



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 715**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

A61K 39/23 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03746051 .6**

86 Fecha de presentación : **27.03.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1492891**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

54 Título: **Procedimientos de producción de virus.**

30 Prioridad: **29.03.2002 US 368654 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **Merck & Co., Inc.**
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065-0907, US

72 Inventor/es: **Xie, Liangzhi y**
Goochee, Charles, F.

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de producción de virus.

5 **Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio, a tenor de 35 U.S.C. §119(e), de la solicitud provisional de EEUU 60/368.654 presentada el 29 de marzo de 2002.

10 **Declaración con respecto a I+D con subvención federal**

No Aplicable.

Referencia al apéndice de microficha

15 No Aplicable.

Campo de la invención

20 La presente invención se refiere a un procedimiento para maximizar la producción de un virus termoestable basado en una estrategia de cambio de la temperatura del cultivo celular que da como resultado una mejora sustancial de la producción del virus termoestable. La manipulación de las condiciones de cultivo celular hace que las células crezcan a una temperatura subóptima de crecimiento de la célula huésped durante un período de tiempo previo a la infección por el virus, al disminuir la temperatura de crecimiento celular hasta un nivel subóptimo durante un período de tiempo o
25 haciendo crecer las células a una temperatura subóptima durante todos los múltiples pasajes del proceso de expansión celular desde la inoculación de una ampolla de células criopreservadas, seguido por el cambio de la temperatura hasta un nivel más alto previo a, simultáneamente con o después de la infección por virus de las células huésped. Este procedimiento da como resultado un aumento sustancial de virus recuperables en comparación con los esquemas conocidos de temperaturas para la producción de virus dentro de un cultivo de células huésped.

30 **Antecedentes de la invención**

Los avances en las áreas del uso de vectores virales recombinantes para las aplicaciones de terapia génica y de vacunación de ADN han creado una necesidad para la fabricación y purificación a gran escala de virus de grado clínico. Una de tales familias de virus son los adenovirus. Los adenovirus están agrupados dentro de la familia *Adenoviridae*,
35 que están divididos en el género *Aviadenovirus* (aves) y *Mastadenovirus* (seres humanos, simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos y zarigüeyas). Puede encontrarse un resumen de la familia *Adenoviridae* en Fundamental Biology, 3ª Ed. Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Ed., en el Capítulo 30, pág. 979-1016 (1996), que está incorporado en este documento por referencia. Resulta de interés específico en las aplicaciones de vacunación genética y/o de terapia génica el uso de un adenovirus incompetente para la replicación, alterado en la región E1 o con otras
40 deleciones, incluidos los vectores de adenovirus "gutless". El genoma del adenovirus está generalmente asociado con patologías benignas en seres humanos, y la organización genómica del virus se ha estudiado bien desde su descubrimiento a comienzos de la década del 50. Además, el genoma es susceptible de manipulación, dependiendo de la estrategia utilizada para construir el vector respectivo. Un virus incompetente para la replicación (tal como un vector Ad5gag con deleción de la región E1/E3 que expresa una transgen gag de VIH, según se ejemplifica en este documento) requiere una línea celular que complemente las deleciones. Puede usarse cualquiera de tales líneas celulares para generar vectores de virus recombinantes, siendo de preferencia, pero sin limitación, las líneas celulares que incluyen células 293 y células PER.C6TM. Con este objeto, se han descrito en la bibliografía numerosos vectores de adenovirus recombinantes de 1ª generación (por ejemplo, véase Bett, y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8802-8806; Documentos WO 01/02607 y WO 02/22080). Los vectores adenovirales "gutless" son una 2ª generación de vectores
50 adenovirales generalmente desprovistos de secuencias virales codificadoras de proteínas, con frecuencia con proteínas virales suplementadas in trans por un virus ayudante (helper) (frecuentemente un adenovirus con deleción de la región E1) cultivados con el adenovector dependiente del ayudante (HD) en una línea celular empaquetadora (por ejemplo, PER.C6TM). En ausencia de proteínas virales, estos vectores virales pueden, como alternativa, estar suplementados in trans por una línea celular y/o "virus ayudante" capaz de expresar las proteínas adenovirales estructurales y funcionales necesarias para la replicación, empaquetamiento y recuperación satisfactorios. Debido a la creciente popularidad de estos vectores virales y de la necesidad final de preparar cantidades a escala comercial de una vacuna basada en vectores virales o de un vehículo para terapia génica, se ha convertido en esencial el desarrollo de procedimientos para la producción de vectores de adenovirus recombinante de grado comercial cualitativa y cuantitativa más eficaces.

60 Se ha mostrado que la temperatura es un parámetro importante del proceso tanto para el crecimiento celular como para la producción de virus. Se ha mostrado que la temperatura fisiológica de 37°C es óptima para el crecimiento de una mayoría de líneas celulares de mamíferos. Históricamente se ha mostrado que las temperaturas inferiores a 37°C reducen la velocidad del crecimiento celular, el metabolismo general de la célula, y la formación de productos específicos en células de mamíferos (véase, por ejemplo, Moore, y col., 1997, Cytotechnology 23:47-54; Chuppa, y col., 1997, Biotechnol Bioeng. 55:328-338). La temperatura óptima para la producción de virus depende de la cepa del virus y de la línea celular huésped, pero se ha encontrado que es más frecuentemente inferior a 37°C, incluidos 34°C para la producción del virus del herpes simplex (VHS) en cultivo de células FL (Hoggan y Roizman, 1959, Virology
65

8:508-524), 32 hasta 34°C para el virus de mixoma (Ross y Sanders, 1979, J. Gen. Virol. 43:213-216), y 35°C para el virus de la fiebre aftosa en cultivos celulares BHK 21 en suspensión (Capstick y col., 1967, J. Hyg. Camb. 65:273-280), y 32°C para los virus de influenza adaptados al frío en células MDCK. Generalmente las temperaturas superiores a 37°C no son adecuadas o inclusive no permiten la replicación del virus (Schweitzer-Thumann y col., 1994, Res. Virol. 145:163-170). Para los virus altamente termolábiles tales como retrovirus, la productividad del virus puede aumentar significativamente disminuyendo la temperatura del cultivo desde 37°C (durante el crecimiento celular) hasta 32°C para la producción del virus, principalmente debido al incremento de estabilidad del virus a una temperatura más baja (Mc Taggart y Al-Rubeai, 2000, Biotechnol. Prog. 16:859-865).

