusão de diversas células de mamífero ou os seus variantes em poços diferentes de uma matriz de microtitulação); assim como o rastreio de agentes que afectam a replicação viral (e. g., pela inclusão de diversos agentes em diferentes poços de uma matriz de microtitulação, como descrito acima, e a determinação do efeito dos agentes no título infeccioso resultante do vírus). Entre outras coisas, a capacidade de rapidamente rastrear para agentes ou condições que melhoram a infecciosidade e/ou replicação virais é particularmente útil no contexto do desenvolvimento ou optimização da produção de vectores virais. Inversamente, a capacidade de rapidamente rastrear para agentes ou condições que reprimem a infecciosidade/replicação virais é

bastante útil no contexto da identificação de terapêutica antiviral.

EXEMPLO 5

DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS DE SUSPENSÃO PARA PRODUÇÃO DE VÍRUS AUXILIAR

O exemplo anterior mostra que os níveis de adenovírus sensível à temperatura produzidos por técnicas de cultura convencionais são baixos. Isto limita a capacidade para utilizar adenovírus sensível à temperatura como auxiliares na produção de vectores de AAV. O presente exemplo proporciona um método melhorado que permite a produção de adenovírus sensível à temperatura em quantidades muito superiores. Central ao melhoramento é a utilização de células hospedeiras cultivadas em cultura de suspensão.

O 293 N3S e HeLa S3 são variantes de suspensão das linhas celulares de rim embrionário humano 293-1 e carcinoma epitelóide humano HeLa: respectivamente. A cultura de suspensão foi realizada em frascos *spinner* de 500 mL (Bellco), com volumes de trabalho de 250 a 300 mL. As células HeLa S3 (ATCC 2.2-CCL) foram mantidas em DMEM/F-12 com HEPES a 15 mM, suplementado com FBS a 7,5% e L-glutamina a 2,0 mM. 293-1 N3S (Microbix Biosystems Inc.) foram submetidas a passagem em MEM Joklik, suplementado com FBS a 7,5% e L-glutamina a 2,0 mM. Os frascos *spinner* foram agitados a 50-65 RPM.

O desempenho de crescimento foi avaliado na seguinte experiência. 293 N3S e HeLa S3 foram serialmente submetidas a passagem em suspensão, em frascos *spinner* de 500 mL em replicado e o crescimento e viabilidade celulares foram monitorizados. Os frascos foram inoculados a densidades celulares de 2 a 5×10^5 células/mL e, depois, cultivados durante 2 a 3 dias. Para controlar para diferenças de densidade de sementeira, os níveis de duplicação de população (PDL) foram comparados para culturas em replicado. O PDL médio foi $2,0 \pm 0,49$ (média $\pm$ D.P.) e $1,1 \pm 0,62$ para HeLa S3 e 293 N3S; respectivamente ($n = 14$). Duplicações celulares mais elevadas foram consistentemente observadas com as células HeLa S3. A morfologia celular em suspensão foi drasticamente diferente para as duas linhas. As células HeLa cresceram como células únicas ou agregados pequenos. Em contraste, as células 293 N3S formaram agregados de grandes dimensões, de 50 a 100 células cada. Um número significativo de células não viáveis foi observado no centro dos agregados de grandes dimensões. Os stocks foram subcultivados por centrifugação, seguida de dissociação suave com uma pipeta, libertando as células não viáveis dos agregados. Em comparação com HeLa S3, as viabilidades de cultura iniciais de 293 N3S foram consistentemente inferiores.

Com base no crescimento celular, a viabilidade e morfologia em suspensão, a linha celular HeLa S3 foi seleccionada para desenvolvimento de processo adicional. Foram avaliados o crescimento e viabilidade a temperaturas permissivas. As células HeLa S3 foram semeadas em frascos *spinner* de 500 mL, a 5×10^5 células/mL, e monitorizadas diariamente, durante sete dias.

A **Figura 5** mostra a densidade celular viável (VCD) de células HeLa S3, cultivadas a 32 °C (quadrados) e 37 °C (círculos). As barras em torno do intervalo de tempo de 32 °C indicam a gama de valores observada em frascos *spinner* de 500 mL em replicado. As células cultivadas a 37 °C tiveram um pico a $2,5 \times 10^6$ células/mL no dia 5, ao passo que as células cultivadas a 32 °C tiveram um pico a 2×10^6 células/mL no dia 6. A viabilidade (determinada por exclusão de azul de tripano) foi, pelo menos, cerca de 90% durante todo o tempo.

A filtração de caudal tangencial ou caudal cruzado é uma técnica versátil para uma ampla variedade de aplicações biofarmacêuticas de grande escala, incluindo concentração ou remoção de células, concentração de macromoléculas e troca de meios/tampão. O processamento de caudal tangencial é requerido para concentração de células, para infecção e para recolha de células infectadas em grande escala.

O efeito do cisalhamento laminar na viabilidade celular em filtração de caudal tangencial foi avaliado pela concentração e diafiltração das células HeLa S3. As células HeLa S3 foram inoculadas a uma densidade de 4×10^5 células/mL em biorreactores de três litros Applikon e cultivadas até 2×10^6 células/mL em DMEM/F-12 com HEPES a 15 mM (JRH), suplementado com FBS a 7,5%, glutamina a 2,0 mM, 1 X MEM aminoácidos, 1 X MEM aminoácidos não essenciais, poliol F-68 Pluronic a 0,1% e glucose a 2 g/L. O volume de trabalho do biorreactor foi de dois litros. Oxigénio dissolvido, pH, temperatura e agitação foram controlados a 60% (relativamente à saturação de ar), 7,2, 37 °C e 100 rpm: respectivamente, utilizando o sistema controlador FERMCON™ (Scius Corporation).

As experiências de filtração de caudal tangencial foram realizadas com membranas de fibras ocas de éster de celulose misturadas (Microgon). O tamanho de poro e área de superfície foi 0,2 μ e 725 cm²; respectivamente. Um filtro de 0,2 μ foi seleccionado para reter as células permitindo, simultaneamente, a passagem de meios gastos. As células foram bombeadas (Cole Palmer) através do diâmetro interno das fibras ocas. As taxas de recirculação foram ajustadas para proporcionar taxas de cisalhamento de parede médias de 750 e 1500 s⁻¹. Uma vez estabelecido o caudal cruzado, o controlo de caudal de permeado de 30 e 90 mL/min; respectivamente, foi alcançado por uma bomba (Cole Palmer), localizada na linha de permeado. Durante a concentração celular, a recolha de permeado continuou até que o factor de concentração desejado foi alcançado. Durante a diafiltração dos meios, a alimentação entrando no biorreactor foi activada até que o factor troca de meio desejado foi alcançado. As células viáveis foram contadas antes e após cada tratamento.

A **Figura 6** mostra as curvas de crescimento de células HeLa S3 antes e após processamento de caudal tangencial numa experiência exemplificativa. Dois litros de células foram cultivados em biorreactores de 3 litros. No dia 3 (seta), as células foram concentradas sete vezes a partir do volume de trabalho de 2 litros, diafiltrado contra seis volumes de meio de crescimento e ajustadas para o volume de trabalho original. Os resultados mostram que as células não foram danificadas pelo cisalhamento de parede de 750 s⁻¹ (quadrados) e 1500 s⁻¹ (círculos) e continuaram a crescer até elevadas densidades celulares.

As culturas de suspensão de células HeLa S3 foram, depois, testadas como células hospedeiras para produção de ts149, ou a sua capacidade em 300 mL de cultura de suspensão foi investigada. As células HeLa S3 da cultura de suspensão de 300 mL (1×10^6 células/mL) foram centrifugadas, concentradas e infectadas com ts149 (MOI = 3). Após 1 hora, a cultura foi transferida para um frasco *spinner*, ressuspensa em meios e cultivada, durante sete dias, a 32 °C. As células HeLa S3 continuaram a crescer desde cerca de 1×10^6 células/mL no momento da infecção até cerca de 2×10^6 células/mL no dia 5. A viabilidade diminuiu para ~60% no dia 7.

A **Figura 7** mostra a produção de ts149 por culturas de células HeLa S3. A cultura foi amostrada diariamente e os lisados foram preparados por congelação-descongelação para análise de produção de vírus pelo ensaio de infecciosidade de adenovírus. A produção de vírus atingiu $\sim 4,5 \times 10^7$ IU/mL de cultura em torno do dia 3-5. No dia 7, as células foram recolhidas por centrifugação, ressuspensas em tampão de TMEG e lisadas por microfluidização (MF). O título infeccioso do lisado microfluidizado era comparável aos da amostra de lisado de congelação-descongelação, indicando que a recuperação por microfluidização era comparável aos métodos de congelação-descongelação.

EXEMPLO 6

MÉTODO DE PURIFICAÇÃO MELHORADO PARA A PRODUÇÃO DE UM VÍRUS AUXILIAR SENSÍVEL À TEMPERATURA (AD TS149)

A purificação utilizando gradientes de CsCl é onerosa para produção em grande escala. Este exemplo ilustra a purificação de ts149 por cromatografia de permuta iónica.

A cromatografia foi realizada numa estação de trabalho de cromatografia Perseptive Biosystem BIOCAD™. A resina utilizada foi um permutador aniónico fraco de polietilenoimina (PI) (POROS™ 50 PI). A coluna foi equilibrada com TMEG (Tris a 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ a 5 mM, EDTA a 1 mM, glicerol a 5%). A cromatografia foi monitorizada em linha para pH, condutividade e densidade óptica a 280 nm.

A suspensão de HeLa S3 infectada com ts149, a uma MOI de 2, foi recolhida e centrifugada. O sedimento foi ressuspenso em TMEG e lisado por cavitação, a 3000 PSI, utilizando um microfluidizador (Microfluidics). O lisado foi clarificado por filtração através de um filtro de seringa de 5 µ (Millex SV), seguido de filtro de seringa de 0,45 µ (Acrodisc). O lisado clarificado foi carregado sobre uma coluna de permuta aniónica POROS™ 50 PI, de 1,6 mL, corrido a 1 mL/min. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de TMEG com NaCl a 900 mM e o ts149 foi eluído com um gradiente linear desde 900 a 1300 mM de NaCl. As fracções de 0,5 mL foram recolhidas e ensaiadas por ensaio de infecciosidade e transferência de slot para a presença de adenovírus.

A Figura 8 mostra os resultados do ensaio de infecciosidade conduzido em fracções de coluna consecutivas. A maioria do adenovírus infeccioso verificou-se nas fracções 26 a 28, coincidente com o pico de absorvência eluindo a cerca de 100 ms a, aproximadamente, 25 minutos. O ts149 eluiu imediatamente antes do pico de grandes dimensões, a concentração de sal mais elevada. Os ensaios de infecciosidade e transferência de slot conduzidos em paralelo confirmaram que as partículas e vírus infeccioso estavam nas mesmas fracções de pico.