A pesar de estos informes, sigue existiendo una necesidad para el desarrollo de un procedimiento para la producción de virus a partir de cultivo celular a gran escala que aborde los temas cuantitativos y cualitativos que se imponen a la comercialización de una vacuna con base viral y/o a un producto de terapia génica. La presente invención aborda y cumple estas necesidades describiendo un procedimiento optimizado de cultivo celular y de producción de virus que define intervalos de temperaturas óptimos, que dan como resultado una productividad mejorada de virus así como la eliminación de las variaciones de productividad dentro del lote.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para maximizar la producción de un virus termoestable basado en una estrategia de cambio de la temperatura del cultivo celular que da como resultado una mejora sustancial de la producción del virus termoestable. La manipulación de la temperatura dentro del procedimiento de cultivo celular/producción del virus que se describe en este documento se basa en una estrategia de cambio de la temperatura por el que (1) las células huésped del cultivo se cambian a una temperatura subóptima durante un período de tiempo previo a la infección por el virus o, (2) el cultivo de células huésped se inocula y cultiva a una temperatura subóptima respectiva, seguido por un nuevo cambio a una temperatura de crecimiento más óptima en el momento o en un momento próximo a la infección por el virus de las células huésped respectivas. La adaptación de tal estrategia de cambio de la temperatura presenta un procedimiento simple y además eficaz para incrementar sustancialmente los virus recuperables dentro de un esquema de producción células huésped respectivas/virus sin la necesidad de manipular además otras condiciones del cultivo y/o del medio dentro de un esquema producción establecido célula huésped/virus.

Aunque se prevé que cualquier virus susceptible de ser producido en un entorno de cultivo celular de temperatura controlada esté dentro del alcance de esta descripción, la presente invención es especialmente aplicable a los virus termoestables, tales como los miembros de la familia *Adenoviridae* (incluidos todos los serotipos conocidos de adenovirus, y virus recombinantes generados de tales serotipos de adenovirus, incluido cualquier vector de adenovirus recombinante de primera o segunda generación conocido en la técnica) y los miembros de la familia *Picornavirus* (por ejemplo, poliovirus, rinovirus, virus de la hepatitis A, Virus de la fiebre aftosa). Un virus de preferencia es cualquier serotipo de adenovirus, y resulta especialmente de preferencia cualquier vector de adenovirus recombinante de 1° o 2° generación que contenga al menos un transgen heterólogo (véase, por ejemplo, Bett, y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8802-8806; Documentos WO 01/02607 y WO 02/22080, las tres publicaciones incorporadas en este documento por referencia).

Como se indica anteriormente, la presente invención se basa en parte en una estrategia de cambio de la temperatura para el crecimiento celular que comprende reducir la temperatura de cultivo hasta un nivel subóptimo durante un período de tiempo previo a la infección por virus o cultivar células a un nivel subóptimo durante el procedimiento completo de expansión celular que incluye uno o más pasajes del crecimiento celular desde células criopreservadas, seguido por un aumento de temperatura hasta la temperatura fisiológica o a una temperatura próxima para la producción de ese virus particular previo a, simultáneamente, o tras la infección por virus de las células huésped. Los diferentes parámetros que pueden manipularse además con relación al procedimiento de cambio de la temperatura que se describe en este documento y que están dentro del alcance de la presente invención incluyen pero no se limitan necesariamente a (1) alterar el intervalo del cambio hasta condiciones de cultivo subóptimas; (2) alterar el período de tiempo de cultivo de células huésped a una temperatura subóptima; y, (3) coordinar el tiempo de infección del cultivo celular con el virus con un retorno a una condición óptima de cultivo celular o a una condición próxima al óptimo fisiológico conocido para el sistema célula huésped/ virus respectivo, produciendo este cambio de temperatura en un momento razonable aproximadamente cercano al tiempo de siembra del virus, a saber previo a la infección por virus del cultivo celular, simultáneamente con la infección por el virus o en un momento posterior a la infección por virus del cultivo celular.

Una forma de realización de la presente invención se refiere a una estrategia de cambio de temperatura del cultivo celular para potenciar la producción de virus; en la que el cambio de temperatura comprende hacer descender la temperatura del cultivo celular hasta un nivel subóptimo durante el crecimiento celular durante un intervalo de tiempo previo a infectar las células con el virus respectivo, tal como un vector de adenovirus recombinante. En el momento o cerca del momento de la infección por el virus, se vuelve a cambiar la temperatura hasta la temperatura fisiológica del cultivo celular, o hasta una temperatura próxima a la temperatura fisiológica del cultivo; la combinación de exposición de la célula a la temperatura baja y el cambio ascendente reflejan una práctica fisiológicamente óptima para la producción del virus.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a una estrategia de cambio de temperatura de cultivo celular para potenciar la producción del virus; en la que el cambio de la temperatura comprende hacer descender la temperatura del cultivo celular hasta un nivel subóptimo durante el crecimiento celular a partir del momento de

inoculación del cultivo celular con las células huésped desde células criopreservadas y la continuación del cultivo celular a una temperatura subóptima durante uno o más pasajes hasta un cambio de la temperatura hasta una temperatura óptima, que debe producirse en un momento razonable próximo al tiempo de siembra del virus, a saber previo a la infección por virus del cultivo celular, simultáneamente a la infección por virus o en un momento posterior a la infección por virus del cultivo celular.

Con este objeto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir virus que comprende inocular y cultivar células huésped en un medio adecuado a una temperatura inferior a la fisiológicamente óptima para el crecimiento de la célula huésped, infectar las células huésped con un virus, dando como resultado las células huésped infectadas por virus, cultivar las células huésped infectadas por virus a la temperatura fisiológica óptima o a una temperatura próxima para producir el virus, recoger y lisar las células huésped, y a continuación purificar los virus fuera de las células huésped recogidas, lisadas, dando como resultado un producto purificado del virus.

Una forma de realización específica de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir virus que comprende inocular y cultivar células huésped en un medio adecuado a una temperatura fisiológicamente óptima o a una temperatura próxima para el crecimiento de la célula huésped, cambiar la temperatura del cultivo de células huésped hasta una temperatura inferior a la fisiológicamente óptima para el crecimiento de la célula huésped, infectar las células huésped con un virus, dando como resultado las células huésped infectadas por virus, cultivar las células huésped infectadas por virus a una temperatura fisiológica óptima o a una temperatura próxima para producir el virus, recoger y lisar las células huésped y purificar el virus fuera de las células huésped recogidas, lisadas, lo que da como resultados un producto purificado del virus.

El marco de tiempo para un cambio hasta una temperatura subóptima es de preferencia desde aproximadamente 4 horas para el período completo de cultivo previo a la infección (incluido desde el tiempo de inoculación del medio de cultivo con las células huésped por medio de la inoculación de una ampolla de células criopreservadas) previo a la etapa de infección; incluyendo pero no limitado a una inoculación inicial del cultivo a una temperatura subóptima, uno a varios pasajes de la célula a una temperatura subóptima, seguido por un cambio de la temperatura hasta una temperatura fisiológica óptima para la infección y la producción de virus.

Los procedimientos descritos en este documento y según lo resumido en parte en los párrafos anteriores de esta sección se aplican de preferencia a cualquier serotipo de un adenovirus de 1^o o 2^o generación. Las temperaturas de preferencia previa y posterior a la infección del cultivo celular incluyen pero no se limitan a un intervalo desde aproximadamente 31°C hasta 35°C para el crecimiento celular subóptimo y desde aproximadamente 35°C hasta 38°C como intervalo fisiológico óptimo para cualquier período del cultivo previo (preinfección) o tras la infección (postinfección) del cultivo de células huésped con un stock de siembra del virus.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento simple además de eficaz para potenciar la producción de virus en un sistema de cultivo de producción de virus/célula huésped establecida que incorpora un esquema de temperaturas según lo descrito en este documento para el crecimiento celular y la infección por virus.

Otro objeto es proporcionar tal procedimiento mejorado de producción del virus incorporando una estrategia de cambio de la temperatura durante la producción del virus que necesita un cambio hasta una temperatura subóptima durante el cultivo celular durante un período de tiempo previo a la siembra del cultivo con el virus, seguido por un segundo cambio de temperatura en el sistema de cultivo que da como resultado un retorno a la temperatura fisiológica óptima o a una temperatura próxima para el sistema de cultivo de producción de virus/célula huésped respectiva.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un diseño esquemático de los múltiples pasajes de células PER.C6TM e infección por adenovirus a temperaturas en frascos rotativos bajo condiciones sin suero.

La Figura 2A y la Figura 2B muestran las concentraciones de células viables de células PER.C6TM infectadas por adenovirus cultivadas a temperaturas de 31, 33, 35, 37, y 39°C: A. Grupo I con células cultivadas a 37°C previo a la infección por virus; B. Grupo II con células cultivadas a 33°C durante 8 días previo a la infección por virus.

Las Figuras 3A y 3B muestran las viabilidades de las células PER.C6TM infectadas por adenovirus cultivadas a temperaturas de 31, 33, 35, 37, y 39°C: A. Grupo I con las células cultivadas a 37°C previo a la infección por virus; B. Grupo II con las células cultivadas a 33°C durante 8 días previo a la infección por virus. Las Figuras 4A, 4B y 4C muestran la cinética de la replicación del adenovirus y efectos de la temperatura del cultivo en la productividad viral en cultivos de PER.C6TM a temperaturas de 31, 33, 35, 37, y 39°C: A. productividad viral intracelular en el Grupo I con las células cultivadas a 37°C previo a la infección por virus; B. productividad viral intracelular en el Grupo II con las células cultivadas a 33°C durante 8 días previo a la infección por virus; C. relación de productividad viral del Grupo II con respecto al Grupo I.

La Figura 5 muestra el diseño experimental similar al de la Figura 1, a saber, medición del efecto que tiene el período de tiempo a una temperatura "subóptima" en la producción del virus Ad5gag.