As fracções de lisado e pico de PI também foram ensaiadas para proteína total pelo método de Bradford. A concentração de proteína foi 1,8 mg/mL no lisado e inferior a 30,0 µg/mL no agregado de PI. Os viriões foram separados da maioria da proteína celular numa única etapa e eluídos como um único pico. Os viriões mostraram afinidade muito elevada para a matriz de PI, como evidenciado pela concentração de sal relativamente elevada requerida para os eluir da coluna.

Os métodos de produção em grande escala para vírus auxiliar sensível à temperatura podem incorporar todos os melhoramentos descritos nestes exemplos. Numa ilustração, a produção de vírus compreenderia as seguintes etapas:

- Cultura celular em biorreactor de suspensão
- Concentração/Troca de meio
- Infecção com vírus auxiliar
- Produção de vírus
- Recolha: Concentração/Diafiltração
- Lise por microfluidização
- Cromatografia de permuta iónica de PI
- Concentração/Diafiltração

- Filtração estéril

Este tipo de abordagem é inerentemente escalável e favorável às Boas Práticas de Fabrico actuais.

Ilustrações exemplificativas adicionais dessas técnicas são proporcionadas abaixo.

EXEMPLO 7

COMPARAÇÃO DE PROCESSOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE VÍRUS AUXILIAR

A. Produção e Processamento Ilustrativos de Primeira geração de Vírus Auxiliar

Num processo exemplificativo de "primeira geração" para produção de vírus auxiliar, as células de mamífero foram cultivadas em frascos 40 T225 e, depois, infectadas com Ad5, a uma MOI de cerca de 1. Após incubação, as células foram recolhidas por centrifugação e lisadas por congelação-descongelação e passagem através de uma agulha. O lisado foi submetido a tratamento com DNase I e, depois, corrido num gradiente de CsCl de etapas e gradiente isopícnico. O material purificado foi dialisado e esterilizado por filtração.

Utilizando este processo de primeira geração, a requerente obteve, aproximadamente, 1×10^{12} partículas (ou aprox. 1×10^{11} unidades infecciosas) desde 4×10^8 células.

B. Produção e Processamento Ilustrativos de Segunda Geração de Vírus Auxiliar

Num processo exemplificativo de "segunda geração" para produção de vírus auxiliar, as células de mamífero (HeLa S3) foram cultivadas em biorreactores de 10 litros e, depois, infectadas com Ad5 (da ATCC, subsequentemente purificado em placa em células 293, serialmente expandido em células HeLa S3 e duplamente purificado por centrifugação de gradiente de CsCl), a uma MOI de cerca de 1. Após incubação, as células foram concentradas e recolhidas por diafiltração e lisadas por microfluidização. O lisado foi submetido a tratamento com Benzonase (nuclease) e, depois, filtrado. O filtrado foi, depois, corrido numa coluna de permuta aniónica (PI), concentrado e diafiltrado e, finalmente, esterilizado por filtração.

Utilizando este processo de segunda geração, a requerente obteve, aproximadamente, 1×10^{14} partículas (ou aprox. 5×10^{12} unidades infecciosas) desde 1×10^{10} células.

A **Figura 9** ilustra os resultados do processamento a jusante de vírus auxiliar utilizando cromatografia de permuta aniónica, como descrito acima. Barras: Actividade viral medida num ensaio de infecciosidade; Traço cheio: A_{280} ; Tracejado: condutividade de tampão (ms).

Como é evidente a partir da comparação do fraccionamento da actividade viral versus absorvência A_{280} , estes processos de processamento resultaram numa separação substancial do vírus auxiliar da maior parte dos materiais contaminantes que seria esperado que contivessem proteínas e ácidos nucleicos celulares.

EXEMPLO 8

COMPARAÇÃO DE PROCESSOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE VECTORES DE AAV RECOMBINANTE

A. Produção e Processamento Ilustrativos de Primeira geração de rAAV

Num processo exemplificativo de "primeira geração" para produção de vector de rAAV, as células de mamífero foram cultivadas em frascos 40 T225 e, depois, infectadas com Ad5, a uma MOI de cerca de 5. Após incubação, as células foram recolhidas por centrifugação e lisadas por sonicação. O lisado foi submetido a tratamento com DNase I e, depois, corrido numa série de dois gradientes de CsCl. O material purificado foi dialisado e esterilizado por filtração. Utilizando este processo de primeira geração, a requerente obteve, aproximadamente, 5×10^6 unidades replicativas, RU, desde 4×10^8 células.

B. Produção e Processamento Ilustrativos de Segunda Geração de rAAV

Num processo exemplificativo de "segunda geração" para produção de vector de rAAV, as células de mamífero foram cultivadas em biorreactores de 10 litros e, depois, infectadas com Ad5, a uma MOI de cerca de 5. Após incubação, as células foram concentradas e recolhidas por diafiltração e lisadas por microfluidização. O lisado foi submetido a tratamento com Benzonase (nuclease) e, depois, filtrado. O filtrado foi, depois, corrido numa coluna de permuta aniónica, seguido de uma coluna de permuta catiónica. As fracções de eluente contendo AAV

foram agregadas, concentradas e diafiltradas e, finalmente, esterilizadas por filtração. Espera-se que este processo de segunda geração produza mais de 1×10^{11} unidades replicativas, RU, desde 1×10^{10} células.

A **Figura 10** mostra os resultados de fraccionamento sequencial em colunas de permuta iónica: em primeiro lugar, numa matriz de permuta aniónica (painel superior) e, depois, numa matriz de permuta catiónica (painel inferior). Barras: Actividade viral medida num ensaio de infecciosidade para Adenovírus ou AAV; Traço cheio: A_{280} ; (uma medida de proteína total) Tracejado: condutividade de tampão (ms). Como é evidente a partir das fracções analisadas, é possível obter-se níveis extremamente elevados de separação entre AAV e Adenovírus, assim como entre AAV e material absorvendo a A_{280} (largamente proteínas) utilizando as técnicas da presente invenção. Em particular, os resultados revelaram que os vectores de AAV podem ser retidos em colunas de permuta aniónica e catiónica e que a eluição diferencial de AAV, utilizando permuta aniónica e catiónica, resultou em capacidade drasticamente melhorada para separar o AAV da totalidade dos principais contaminantes de interesse (incluindo Adenovírus, assim como proteínas celulares).

Noutro processo exemplificativo de segunda geração para produção de vector de rAAV, o filtrado foi preparado como descrito acima e foi, depois, corrido numa coluna de permuta aniónica, seguido de agregação das fracções de eluente contendo AAV e, depois, submetendo os eluentes de permuta aniónica agregados a filtração de caudal tangencial (TFF). Como descrito abaixo, verificou-se que este processo de permuta aniónica para

TFF resulta numa preparação de AAV altamente concentrada e purificada.

A análise detalhada de AAV obtido utilizando essa tecnologia de segunda geração, utilizando técnicas como descritas acima e na matéria (incluindo ensaios de infecciosidade, análises de transferência de slot e electroforese em gel de SDS) proporcionou confirmação adicional de que o material foi de elevada qualidade e substancialmente isento de partículas de adenovírus contaminantes (e proteína e ADN de adenovírus) e também substancialmente isento de proteínas e ADN celulares contaminantes. Os géis de SDS revelaram a presença de bandas correspondendo a VP1, VP2 e VP3 (*i. e.*, as proteínas de cápside de AAV). Não foram visíveis outras bandas após coloração de Coomassie. Estes dados são consistentes com os resultados das análises de fraccionamento de coluna, como representados nas Figuras 10-11.

Como um processo ilustrativo de permuta aniónica para TFF, o seguinte é um processo exemplificativo de purificação e concentração, começando com um litro de fracções agregadas da cromatografia de permuta aniónica. Se desejado (como notado acima), este agregado pode ser submetido a inactivação por calor, seguida de uma etapa de filtração (*e. g.*, utilizando um filtro de 0,22 μ m). Para filtração de caudal tangencial (TFF), a requerente utilizou um sistema Pellicon XL higienizado, equipado com uma membrana de exclusão de peso molecular de 300000 que foi operado a 40/0 para pressões de admissão e escoamento. Um litro de material agregado foi carregado no sistema, a um volume de 500 mL e, depois, concentrado para 250 mL. A diafiltração foi realizada com 5 diavolumes (1250 mL) de Solução de Ringer Modificada + glicerol a 5%. Após diafiltração, o retentado foi

concentrado para um volume final de 14 mL. O tempo de processo total foi, aproximadamente, 3,25 horas (não incluindo tempo de higienização). Géis de SDS corados com prata, transferências de slot e ensaios de infecciosidade confirmaram que a preparação de AAV (que continha, aproximadamente, 10^{10} unidades replicativas) era substancialmente isenta de adenovírus contaminante, assim como proteínas adenovirais e celulares.

O seguinte são resultados de cada desses processos, mostrando título de vírus infeccioso e total como RU (unidades replicativas) e DRP (partículas resistentes a DNase) respectivamente:

300K TFF	Volume	RU Total	DRP Total	P/I	% de RU	% de DRP
Agregado de Entrada	1000 mL	$8,9 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{14}$	3483	100	100
Agregado Purificado	12,5 mL	$7,3 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{14}$	3103	82	74

Os dados apresentados na Figura 12 ilustram os resultados de uma corrida de produção de AAV utilizando filtração de caudal tangencial após uma coluna de permuta aniônica. O material purificado na coluna POROS 50 PI foi concentrado utilizando uma membrana de exclusão de peso molecular de 300000 (Millipore Pellicon XL). O material concentrado foi diafiltrado com cinco volumes sucessivos de Solução Salina Equilibrada de Ringer + glicerol a 5%. O material foi, depois, concentrado na membrana 10 vezes. A Figura 12, uma reprodução de meiotom de um gel de poliacrilamida de SDS corado com um corante de prata, mostra as proteínas de cápside de AAV altamente purificadas VP1

(85 kD), VP2 (72 kD) e VP3 (62 kD), no material em bruto purificado final.

Como é evidente a partir dos dados aqui apresentados, estas técnicas de segunda geração para a preparação e purificação de AAV resultam em métodos substancialmente melhorados, em comparação com os descritos anteriormente.