La Figura 6 muestra la producción del virus bajo diferentes esquemas de temperatura del estudio descrito en la Figura 5.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para maximizar la producción de un virus que es relativamente termoestable bajo las condiciones de cultivo, típicamente cualquier virus sin envoltura, tal como adenovirus, parvovirus, reovirus, y/o picornavirus. Es una práctica aceptada realizar el crecimiento celular en cultivo típicamente a la temperatura fisiológica de 37°C y la propagación del virus se realiza a la misma temperatura que el crecimiento celular o se cambia hasta una temperatura más baja. La base para tal estrategia de producción ha sido que el cultivo a la temperatura fisiológica permite el crecimiento celular óptimo pero la temperatura óptima para la producción de muchos virus es usualmente más baja debido a la productividad y a la estabilidad mejoradas. La presente invención se basa en un enfoque contraintuitivo que incluye los intervalos de temperaturas de cultivo celular/producción del virus que da por resultado una mejora sustancial de la producción del virus termoestable. Más específicamente, la presente invención se refiere a una estrategia de cambio de la temperatura del cultivo celular/producción del virus por la que el cultivo de las células huésped se cambia a una temperatura subóptima de cultivo durante un intervalo de tiempo previo a la infección por el virus o las células se cultivan a un nivel subóptimo durante todo el proceso de expansión celular que incluye uno o más pasajes del crecimiento celular a partir de células criopreservadas, seguida por un cambio nuevamente hasta una temperatura óptima para la producción del virus. En este documento se ejemplifica la producción de un adenovirus serotipo 5 recombinante que codifica un transgen gag de VIH (Ad5gag). En este documento se muestra que se presenta una mejora de 2-3 veces en la producción de Ad5gag recombinante cuando se disminuye la temperatura para el crecimiento de la célula huésped hasta un nivel subóptimo durante un intervalo de tiempo previo a la infección por el virus. La temperatura se cambia nuevamente hasta los niveles óptimos posteriormente a la infección por el virus.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para maximizar la producción de un virus termoestable basado en una estrategia de cambio de la temperatura del cultivo celular que da por resultado una mejora sustancial de la producción del virus termoestable. La manipulación de la temperatura dentro del proceso del cultivo celular/producción del virus descrita en este documento se basa en una estrategia de cambio de la temperatura por el que (1) el cultivo de las células huésped se cambia hasta una temperatura subóptima durante un intervalo de tiempo previo a la infección por el virus o, (2) el cultivo de células huésped se inocula y cultiva a una temperatura subóptima respectiva, seguido por un cambio nuevamente hasta una temperatura óptima de crecimiento en un momento próximo a la infección o en el momento de la infección de las células huésped respectivas por el virus. La adaptación de tal estrategia de cambio de la temperatura presenta un procedimiento simple y además eficaz para aumentar sustancialmente los virus recuperables dentro de un esquema respectivo de célula huésped/producción del virus sin la necesidad de manipular además otras condiciones del cultivo y/o del medio dentro de un esquema establecido de célula huésped/producción del virus. Aunque las condiciones específicas del cultivo celular y de la producción de virus se describen dentro de las secciones de Ejemplos en este documento, estará dentro del ámbito del experto en la técnica el uso de esta estrategia de cambio de temperaturas para optimizar la producción de virus para otros virus termoeestables, sin tener en cuenta la combinación respectiva célula huésped/virus. El experto puede, con las presentes enseñanzas a disposición, adaptar y optimizar una estrategia de cambio de temperaturas que de por resultado el mayor aumento posible en la producción del virus. También está dentro del alcance de la presente invención alterar o manipular las condiciones de cultivo, los componentes del medio y otras de tales etapas o procedimientos conocidos por el experto que pueden usarse en combinación con una estrategia de cambio de temperaturas. Tales parámetros incluyen pero no se limitan a la alteración del intervalo del cambio hasta condiciones subóptimas de cultivo (por ejemplo, un cambio del cultivo celular desde 37°C hasta 33°C y nuevamente hasta 37°C frente a 37°C hasta 31°C y nuevamente hasta 37°C), el período de tiempo de cultivo de las células huésped a una temperatura subóptima (por ejemplo, desde el momento de la inoculación, 1 día, 4 días, 20 días, etc.), así como una coordinación de la infección por el virus con un retorno a las condiciones óptimas del cultivo celular (por ejemplo, postinfección, en el momento de la infección, o en un momento específico previo a la infección por el virus). Sin importar los parámetros específicos adoptados, la incorporación de una estrategia de cambio de temperaturas permitirá obtener eficazmente un aumento sustancial en la producción del virus frente a la utilización de esos mismos parámetros que omitan una estrategia de cambio de temperatura del cultivo celular. En otras palabras, el procedimiento de cambio de temperaturas descrito en este documento será especialmente útil para aumentar la producción del virus más allá de los niveles de producción que existen para un sistema respectivo de célula huésped/virus.

En vista de la discusión, *supra*, y de las secciones de Ejemplos, *infra*, la presente invención se refiere a una estrategia de cambio de la temperatura del cultivo celular para potenciar la producción de virus; en la que el cambio de temperaturas comprende una disminución de la temperatura del cultivo celular hasta un nivel subóptimo durante un período de tiempo previo a poner las células en contacto con el virus respectivo, tal como un vector de adenovirus recombinante. En el momento de la infección por el virus o cerca del mismo, se cambia nuevamente la temperatura hasta la temperatura fisiológica del cultivo celular, o hasta una temperatura que se aproxime a la temperatura fisiológica del cultivo. Como se ejemplifica en este documento, la producción de un vector de adenovirus recombinante se optimiza usando una estrategia de cambio de la temperatura. Las células huésped se cultivan en el intervalo de temperaturas óptimo de crecimiento desde 35 hasta 38°C, de más preferencia aproximadamente a 36-38°C, y especialmente a 37°C en los pasajes tempranos para permitir la expansión rápida de las células para la producción a gran escala, lo que reduce la duración del ciclo del lote. A continuación se baja la temperatura de cultivo celular hasta una temperatura subóptima dentro de un intervalo desde 31°C hasta 35°C (por ejemplo, 33°C); y se mantiene durante hasta varios días

previo a la infección por el virus. Tras la infección por el virus, se aumenta la temperatura hasta el intervalo de 35-38 °C para maximizar la productividad de virus. Esta estrategia de cambio de temperaturas da por resultado una mejora significativa (2-3 veces en frascos rotativos y aproximadamente 2 veces en biorreactores controlados de tanque agitado de 2 litros) en la productividad volumétrica y del virus específico de célula comparado con los enfoques tradicionales de mantenimiento de la misma temperatura o de disminución de la temperatura posteriormente a la infección por el virus. Aunque la presente invención se ejemplifica para un adenovirus serotipo 5 recombinante, la estrategia de cambio de la temperatura que se describe en este documento es aplicable a otros serotipos de adenovirus, así como también a otros virus termoestables, tales como picornavirus. La invención se refiere especialmente a la producción aumentada de todos los serotipos de adenovirus usando líneas celulares de mamífero E1-transformadas (293, PER.C6, etc.) en todos los tipos de recipientes de cultivo (matraces T, frascos rotativos, Nunc Cell Factories, Cell Cubes, biorreactor Wave, matraz de centrifugación, matraz de agitación, biorreactores de tanque agitado, etc.) donde se implementa el control de temperatura. Por consiguiente, según se indicó anteriormente, la presente invención se basa en parte en una estrategia de cambio de la temperatura para el crecimiento celular que comprende reducir la temperatura del cultivo hasta un nivel subóptimo durante un período de tiempo previo a la siembra del virus, seguida por un retorno a la temperatura fisiológica para la producción de ese virus particular o a una temperatura próxima previo a, simultáneamente, o tras la infección de células huésped con el virus. Otros parámetros que pueden además manipularse con relación al procedimiento de cambio de la temperatura que se describe en este documento y que están dentro del alcance de la presente invención incluyen pero no necesariamente se limitan a (1) alteración del intervalo del cambio hasta condiciones subóptimas de cultivo; (2) alteración del período de tiempo de cultivo de células huésped a una temperatura subóptima; y (3) coordinación del momento de infección del cultivo celular con el virus con un retorno a una condición óptima de cultivo celular hasta las condiciones fisiológicas óptimas conocidas o hasta condiciones próximas a las mismas para el sistema respectivo de célula huésped/virus, produciéndose este cambio de la temperatura en un momento razonable alrededor del momento de siembra del virus, a saber previo a la infección del cultivo celular con el virus, simultáneamente a la infección por el virus o en un momento posterior a la infección del cultivo celular por el virus.

En una forma de realización de la presente invención, la temperatura del cultivo celular se cambia primero desde una temperatura fisiológica óptima (por ejemplo, desde 35°C hasta 38°C) hasta una temperatura de 35°C o inferior durante un período de tiempo y a continuación se hace retornar al cultivo a una temperatura fisiológicamente óptima en el momento o en un momento cercano a la infección del cultivo celular por el virus. Este régimen da como resultado un aumento eficaz en la producción del virus tras la infección y retorno a las condiciones de cultivo a los niveles óptimos. Está contemplada cualquier temperatura “subóptima” a 35°C o inferior (con intervalos desde 31°C hasta 35°C, de preferencia desde 31°C hasta 34°C, y de mayor preferencia desde aproximadamente 31°C hasta 33°C, resultando aún útil para el experto un intervalo más alto desde 33°C hasta 35°C) para poner en práctica la invención, siempre que la temperatura “subóptima” de cultivo celular soporte un crecimiento celular razonable y la temperatura óptima para el crecimiento del cultivo celular sea desde 35°C hasta 38°C (una vez más, representando 36-38°C y posteriormente 36,5 hasta 37°C los intervalos especialmente de preferencia) y siempre que haya un aumento de temperatura desde el crecimiento celular hasta la infección por el virus. Según se indicó anteriormente, aunque el experto en la técnica puede probar fácilmente una temperatura subóptima inferior, un intervalo de temperaturas subóptimas de preferencia es desde 31°C hasta 35°C, con un intervalo de más preferencia desde 31°C hasta 34°C, siendo útiles para el experto los subintervalos desde 31°C hasta 33°C y/o desde 33°C hasta 35°C. Una estrategia de cambio de temperaturas de preferencia es aquella que minimiza eficazmente la duración de la expansión celular desde un vial hasta en producciones a gran escala: las células se expanden a la temperatura fisiológica de 37°C y se realiza el cambio hasta la temperatura subóptima durante un tiempo específico, usualmente durante al menos 24 horas previo a la infección con el virus, con un retorno a la temperatura de crecimiento celular (tal como 37°C) o ligeramente inferior, dependiendo de la célula huésped y/o virus respectivos.

Como se indicó en el párrafo previo, una forma de realización de la presente invención se refiere al período de tiempo al que se somete el cultivo a condiciones subóptimas de crecimiento. El período de tiempo puede variar en cualquier caso, desde varias horas, hasta varios pasajes (múltiples días), hasta el período completo de expansión celular inoculando el cultivo inicial desde un vial congelado que contiene un stock de células huésped. En el alcance de la presente invención está incluido un escenario, y todo lo que lo rodea, en el que el cultivo se inocula inicialmente a la temperatura subóptima y se mantiene a esta temperatura inferior hasta la siembra con el stock del virus. Debe también entenderse que están dentro del alcance de la invención pequeñas manipulaciones de un régimen de temperaturas subóptimo (por ejemplo, tal como un aumento de la temperatura durante un plazo corto seguido por un cambio de disminución de la temperatura nuevamente hasta la temperatura “subóptima”) y la duración del crecimiento subóptimo, y el tiempo de retorno a la temperatura hasta la temperatura óptima con respecto al momento de la infección por el virus (por ejemplo, aumento de la temperatura varias horas tras la infección por el virus o varias horas previo a la infección, etc.).