Os meios exemplificativos para cultura do auxiliar de Adenovírus e para a preparação de rAAV são detalhados na seguinte Tabela:

TABELA 2:

	<u>Meio de Ad</u>	<u>Meio de rAAV</u>
SAIS INORGÂNICOS		
CaCl	116,61	
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,00125	0,00125
Fe (NO ₃) 3*9H ₂ O	0,05	0,05
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,417	0,417
KCl	311,8	311,8
MgCl ₂	28,61	
MgSO ₄	48,84	
NaCl	*	*
NaHCO ₃	2200	2200
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	62,5	62,5
Na ₂ HP0 ₄	71,02	71,02
Zn ₂ SO ₄ *7H ₂ O	0,4315	0,4315

(continuação)

	<u>Meio de Ad</u>	<u>Meio de rAAV</u>
OUTROS COMPONENTES		
Glucose	4500	4500
HEPES	3575	3575
Hipoxantina Na	2,39	2,39
Ácido linoleico	0,042	0,042
Ácido lipóico	0,105	0,105
Vermelho de Fenol, Sal de Na		
Putrescina•2HCl	0,081	0,081
Piruvato de Sódio	55	55
Poliol F-68 Pluronic	100	100
AMINOÁCIDOS		
L-Alanina	4,455	4,455
L-Arginina•HCl	273,9	273,9
L-Asparagina•H2O	22,5	22,5
L-Aspártico	19,95	19,95
L-Cisteína•HCl•H2O	17,56	17,56
L-Cistina•2HCl	52,29	52,29
Ácido L-glutâmico	22,05	22,05
L-Glutamina	657	657
Glicina	26,25	26,25
L-Histidina•HCl•H2O	73,48	73,48
L-Isoleucina	106,97	106,97
L-Leucina	111,45	111,45
L-Lisina•HCl	163,75	163,75
L-Metionina	32,34	32,34

(continuação)

	<u>Meio de Ad</u>	<u>Meio de rAAV</u>
L-Fenilalanina	68,48	68,48
L-Prolina	17,25	17,25
L-Serina	36,75	36,75
L-Treonina	101,05	101,05
L-Triptofano	19,22	19,22
L-Tirosina	91,79	91,79
L-Valina	99,65	99,65
VITAMINAS		
d-Biotina	0,00365	0,00365
D-Ca Pantotenato	2,24	1,00
Cloreto de Colina	8,98	8,98
Ácido Fólico	2,65	2,65
mio-inositol	12,6	12,6
Niacinamida	2,0185	2,0185
Piridoxal•HCl	2	2
Piridoxina•HCl	0,031	0,031
Riboflavina	0,219	0,219
Tiamina•HCl	2,17	2,17
Timidina	0,365	0,365
Vitamina B12	0,68	0,68
* adicionar quantidade apropriada de NaCl para osmolalidade de 300 mOsM (+ ou - 20 mOsM)		

C. Purificação de Vector de AAV Utilizando Cromatografia de Sulfato de Heparina

Como discutido acima, as técnicas cromatográficas podem ser empregues para posterior purificação e concentração das preparações de AAV de acordo com a presente divulgação, incluindo a presente invenção. A título de ilustração, uma preparação de AAV que esteja na forma em bruto (e. g., lisado), ou que foi eluída de uma coluna de permuta aniónica ou catiónica e/ou concentrada por filtração de caudal tangencial pode ser purificada por ligação a uma coluna compreendendo sulfato de heparina. O AAV pode ser, depois, eluído dessa coluna utilizando um tampão contendo um sal (e. g., um gradiente linear de NaCl).

Como ilustrativo da utilização da cromatografia de sulfato de heparina, o AAV obtido de um agregado de "PI" (como descrito abaixo no Exemplo 9) foi, em primeiro lugar, concentrado quatro vezes e diafiltrado em TMEG + NaCl a 100 mM, utilizando uma membrana de filtração de caudal tangencial de 300 K. O concentrado foi, depois, injectado numa coluna de sulfato de heparina de 1 mL (coluna "Hi-Trap Heparin" Pharmacia) e eluído utilizando um gradiente linear de NaCl.

A Figura 13 é um cromatograma mostrando a concentração resultante de AAV na coluna de sulfato de heparina. O pico acentuado em absorvência a 280 nm (eixo esquerdo), a cerca de 18 minutos de tempo de eluição, representa a fracção de AAV como eluída a partir de sulfato de heparina, com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M (condutividade em mS mostrada no eixo direito).

EXEMPLO 9

PRODUÇÃO E TESTE DO VECTOR DE AAV RECOMBINANTE

Noutro conjunto de corridas de produção, a requerente utilizou $3-4 \times 10^9$ células cultivadas numa Fábrica Celular, utilizando DMEM + FBS a 10% como meio de crescimento. As células foram infectadas com Ad, a uma MOI de cerca de 20, e recolhidas às 72 horas pós-infecção. As células recolhidas foram suspensas em TMEG + NaCl, a uma concentração de cerca de 5×10^6 células/mL. Após lise mecânica (microfluidização, 2 passagens a 8000 psi), os lisados foram tratados com Benzonase (25 unidades/mL, 37 graus C, uma hora) e, depois, filtrados através de um filtro de 5 micron (Pall Profile II).

Como uma coluna de permuta aniónica exemplificativa, a requerente utilizou a coluna POROS 50 PI (disponível de Perseptive Biosystems). Resumidamente, o filtrado foi carregado sobre a coluna em cerca de 100 mL e eluído com um gradiente de NaCl para 500 mM. As fracções cuja determinação (por ensaio de infecciosidade) revelou conterem a maioria do AAV foram recolhidas e agregadas (referidas como o "agregado de PI").

O agregado de PI foi, depois, diluído cerca de 1:7 em TMEG e carregado numa coluna Toso Haas SP650C de 50 mL e eluído com um gradiente para NaCl a 500 mM. As fracções cuja determinação (por ensaio de infecciosidade) revelou conterem a maioria do AAV foram recolhidas e agregadas (referidas como o "agregado de SP"). O agregado de SP foi concentrado utilizando um filtro de 10K Centriprep e, depois, foi esterilizado por passagem através de um filtro de 0,2 micron.

Os resultados revelaram que o AAV recombinante foi essencialmente isento de adenovírus infeccioso detectável (como determinado por limite de análise de detecção com amplificação serial em células 293 e ensaio de TCID50). A preparação também foi essencialmente isenta de ADN adenoviral (como determinado por análise de transferência de *slot*), essencialmente isenta de proteínas celulares (como determinado por análise de gel de SDS-PAGE), de ADN celular (determinado por análise de PCR) e também era essencialmente isenta de AAV fenotipicamente de tipo selvagem (como determinado por amplificação serial e análise de Southern).

EXEMPLO 10

O MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE AAV POR STRESS NUTRICIONAL

Como discutido acima, considera-se que a produção de AAV pode ser melhorada utilizando qualquer de uma variedade de agentes e/ou condições que eficazmente stressam (ou desoptimizam) o crescimento ou metabolismo das células produtoras de AAV. Neste exemplo, mostra-se que a depleção de determinados aminoácidos, como ocorre durante a cultura, está associada a um melhoramento relativo na produção de AAV; e, inversamente, esses suplementos de meios que removem o stress nutricional resultam efectivamente numa redução drástica no rendimento de vector.

(a) Stress nutricional durante cultura em descontínuo e de perfusão

As células JL14 foram inoculadas a cerca de 4×10^5 células/mL, em biorreactores de 2 litros e cultivadas em meio de rAAV mostrado na Tabela 2, no modo descontínuo ou por perfusão (utilizando filtração de caudal tangencial, dia 1 a 0,4 volumes/dia, dias 2-3 a 1,2 vol./dia, dia 4 a 2 vol./dia e dia 5 a 4 vol./dia). As culturas foram monitorizadas para densidade celular, glucose, lactato e aminoácidos, utilizando técnicas padrão.

As análises revelaram que a densidade celular teve um pico na cultura em descontínuo a 1×10^6 células/mL no dia 2 e, na cultura de perfusão, a 8×10^6 células/mL no dia 6. A glucose não era limitativa em qualquer dos casos (>1 g/L) e o lactato não era inibidor.

Contudo, a análise de aminoácido revelou que o glutamato e o aspartato foram rapidamente deplecionados nas culturas em descontínuo e de perfusão, como mostrado nas seguintes Tabelas:

TABELA 3:

Análise de aminoácido de meio de cultura em DESCONTÍNUO (ao longo do tempo - $\mu\text{mol/L}$)							
	PM		dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4
Ácido Aspártico	133		96	10	4	9	7
Treonina	119		687	644	606	552	533
Serina	105		271	230	157	117	98
Asparagina	132		130	113	96	68	69
Ácido Glutâmico	147		90	2	1	1	1
Glutamina	146		3424	2987	2450	1989	1843
Prolina	115		135	143	162	164	185
Glicina	75		288	241	194	151	130
Alanina	89		189	306	438	644	681
Valina	117		692	631	518	417	342
Cistina	121		143	133	120	107	99
Metionina	149		160	132	100	74	58
Isoleucina	131		617	531	383	264	182
Leucina	131		645	538	374	248	161
Tirosina	181		407	379	355	329	315
Fenilalanina	165		323	289	259	231	214
Triptofano	204		47	41	33	28	26
Amônia	17		760	816	941	1021	1033
Ornitina			71	89	110	128	144
Lisina HCl			572	521	463	415	384
Histidina	155		276	257	243	229	211
Arginina	174		1020	943	870	791	747

TABELA 4:

Análise de aminoácido de meio de cultura de PERFUSÃO (ao longo do tempo - $\mu\text{mol/L}$)									
	PM		dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6
Ácido Aspártico	133		95	12	5	10	10	10	10
Treonina	119		709	691	560	596	651	641	657
Serina	105		281	264	147	156	180	199	185
Asparagina	132		130	124	75	78	109	119	119
Ácido Glutâmico	147		88	1	0	1	1	1	0
Glutamina	146		3525	3299	2517	2640	2906	2986	3082
Prolina	115		145	165	163	174	177	157	171
Glicina	75		304	267	189	205	217	227	230
Alanina	89		190	340	341	384	423	333	330
Valina	117		678	635	485	500	532	551	561
Cistina	121		141	136	112	118	123	119	118
Metionina	149		157	133	91	99	107	108	107
Isoleucina	131		616	543	369	401	430	432	442
Leucina	131		649	554	364	400	430	438	444
Tirosina	181		413	398	328	355	379	373	386
Fenilalanina	165		336	16	244	268	291	287	292
Triptofano	204		58	47	36	41	48	44	47
Amônia	17		831	1182	956	1202	1219	931	990
Ornitina			42	97	74	115	112	56	44
Lisina HCl			718	651	528	594	643	617	628
Histidina	155		284	310	223	243	262	266	265
Arginina	174		1058	948	826	901	978	974	1016

(b) Stress Nutricional Associado a Produção de AAV Melhorada

Foram realizados estudos de acompanhamento para confirmar a importância da escassez relativa de glutamato e aspartato nos meios de cultura. As células JL 14 foram retiradas de um frasco *spinner* e divididas em dois conjuntos. Cada conjunto foi inoculado com 3×10^9 unidades infecciosas de 170-37 Ad 5. Um conjunto de células foi ressuspensão a 10^6 células/mL em meio de rAAV (Tabela 2) contendo FBS a 10% e L-glutamina a 1% (300 mL). O outro foi ressuspensão em meio de rAAV contendo FBS a 10%, L-glutamina a 1%, ácido aspártico a 10 mg/L e ácido glutâmico a 110 mg/L.

Cada conjunto foi incubado a 37 graus, durante 72 horas, num frasco *spinner*. As células foram recolhidas, microfluidizadas, duas vezes, a 8000 psi, tratadas com Benzonase, plaqueadas num ensaio de infecciosidade, recolhidas e sondadas.

Os resultados mostram que o frasco *spinner* de controlo produziu 6,2 RU por célula. O frasco *spinner* suplementado com ácido aspártico e glutâmico produziu 0,94 RU por célula.