La célula huésped para uso en el protocolo de cambio de temperaturas que comprende la presente invención puede ser cualquier línea celular de mamífero que soporte la replicación del virus termoestable respectivo, especialmente cualquier línea de células huésped conocida en la técnica que soporte la infección y replicación de un vector de adenovirus de 1° y 2° generación. Una célula huésped de preferencia es una línea de células huésped que soporta la infección y replicación de un adenovirus recombinante con delección de la región E1 y/o E1/E3. Según se describe en este documento, tal virus incompetente para la replicación (tal como un Ad5gag, como se ejemplifica en este documento) necesita una línea celular ayudante que complemente la delección de E1 de Ad5. Puede usarse cualquiera de tales líneas celulares para generar virus recombinantes, resultando de preferencia, pero sin limitación, las líneas

celulares que incluyen células 293, células PER.C6TM, células 911 de una línea celular retiniana embrionaria humana (Fallaux y col. 1996, Human Gene Therapy 7: 215-222); amniocitos E1-transformados (Schiedner y col. 2000, Human Gene Therapy 11: 2105-2116); una línea celular A549 E1-transformada para un carcinoma de pulmón humano (Imler y col. 1996, Gene Therapy 3: 75-84) y GH329: HeLa (Gao y col. 2000, Human Gene Therapy 11: 213-219). Tal línea celular se transforma para soportar la replicación y el empaquetamiento de un adenovirus recombinante respectivo, tal como un adenovirus recombinante con delección de la región E1 o E1/E3. Otras líneas celulares que pueden utilizarse en la presente invención son una vez más líneas celulares que se han adaptado para actuar como célula huésped para un virus termoestable particular. Resulta de preferencia que la línea celular sea una línea celular continua y de más preferencia que la fuente de células cultivadas se origine de un tejido no neoplásico. Resulta también de preferencia que la fuente sea de mamífero, más probablemente de origen primate, y especialmente de origen humano. Una vez más, una línea celular de preferencia es una línea celular que sea útil para la propagación de un virus recombinante con delección de E1/E3 o AdE1; un virus recombinante que complementa el vector de adenovirus con delección de la región E1 incluyó líneas celulares transfectadas con el gen que codifica AdE1 que se ha seleccionado para este fenotipo transformado, tal como células 293 (células epiteliales de riñón humano) y PER.C6TM (retinoblastos embrionarios humanos). Otros tipos de células incluyen pero no se limitan a células HeLa, células A549, células KB, células CKT1, células NIH/3T3, células Vero, células de ovario de hámster chino (CHO), o cualquier célula eucariota que soporte el ciclo vital del adenovirus.

Resulta de preferencia, pero no necesario, que el cultivo sea un cultivo en suspensión; un cultivo en suspensión que se mantiene en un medio adecuado que soporte el crecimiento celular, la infección por el virus y la producción del virus. Tal cultivo en suspensión es bien conocido en la técnica y, una vez más, puede modificarse en cualquier número de formas conocidas por el experto sin efectuar una incorporación útil de una estrategia de cambio de temperaturas para aumentar la producción del virus. El medio de cultivo puede someterse a diversas condiciones de crecimiento adecuadas para la producción del virus, que incluyen pero no se limitan a operaciones discontinuas, semicontinuas o continuas para introducir medio fresco en el medio de cultivo. Una vez más el medio de cultivo puede ser cualquier medio adecuado para mantener a las células y permitir la propagación del virus respectivo. En la técnica se conocen numerosos ejemplos de medios adecuados para uso en la práctica de la presente invención, y los principios para generar medios modificados o nuevos adecuados. Para una revisión, véase el Capítulo 8 (medios basados en suero) y el Capítulo 9 (medios sin suero) de Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique; Ed. Freshen, RI, 2000, Wiley-Liss, pág. 89-104 y 105-120, respectivamente. En general, pueden manipularse tanto los medios basados en suero como los medios sin suero para potenciar el crecimiento de la línea celular respectiva en cultivo, con un potencial para la inclusión de cualquiera de los siguientes: una selección de proteínas celulares secretadas, nutrientes difundibles, aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, metales en cantidades traza, azúcares, y lípidos así como tal vez otros compuestos tales como sustancias promotoras del crecimiento (por ejemplo, citocinas). Como se observa en el Índice de Marcas en las páginas 483-515 de Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, (id.), los proveedores potenciales de información y medios de cultivo celular son virtualmente un sinfín. Un medio de preferencia usado en el contexto de la presente invención es un medio definido, tal como el medio ejemplificado en este documento como medio Ex-Cell 525 (de JRH Biosciences, [http://www.jhr-bio.com]) y medio 293 SFM II (de Invitrogen). Resulta también deseable que tales medios estén suplementados con glutamina, como se describe en este documento.

Los tipos del virus que son susceptibles a la estrategia de cambio de temperaturas de la presente invención son de preferencia de dos familias de virus que son virus de ADN sin envoltura que infectan células humanas. Estos dos tipos de virus son la familia *Adenoviridae* (incluidos todos los serotipos de adenovirus conocidos, y virus recombinantes generado de tales serotipos de adenovirus) y los miembros de la familia *Picornavirus* (por ejemplo, poliovirus, rinovirus, virus de la hepatitis A, virus de fiebre aftosa). En este documento se ejemplifica un serotipo del adenovirus 5, un miembro de la familia *Adenoviridae*. El término "virus" como se usa en este documento tiene la intención de abarcar cualquier virus que sea susceptible de completar su ciclo de replicación en la línea celular de mamífero de elección. Por consiguiente, este término tiene ciertamente la intención de incluir virus de tipo salvaje, cualquier virus genéticamente modificado tal como un virus atenuado, o más probablemente un vector de virus recombinante que pueda ser un candidato de desarrollo para una potencial terapia génica y/o aplicación de vacunación de ADN. Tales programas han creado una necesidad para la fabricación y purificación a gran escala de virus de grado clínico. Un virus recombinante de preferencia que es susceptible a los parámetros mejorados de cultivo celular/producción del virus que se describen en este documento son una familia de virus conocidos como los adenovirus. Los adenovirus están agrupados dentro de la familia *Adenoviridae*, que se divide en el género *Aviadenovirus* (aves) y *Mastadenovirus* (seres humanos, simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos y zarigüeyas). En la técnica se conoce muy bien a los adenovirus y son tema de muchas revisiones, tales como las que pueden encontrarse en Fundamental Biology, 3ª Edición, Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Ed., en el Capítulo 30, pág. 979-1016 (1996), que se incorpora en este documento por referencia. Resulta de interés específico en las aplicaciones de vacunación y/o terapia génica el uso de un adenovirus incompetente para la replicación de primera generación, alterados por delecciones en las regiones E1 y/o E3, basados en cualquiera de una serie de serotipos del adenovirus, tales como el serotipo 5 de adenovirus. A otro tipo de vector se lo denomina vector de adenovirus de 2º generación, e incluye comúnmente una clase de vectores de adenovirus que incluye vectores de adenovirus "gutless". Los vectores de adenovirus gutless son vectores adenovirales generalmente desprovistos de secuencias virales codificadoras de proteínas, con frecuencia con proteínas virales suplementadas in trans por un virus ayudante (frecuentemente un adenovirus con delección de E1) cultivado con el adenovector HD en una línea celular empaquetadora (por ejemplo, PER.C6TM). En ausencia de proteínas virales estos vectores virales pueden, en el caso alternativo, ser suplementados in trans por una línea celular capaz de expresar las proteínas adenoviral estructurales y funcionales necesarias para la replicación exitosa, empaquetamiento y rescate. Los únicos elementos

cis generalmente presentes en el vector HD son la señal de empaquetamiento y las repeticiones terminales invertidas (ITR). De preferencia, incluidos el transgen y cualquier ácido nucleico exógeno no transcrito incorporado en el mismo (ADN de relleno), el virión de Ad tiene groseramente al menos 75% de la longitud del genoma de tipo salvaje. Se ha informado que el virión de Ad exhibe esencialmente un límite de empaquetamiento inferior de aproximadamente 75% la longitud del genoma de tipo salvaje; véase Parks y Graham, 1997 J. Virology 71(4): 3293-3298. Se ha encontrado que los genomas de vectores adenovirales más pequeños que 27,7 kb se empaquetan ineficazmente y experimentan con frecuencia transposición. Los adenovirus tienen un gran tropismo celular que incluye células profesionales presentadoras de antígenos tales como macrófagos y células dendríticas, pueden infectar (si no replicarse en) células de la mayoría de las especies animales, y pueden producirse en grandes cantidades en las líneas celulares humanas adecuadas diseñadas para proporcionar el producto del gen E1 in trans.

En una serie de experimentos que ejemplifican con eficacia la presente invención, pero que no sugieren de ninguna manera una limitación al alcance de la misma, se infectaron células PER.C6™ a 33 y 37°C con un vector de adenovirus de primera generación que expresaba gag de VIH-1 a temperaturas de 31, 33, 35, 37, y 39°C para la producción del virus. Se estudiaron los efectos de la temperatura en el metabolismo de la célula infectada y en la producción del adenovirus. Se observó que el crecimiento de las células PER.C6™ se volvió mucho más sensible a la temperatura de cultivo tras la infección del adenovirus (Figura 2A y 2B en el Ejemplo 1). Inclusive a bajas temperaturas, las células PER.C6 todavía crecieron bien, no obstante a una velocidad más baja y mantuvieron elevada viabilidad a bajas temperaturas. Como resultado de la infección por el virus y de la rápida replicación a altas temperaturas, el crecimiento celular se bloqueó y la viabilidad celular disminuyó rápidamente como resultado de la infección por el virus y de la rápida replicación (Figura 3A y 3B en el Ejemplo 1). La temperatura también afectó a la cinética y a la productividad de replicación del adenovirus. La temperatura fisiológica de 37°C soportó la replicación viral más rápida, sin importar la temperatura de crecimiento celular previo a la infección. La concentración viral máxima se presentó más temprano a temperaturas más altas. Con las células cultivadas a 37°C previo a la infección, la concentración intracelular de virus más alta se presentó a 35°C. Se presentó a 37°C con las células cultivadas a 33°C previo a la infección. Se ha mostrado que la historia de expansión celular previo a la infección por el virus desempeña una función crítica en el metabolismo de la célula infectada y en la producción del virus. Las células cultivadas a 33°C previo a la infección tuvieron productividad viral significativamente más alta (60% hasta 200%) a todas las temperaturas posteriores a la infección. Los resultados demuestran que la temperatura del cultivo es un parámetro altamente crítico del proceso en la producción del adenovirus. Se ha ejemplificado la mejora del cambio de temperaturas tanto en frascos rotativos a pequeña escala como en tanques agitados de 2 litros o estudios de recipientes de biorreactores. Como se muestra en este documento, una vez más como un ejemplo pero de ninguna manera como limitación, la velocidad de crecimiento celular a una temperatura inferior a 35°C disminuye significativamente pero esta temperatura subóptima para el crecimiento celular previo a la infección por el virus es óptima para la producción posterior del virus a una temperatura más alta (es decir, un cambio ascendente de la temperatura). También se ha mostrado en este documento que uno a dos pasajes de crecimiento celular a tal temperatura subóptima son aceptables para la producción del vector de adenovirus. La estrategia de cambio de temperaturas descrita en este documento puede implementarse fácilmente en cualquier escala de producción controlando la temperatura a diferentes niveles durante el procedimiento. En la producción a gran escala, se percibe que la temperatura de crecimiento celular durante la expansión celular temprana previo al crecimiento celular y la infección por el virus en la producción a gran escala puede establecerse en la temperatura física óptima para conseguir la expansión celular más rápida para reducir la duración de células en lote. Sin embargo, los autores de la invención han mostrado que un cambio descendente en la temperatura durante el cultivo celular previo a la infección (por ejemplo, tal como desde siete hasta dieciséis días antes de la infección viral prevista), puede cambiarse la temperatura para el crecimiento celular de manera descendente hasta 31-35°C, de más preferencia desde 31°C hasta 34°C, permaneciendo muy útiles los subintervalos desde 31°C hasta 33°C y/o 33°C hasta 35°C, dependiendo de las condiciones del cultivo celular respectivo (esto podría presentarse en el recipiente de siembra para el recipiente de la producción final y en el recipiente de la producción final). Inmediatamente tras la infección por el virus, se eleva la temperatura hasta 35-38°C, de preferencia desde 36-38°C y de mayor preferencia desde 36-37°C para conseguir la producción de virus óptima, como se ejemplifica en los siguientes ejemplos no limitantes. Estos Ejemplos no limitantes se presentan para ilustrar mejor la invención.