Isto indica que, quando a depleção de ácido aspártico e ácido glutâmico é prevenida pelo provimento destes aminoácidos em excesso, a produção de rAAV fica comprometida devido ao insucesso em submeter as células a stress nutricional.

Foram realizados testes adicionais, utilizando uma linha celular D6 derivada de HeLa que tem um vector de rAAV integrado

(ITR-(promotor de CMV)-(gene repórter de β -gal)-ITR, assim como cópias dos genes rep e cap de AAV de tipo selvagem.

As células foram semeadas, a 5×10^6 células por frasco T-225, em 30 mL de DMEM completo (FBS a 10%, L-Glutamina a 2 mM) e incubadas a 37 graus, em CO₂ a 10%, durante 2 dias, sobre o qual as células atingiram uma densidade de 2×10^7 células por frasco. As células em dois frascos em duplicado foram infectadas com Ad 5, a uma MOI de 10. Um frasco continha DMEM completo, o outro continha DMEM completo, suplementado com 5 x de ácido aspártico e ácido glutâmico. As células foram recolhidas e contadas após 72 horas de cultura.

O DMEM completo produziu $2,6 \times 10^7$ células, com viabilidade de 88%. O meio suplementado com aspartato/glutamato produziu $3,8 \times 10^7$ células, com viabilidade de 91%. As células foram ressuspensas, sonicadas, tratadas com Benzonase (25 U/mL), clarificadas e ensaiadas por análise de transferência de slot.

Os resultados foram como se segue: O vírus D6 foi produzido em DMEM completo (não suplementado), a $1,8 \times 10^{10}$ DRP/mL (1800 DRP por célula). O vírus D6 foi produzido em DMEM suplementado com aspartato/glutamato, a $1,4 \times 10^9$ DRP/mL (140 DRP/célula).

EXEMPLO 11

PRODUÇÃO DE VECTOR DE AAV RECOMBINANTE SOB STRESS DE SORO

Como um exemplo da produção de rAAV sob condições de stress, a requerente utilizou stress de soro reduzido, em

conjunto com técnicas como descritas acima. Resumidamente, as células JL 14 foram cultivadas em frascos *spinner*, em DMEM modificado + FBS a 10%, em modo de cultura em série contínua e foram separadas a cada 3-4 dias. As células da cultura de suspensão foram colocadas em 16 Fábricas Celulares da Nunc, 10 pilhas, a 3×10^8 células/fábrica numa rotação de três a quatro dias. O meio utilizado para crescimento tinha uma redução de soro de dez vezes (*i. e.*, DMEM + FBS a 1%) colocando, desse modo, as células sob stress de soro.

Às 24 horas após sementeira, o meio nas fábricas foi removido e foi adicionado meio fresco contendo 3×10^9 unidades de Ad. Após 72 horas de cultura, a 37 graus, as células foram desalojadas das fábricas por pancadas leves, o meio contendo células foi recolhido e as células foram sedimentadas e ressuspensas em TMEG + NaCl a 100 mM e, depois, lisadas por passagem através de um microfluidizador a 8000 psi. O lisado foi clarificado através de um filtro de 5 micron e o lisado clarificado foi carregado numa coluna de permuta aniónica de PI de 500 mL. A coluna foi eluída com um gradiente de NaCl crescente (até 500 mM) em tampão TMEG. As fracções foram recolhidas e ensaiadas utilizando um ensaio de Clone 37, como descrito por Allen *et al.* (documento W096/17947, *supra*). As fracções contendo a maioria do vector de AAV foram, depois, agregadas e concentradas 10 vezes, utilizando um concentrador centrífugo Centriprep, a 1000 x g, durante 30 minutos. O material concentrado foi dialisado contra Solução Salina Equilibrada de Ringer com glicerol a 5% e armazenado a -70 graus C. O AAV foi ensaiado pelo ensaio de Clone 37, assim como por transferência de *slot* e SDS-PAGE. O material também pode ser ensaiado para a presença de adenovírus, proteínas adenovirais e ADN celular, assim como outros potenciais contaminantes.

A **Figura 11** mostra os resultados obtidos utilizando células produtoras GAK-0003, implementadas em frascos T-225, a 10^7 células por frasco e inoculadas no Dia 2 com adenovírus DAB-003, a uma MOI de 10. Como mostrado na figura, foram cultivados diferentes frascos, durante 72 horas, a 37 graus, em DMEM fresco contendo uma percentagem diferente de FBS. No Dia 5, cada frasco foi recolhido, as células foram contadas, ressuspensas, sonicadas, tratadas com Benzonase e plaqueadas para medir a produção de vector como anteriormente.

A produção de vector óptima foi observada a uma percentagem de FBS de 1%. Consequentemente, o meio que é deficiente em FBS (menos de 2,5%, de um modo preferido menos de 2% mas mais de 0%) é preferido como uma condição para submeter as células produtoras a stress de soro.

EXEMPLO 12

PRODUÇÃO DE VECTOR DE AAV RECOMBINANTE SOB STRESS DE pH

Como um exemplo adicional da produção de rAAV sob condições de stress, a requerente utilizou stress de pH, em conjunto com técnicas como descritas acima. Resumidamente, as células produtoras de AAV foram cultivadas em biorreactores, como descrito acima. As células foram, depois, infectadas com Ad5, a MOI=10 e inoculadas em meios pobres em soro (como no Exemplo 11) em suspensão, em biorreactores de 1,5 litros. As culturas foram mantidas a diversos níveis de pH elevado (desde 7,2 a 8,0). As culturas foram, depois, monitorizadas diariamente para número de células, viabilidade, consumo de glucose, produção de lactato, pH, osmolaridade e produção de AAV. Como mostrado abaixo, quando

o pH foi elevado para 7,4, houve um aumento na produção de AAV; conjugado com um aumento ainda mais dramático no número de partículas de AAV libertadas para o sobrenadante (que aumentou à medida que o pH foi elevado):

pH de cultura	Partículas Associadas a Células	Partículas de Sobrenadante	Partículas Totais	% de Associadas a Células	% no 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%

Em suma, à medida que o pH foi aumentado, a requerente observou um aumento acentuado no número de partículas de AAV libertadas para dentro do sobrenadante e uma mudança na percentagem de partículas associadas a sobrenadante:células (de quase todas associadas a células, a pH 7,2, para maioritariamente sobrenadante (92%) a pH 8,0). A capacidade de se recuperarem partículas de AAV directamente do sobrenadante, sem a necessidade para lise das células produtoras, representa uma poderosa vantagem em termos de produção e purificação de AAV. O AAV isolado do sobrenadante utilizando stress de pH pode ser facilmente concentrado e purificado, utilizando técnicas como aqui descritas (e. g., cromatografia de permuta iónica e/ou filtração de caudal tangencial).

Lisboa, 21 de Janeiro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV), compreendendo as etapas de:

(a) incubação de uma célula produtora de AAV sob condições que são permissivas para replicação de AAV e que compreendem a indução de um stress subletal na célula produtora de AAV, de modo a melhorar o nível de produção de AAV, em que a célula produtora de AAV é uma célula de mamífero e em que a referida célula compreende:

(i) um ou mais genes de empacotamento de AAV, em que cada gene de empacotamento de AAV referido codifica uma proteína de replicação ou encapsidação de AAV;

(ii) um pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não AAV heterólogo flanqueado por, pelo menos, uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV; e

(iii) um vírus auxiliar para AAV,

(b) lise da célula produtora após a incubação da etapa a) para produzir um lisado de célula produtora de AAV; e

(c) purificação do lisado de célula produtora de AAV para produzir uma população de partículas de vírus adeno-associado recombinante (rAAV),

em que o stress subletal é seleccionado de:

(I) um stress nutricional imposto por um ou mais do seguintes:

- (i) cultura da célula produtora num meio que é deficiente em um ou mais aminoácidos, opcionalmente ácido aspártico ou ácido glutâmico;
- (ii) cultura da célula produtora num meio que contém menos de 10 $\mu\text{mol/L}$ de ácido aspártico;
- (iii) cultura da célula produtora num meio que contém menos de 2 $\mu\text{mol/L}$ de ácido glutâmico; ou
- (iv) cultura da célula produtora num meio que é deficiente para soro; ou

(II) um stress de temperatura imposto pelo cultura da célula produtora, durante 3-6 dias, a:

- (i) uma temperatura inferior à temperatura de crescimento óptima da célula produtora; ou
 - (ii) uma temperatura superior à temperatura de crescimento óptima da célula produtora;
- ou

(III) um stress osmótico imposto por:

- (i) cultura da célula produtora num meio hipoosmótico;
- ou
- (ii) cultura da célula produtora num meio hiperosmótico; ou

(IV) um stress de pH, em que o stress de pH compreende submeter a célula produtora a um pH acima de pH 7,2 continuamente durante a cultura;

ou

(V) um stress tóxico, em que o stress tóxico compreende a exposição da célula produtora a um agente genotóxico, seleccionado de um carcinogénio químico, radiação, UV, um inibidor metabólico da síntese de ADN e um fármaco que afecta as topoisomerasas.

2. Método da reivindicação 1, em que o stress subletal é um stress tóxico e o agente genotóxico é um inibidor metabólico da síntese de ADN, seleccionado de hidroxiureia, metotrexato e afidicolina.
3. Método da reivindicação 1, em que o stress subletal é um stress tóxico e o agente genotóxico é um fármaco que afecta topoisomerasas seleccionadas de amsacrina, camptotecina, etoposido e novobiocina.
4. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida etapa c) de purificação compreende submeter o lisado de célula produtora de AAV da etapa b) a cromatografia por uma pluralidade de cromatografias de permuta iónica compreendendo, pelo menos, uma cromatografia de permuta aniónica carregada positivamente e, pelo menos, uma cromatografia de permuta catiónica carregada negativamente, ou submeter o lisado de célula produtora de AAV da etapa b) a cromatografia por uma cromatografia de permuta aniónica, seguida de filtração de caudal tangencial, para produzir uma população purificada de partículas de vector de rAAV.

5. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido lisado de célula produtora de AAV também é purificado por afinidade numa resina tendo um ligando que é específico para uma ou mais moléculas de superfície presentes em AAV e em que a purificação por afinidade é, opcionalmente, conduzida após uma cromatografia de permuta iónica, aniónica e/ou catiónica, e o referido ligando é, opcionalmente, um anticorpo que é específico para uma molécula de superfície presente em AAV.
6. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula produtora de AAV da etapa a) é concentrada antes da lise, opcionalmente por centrifugação ou por filtração de caudal tangencial.
7. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida etapa de lise da célula produtora de AAV é conduzida pela submissão da célula a uma técnica lítica seleccionada de microfluidização, sonicação e congelação-descongelação.
8. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o lisado de célula produtora de AAV da etapa b) é:
 - (i) tratado com uma nuclease, opcionalmente benzonase, antes da cromatografia; e/ou
 - (ii) clarificado antes da cromatografia, opcionalmente por filtração ou centrifugação.

9. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula produtora de AAV é concentrada antes da lise, ressuspensa num tampão compreendendo solução salina a uma força iónica, pelo menos, como a de uma solução de NaCl a 50 mM, lisada e, depois, clarificada por filtração antes da cromatografia.
10. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer reivindicação dependente desta, em que as fracções cromatográficas contendo partículas de rAAV são concentradas por filtração ou centrifugação após eluição de uma cromatografia de permuta iónica.
11. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer reivindicação dependente desta, em que as fracções cromatográficas contendo partículas de rAAV são concentradas por filtração de caudal tangencial após eluição de uma cromatografia de permuta iónica.
12. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer reivindicação dependente desta, em que a referida cromatografia de permuta aniónica é realizada numa resina amino ou imino carregada em N, opcionalmente seleccionada de uma resina POROS 50 PI, uma resina de dietilaminoetilo (DEAE), uma resina de trimetilaminoetilo (TMAE), uma resina de amina quaternária e uma resina de polietilenimina (PEI).

13. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer reivindicação dependente desta, em que a referida cromatografia de permuta catiónica é realizada numa resina catiónica à base de sulfo-, fosfo- ou carboxi-, opcionalmente seleccionada de uma resina de sulfato de heparina (HS), uma resina de sulfopropilo (SP) e uma resina de carboximetilo (CM).
14. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida etapa a) de incubação da célula produtora é conduzida num recipiente seleccionado de um frasco de cultura de tecidos, um frasco rotativo, um frasco *spinner*, um tanque reactor, um fermentador, tal como um fermentador arejado, um biorreactor, tais como um biorreactor de fibra oca, de leito empacotado ou leito fluidizado, ou um biorreactor multilitro, em cujo biorreactor multilitro são isoladas, pelo menos, 10^9 unidades replicativas de rAAV por litro de volume de biorreactor.
15. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida etapa a) de incubação da célula produtora é conduzida utilizando um microtransportador.
16. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a etapa a) de incubação da célula produtora é conduzida durante, pelo menos, 5 dias.
17. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer reivindicação

dependente desta, em que a referida população purificada de partículas de vector de rAAV contém:

- menos de 1 AAV competente para replicação por 10^4 partículas de rAAV;
- não mais de 10^3 partículas infecciosas de vírus auxiliares por 10^8 unidades replicativas de partículas de rAAV;
- menos de 5% de contaminação por vírus auxiliares, numa base de proteína (p/p), detectada por análise densitométrica de géis de SDS ou por imunoensaio para proteína específica de vírus auxiliar; e
- menos de 5% de contaminação por vírus auxiliares ou proteína celular (p/p), detectada por análise densitométrica de géis de SDS ou por imunoensaio para vírus auxiliar ou proteínas específicas celulares.

18. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer reivindicação dependente desta, na qual a eluição da cromatografia de permuta aniónica e/ou permuta catiónica é conduzida pelo aumento da concentração de sal e os eluentes cromatográficos compreendendo partículas de rAAV são subsequentemente tratados, para reduzir a concentração de sal efectiva, por diluição, diálise, diafiltração ou concentração.

19. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores compreendendo, ainda, a etapa de submeter uma fracção compreendendo partículas de AAV a cromatografia de sulfato de heparina.

20. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido pro-vector de rAAV compreende um polinucleótido não AAV heterólogo flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITR) de AAV.
21. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida célula produtora de AAV compreende, pelo menos, um gene de empacotamento de AAV que está integrado de um modo estável no genoma da referida célula produtora de AAV, de um modo preferido um gene rep de AAV e um gene cap de AAV.
22. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida célula produtora é proporcionada por um processo compreendendo:
- (i) introdução do vírus auxiliar na célula produtora já introduzida com o(s) gene(s) de empacotamento de AAV e o pro-vector de rAAV;
 - (ii) introdução do provector de rAAV e do vírus auxiliar simultaneamente ou sequencialmente na célula produtora já introduzida com o(s) gene(s) de empacotamento de AAV; ou
 - (iii) introdução do(s) gene(s) de empacotamento de AAV e do pro-vector de rAAV simultaneamente ou sequencialmente na célula hospedeira já introduzida com o vírus auxiliar.

23. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula produtora é proporcionada por um processo compreendendo a introdução na célula produtora de, pelo menos, um gene de empacotamento de separação de AAV.
24. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido vírus auxiliar é um adenovírus, um adenovírus sensível à temperatura ou adenovírus Ad-ts 149.
25. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido vírus auxiliar é um vírus auxiliar sensível à temperatura e a referida etapa de incubação da célula produtora é conduzida a uma temperatura que é permissiva para replicação de AAV mas não permissiva para replicação do vírus auxiliar sensível à temperatura.
26. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula produtora é uma linha celular de mamífero dependente de conjugação, uma linha celular de mamífero adaptada a suspensão, uma célula 293 N3s ou uma célula HeLa S3.
27. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 1, em que a referida etapa c) de purificação compreende uma combinação de uma cromatografia de permuta aniónica carregada positivamente e uma cromatografia de permuta catiónica carregada negativamente

para produzir uma população purificada de partículas de rAAV.

28. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 27, em que a referida cromatografia de permuta aniónica carregada positivamente é realizada antes da referida cromatografia de permuta catiónica carregada negativamente.
29. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 27, em que a referida cromatografia de permuta catiónica carregada negativamente é realizada antes da referida cromatografia de permuta aniónica carregada positivamente.
30. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 29 compreendendo, ainda, a etapa de submeter o lisado contendo partículas de rAAV em sulfato de heparina a cromatografia, a referida etapa sendo realizada após a referida cromatografia de permuta aniónica carregada positivamente e referida cromatografia de permuta catiónica carregada negativamente.
31. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 30 compreendendo, ainda, a etapa de submeter a célula produtora a filtração de caudal tangencial.
32. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 31, em que a filtração de caudal tangencial é realizada antes da cromatografia.

33. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com a reivindicação 31, em que a filtração de caudal tangencial é realizada após a cromatografia.
34. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 33, em que a referida cromatografia de permuta aniónica é realizada numa resina amino ou imino carregada em N, opcionalmente seleccionada de uma resina POROS 50 PI, uma resina de dietilaminoetilo (DEAE), uma resina de trimetilaminoetilo (TMAE), uma resina de amina quaternária e uma resina de polietilenimina (PEI).
35. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 33, em que a referida cromatografia de permuta catiónica é realizada numa resina catiónica à base de sulfo-, fosfo- ou carboxi-, opcionalmente seleccionada de uma resina de sulfato de heparina (HS), uma resina de sulfopropilo (SP) e uma resina de carboximetilo (CM).
36. Método de produção de uma população de partículas de rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 35, em que a célula produtora é cultivada sob condições de suspensão.

Lisboa, 21 de Janeiro de 2013

Figura 1

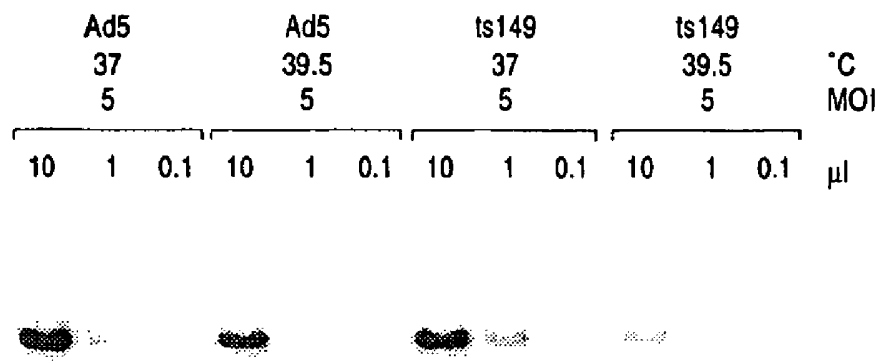


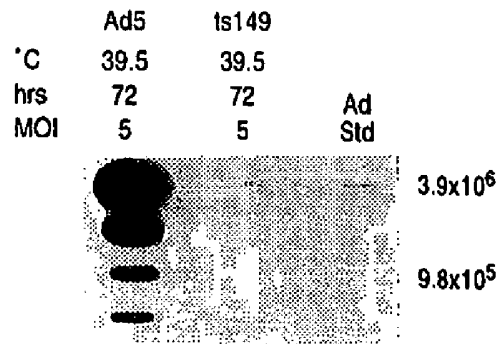
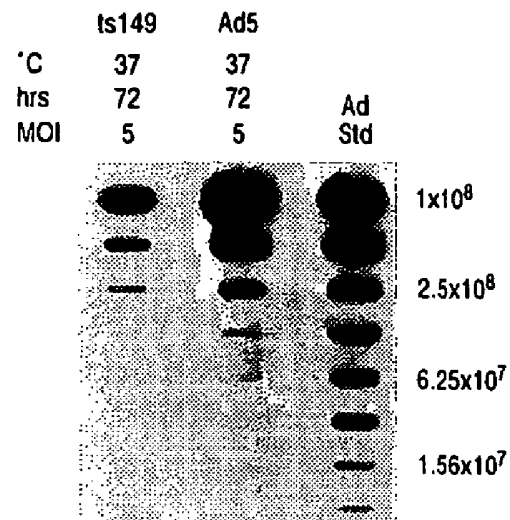
Figura 2

Figura 3

ts149 39.5 72				Ad5 37	ts149 39.5 72 96		°C h
5	10	20	40		5	5	MOI

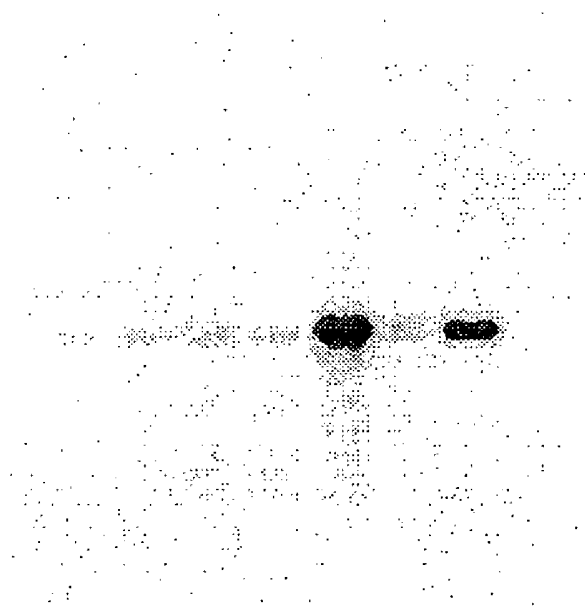


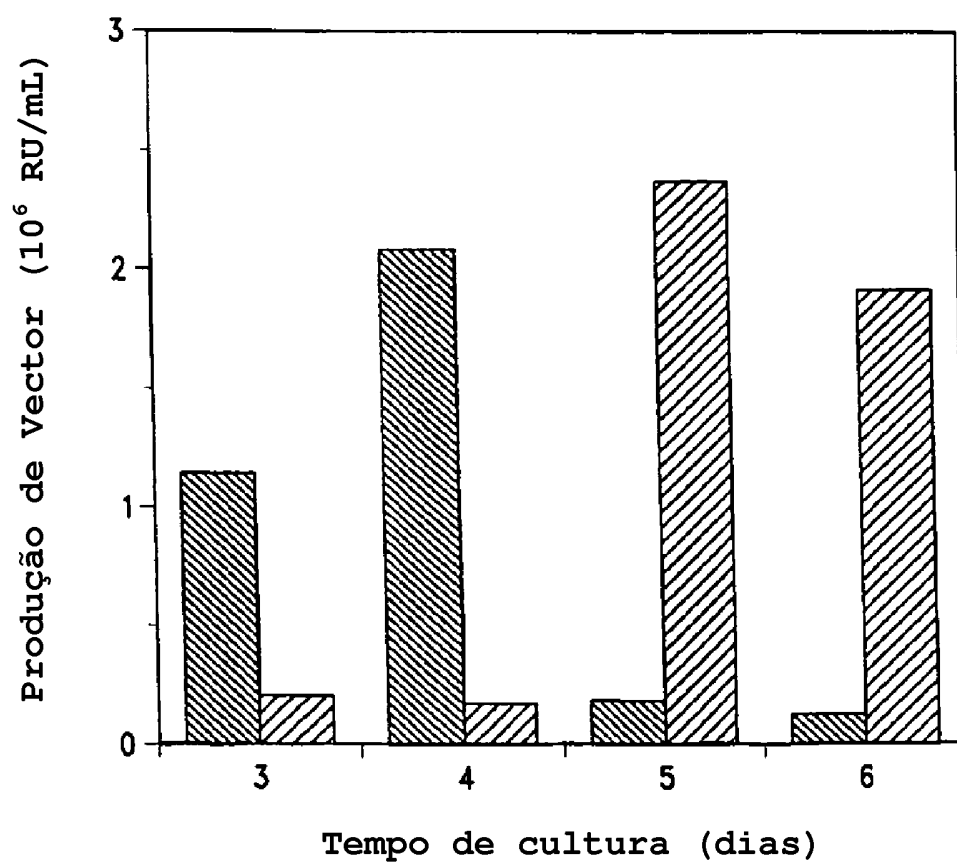
Figura 4

Figura 5

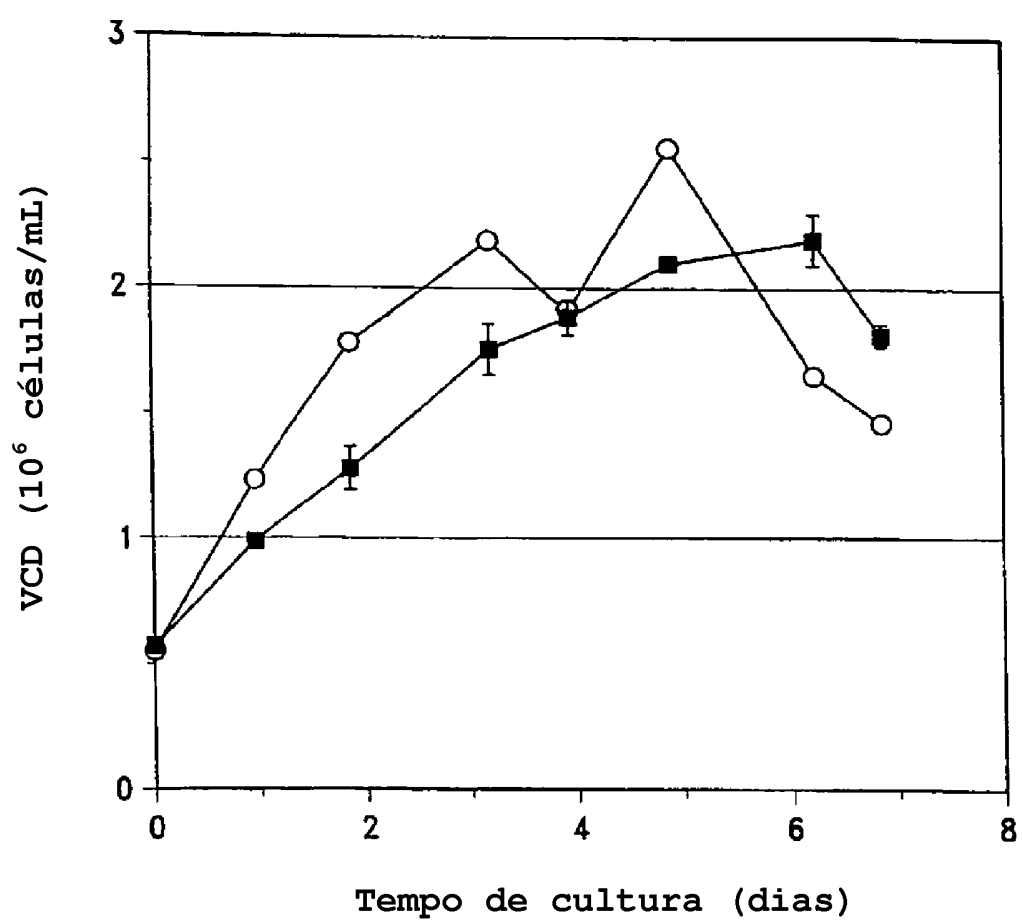


Figura 6

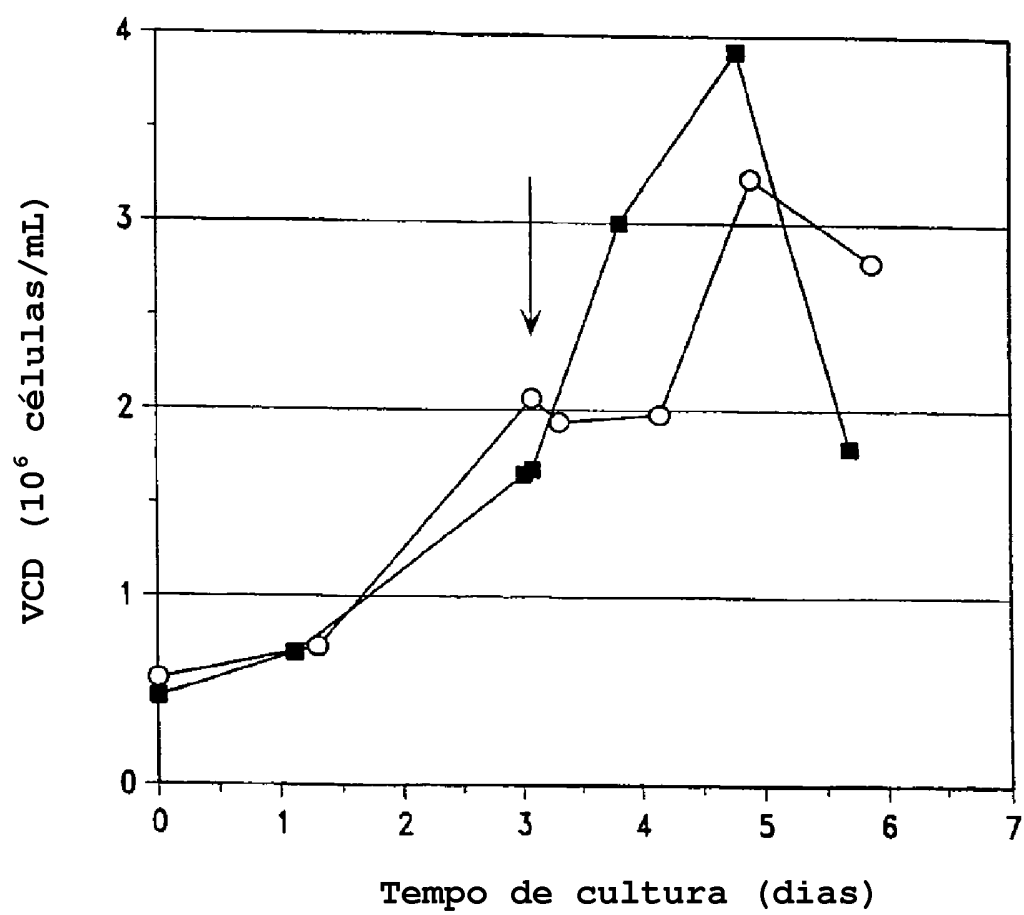
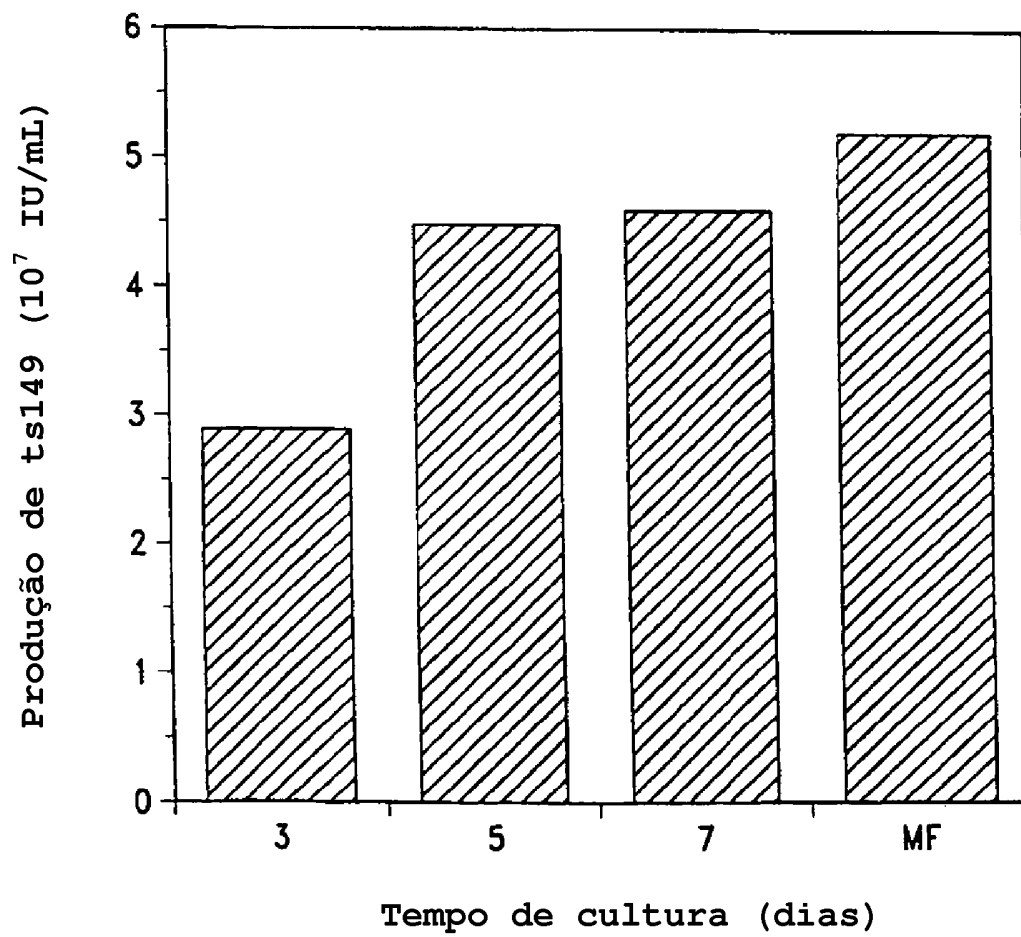


Figura 7

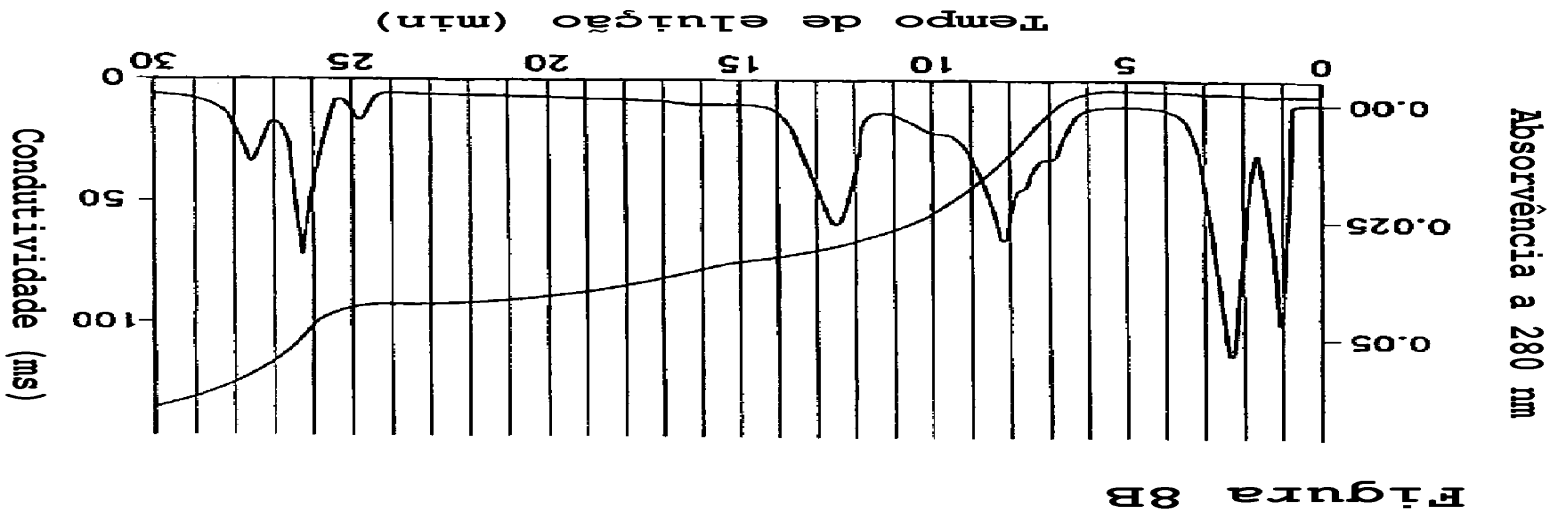
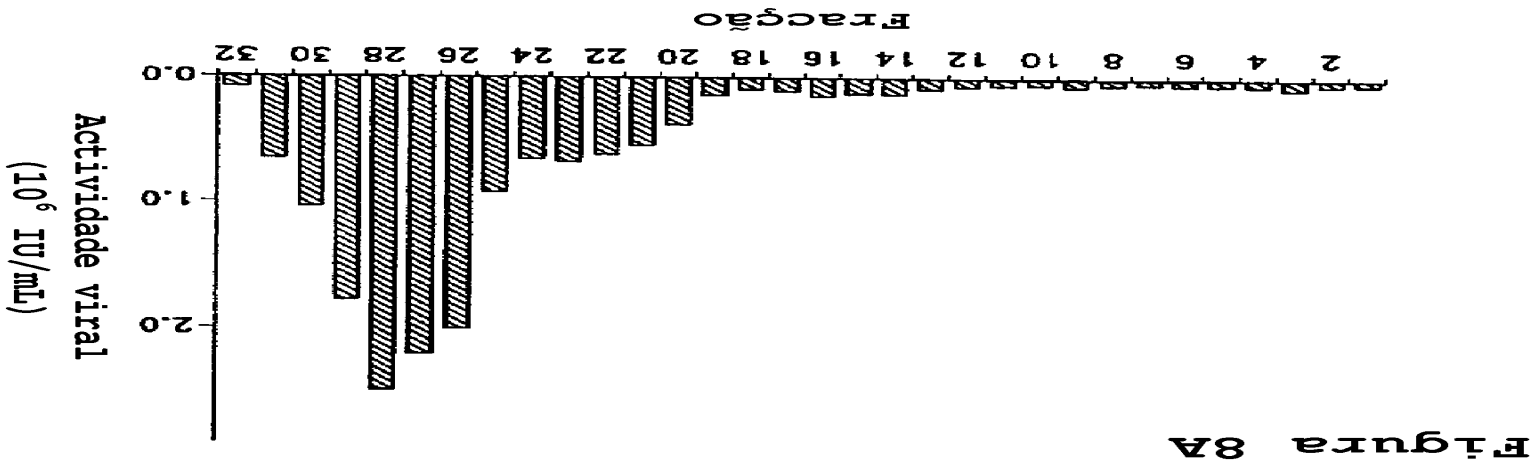


Figura 9

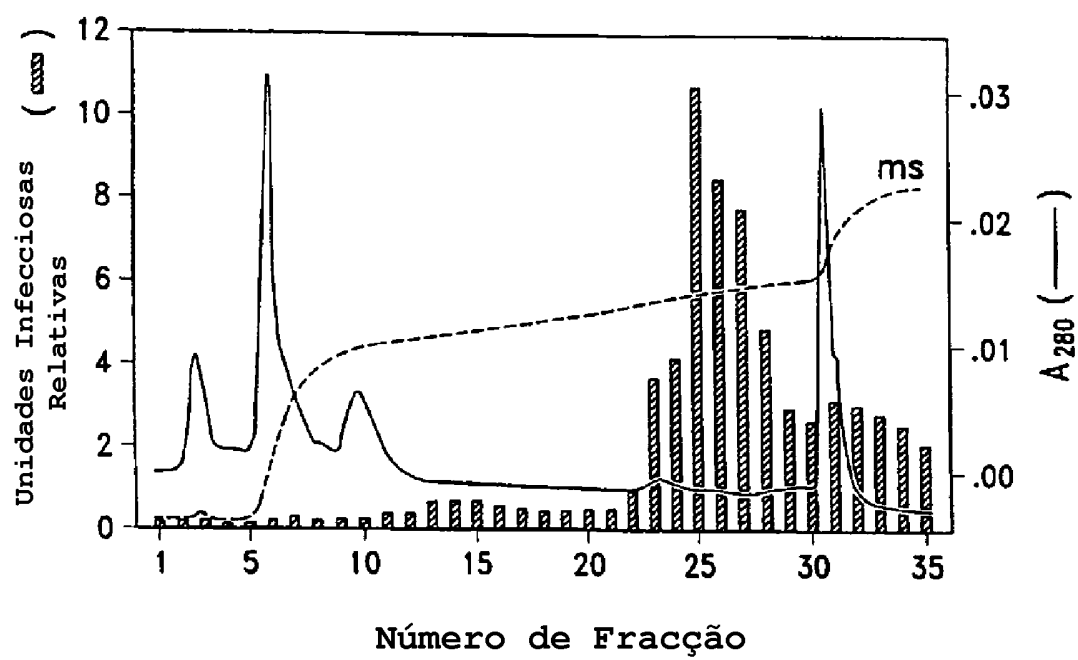


Figura 10A

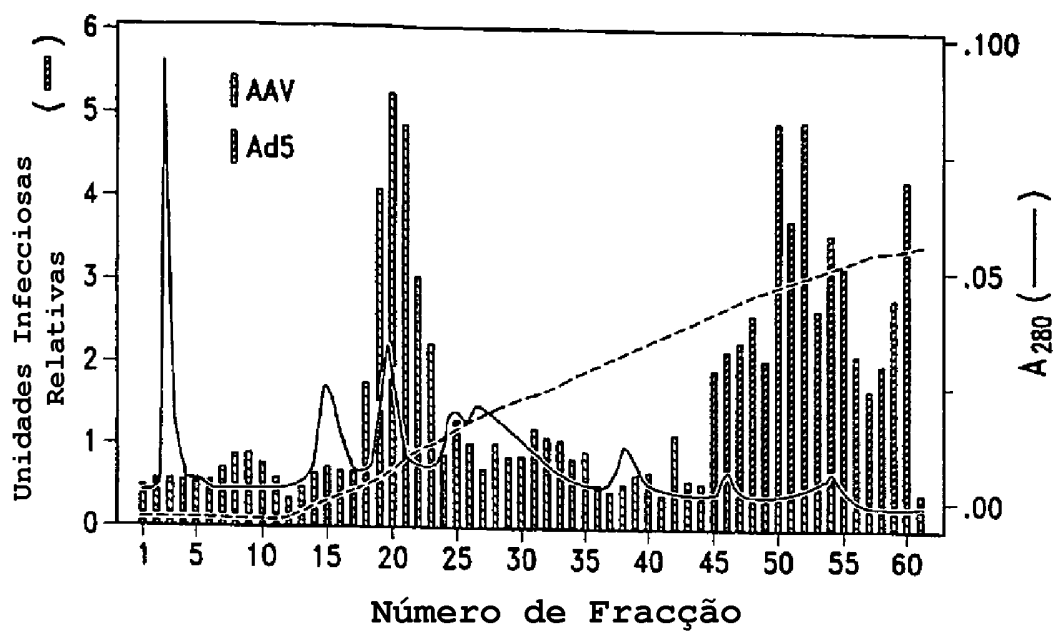


Figura 10B

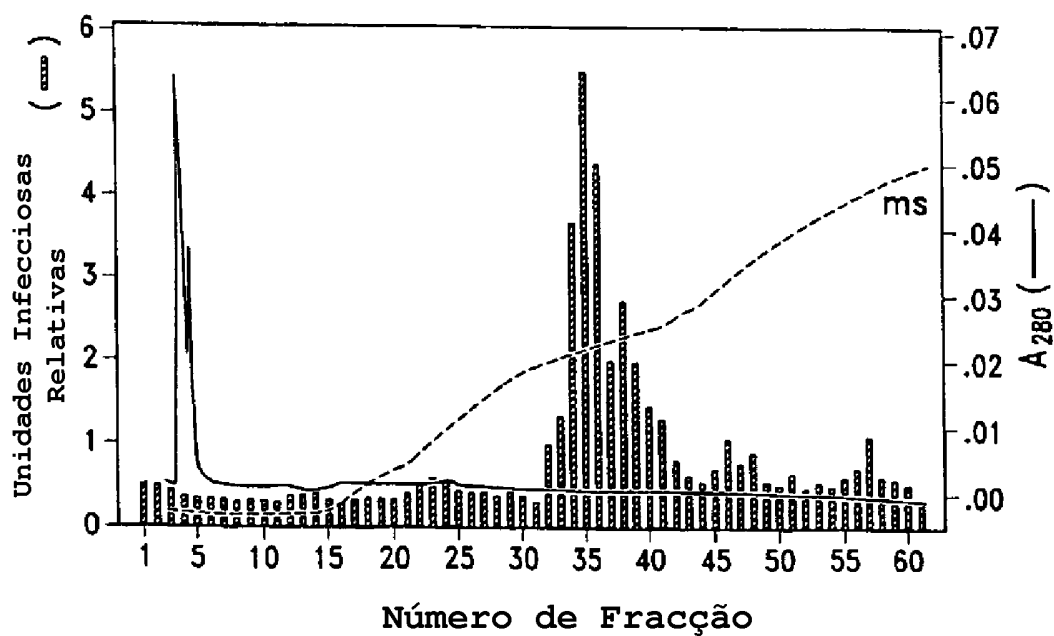


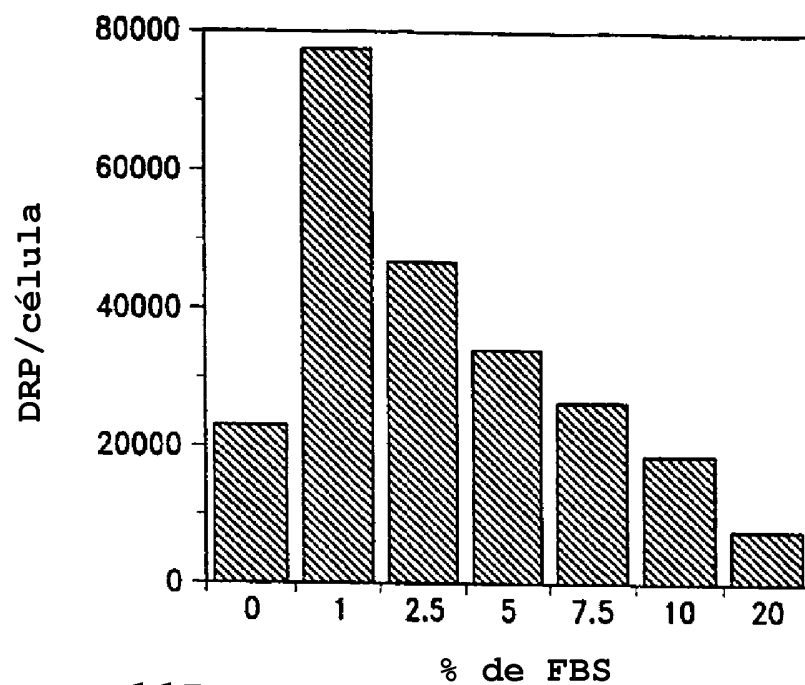
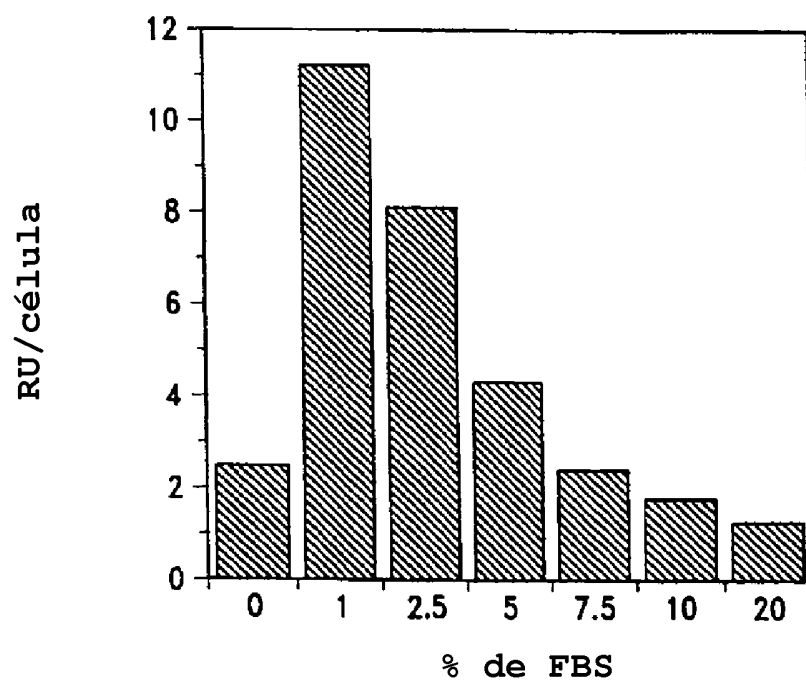
Figura 11A**Figura 11B**

Figura 12

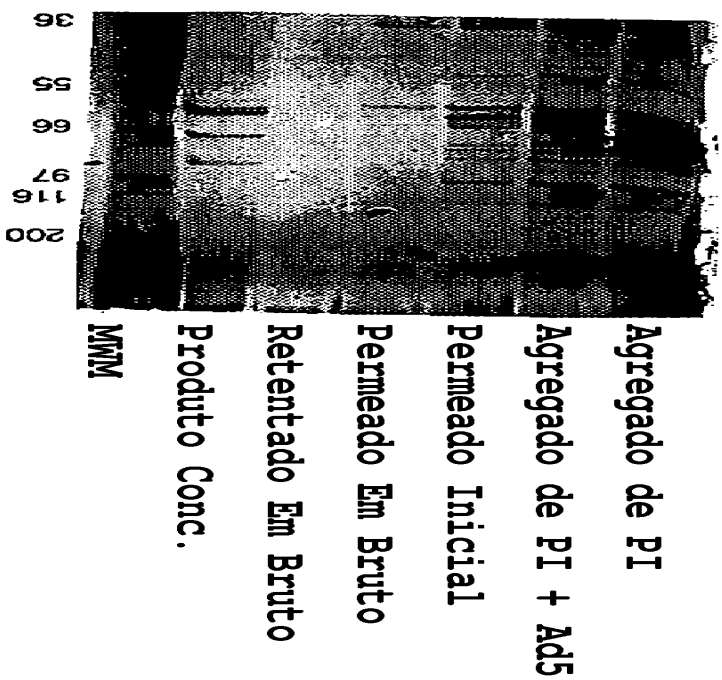
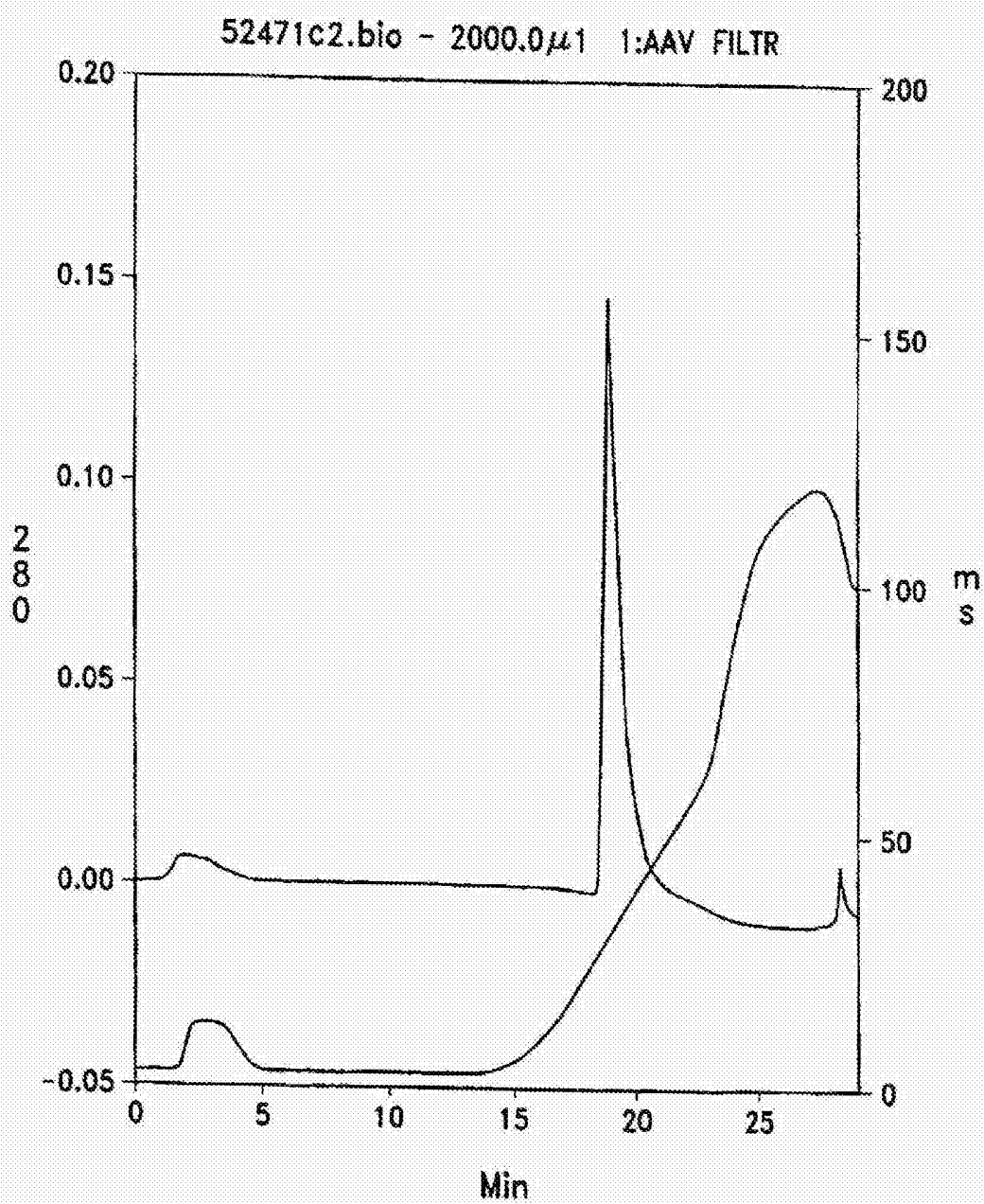


Figura 13

RESUMO

"MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE ELEVADO TÍTULO DE VECTORES DE AAV RECOMBINANTE ISENTAS DE AUXILIAR"

Esta invenção proporciona métodos e composições para produzir preparações de elevado título, substancialmente purificadas, de vírus adeno-associado (AAV) recombinante que podem ser utilizadas como vectores para distribuição génica. No início da produção de vectores, as células produtoras de AAV desta invenção tipicamente compreendem um ou mais genes de empacotamento de AAV, um vector de AAV compreendendo um transgene heterólogo (*i. e.*, não AAV) de interesse e um vírus auxiliar, tal como um adenovírus. As preparações de vector de AAV produzidas são, em geral, incompetentes para replicação mas são capazes de mediar a distribuição de um transgene de interesse (tal como um gene terapêutico) para qualquer de uma ampla variedade de tecidos e células. As preparações de vector de AAV produzidas de acordo com esta invenção também são substancialmente isentas de vírus auxiliar, assim como proteínas virais de auxiliar e celulares e outros contaminantes. Também é proporcionado um ensaio quantitativo, de alta capacidade, útil na avaliação da infecciosidade e replicação virais, assim como no rastreio de agentes que afectam a infecciosidade e/ou replicação virais.