Ejemplo 1

Producción de Ad5HIV-1 gag en células PER.C6™

Materiales y Procedimientos:

Línea celular y Mantenimiento - Células PER.C6™ (Fallaux y col., 1998, Human Gene Therapy 9: 1909-1917, véase también la Patente de EEUU N° 5.994.128), se derivó una línea celular de retinoblasto embrionario humana con licencia de Crucell (Leiden, Holanda), transfectando células de retinoblasto embrionario humano con un gen E1 de adenovirus tipo 5 usando un promotor de fosfogliceratoquinasa. La expresión del gen E1 confiere inmortalidad a las células y permite retener el genotipo E1(+) en ausencia de un marcador selectivo. Se adaptaron las células al cultivo en suspensión, y se mantuvieron rutinariamente en medio sin suero Ex-Cell™ 525 (JRH Biosciences, Lenexa KS) suplementado con L-glutamina 4 mM (Mediatech Inc., Herndon VA), en frascos rotativos a 37°C y superposición de CO₂ al 5%/aire al 95%.

Crecimiento de Células a Diversas Temperaturas - Se combinaron dos frascos rotativos de células PER.C6™ mantenidas a 37°C y se usaron para plantar diez frascos rotativos de 850 cm² (Corning, Cambridge, MA) a 4 x 10⁵ células

viabiles por ml y 200 ml de volumen de trabajo por frasco rotativo en medio sin suero Ex-Cell™ 525 suplementado con L-glutamina 4 mM. Se gasearon los frascos con CO₂ al 5%/aire al 95% y se dividieron aleatoriamente en cinco grupos de dos frascos cada uno y se incubaron durante 3 días con una velocidad de rotación de 4 RPM a las temperaturas nominales de 31, 33, 35, 37, y 39°C. Al final de la incubación de 3 días, se combinaron los dos frascos rotativos de cada grupo de temperatura para plantar dos nuevos frascos rotativos e incubarlos a las temperaturas respectivas durante un segundo pasaje de 3 días. Se seleccionaron las células de los grupos de 33 y 37°C para un tercer pasaje en 5 frascos rotativos por grupo durante dos días, seguido por la infección por el virus (véase Figura 1). Los dos grupos de cinco frascos derivados de células cultivadas a 37 y 33°C previo a la infección se denominaron como Grupo I y II, respectivamente.

Stock de Siembra Viral - Se amplificó un vector de adenovirus tipo 5 (con delección de E1 y E3) que expresaba el transgen p55 gag de VIH-1 (véase el documento WO 01/02607) en células PER.C6™.

Infección Viral a Diversas Temperaturas - Se infectaron los 5 frascos rotativos de los grupos de 37°C y 33°C en el día 2 posterior al plantado. Se eliminó el medio agotado por centrifugación, a continuación se resuspendió el sedimento celular en medio Ex-Cell 525™ fresco suplementado con glutamina 4 mM. Se adicionó una cantidad fijada del stock de virus para infectar cada frasco rotativo, dando como resultado una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 240 partículas virales (PV) por célula. Los 5 frascos infectados de cada grupo se incubaron a continuación a las temperaturas nominales de 31, 33, 35, 37, 39°C. Se tomaron muestras de cada frasco rotativo a los 2, 3 y 4 días tras la infección con el virus, y se centrifugaron hasta transparencia. Se retiraron alícuotas de sobrenadante y se almacenaron a -70°C para ensayos de virus extracelulares. Se resuspendieron los sedimentos celulares en medio fresco para dar una concentración de 10 veces a partir del cultivo original, seguido por tres ciclos de congelación y descongelación. A continuación se aclararon los lisados resultantes por centrifugación y se almacenaron a -70°C previo al ensayo para concentraciones virales intracelulares.

Vigilancia y Control de Temperaturas - El cultivo con temperatura controlada tuvo lugar en incubadores recubiertos con agua (Forma Scientific, Marietta OH) y en una habitación templada a 37°C (Environmental Specialties, Raleigh NC). Nueve días previo al comienzo del experimento, se ajustó el punto de temperatura diana de los incubadores y la habitación templada. Se realizaron mapeos de la temperatura de los incubadores y de la habitación templada durante este período para confirmar la estabilidad del control de la temperatura. Se definieron seis posiciones para los frascos en aparatos rotativos en cada uno de los incubadores y en la habitación templada. Se insertaron sondas de temperatura a través de agujeros pasantes en los tapones de los frascos rotativos, con los frascos en su sitio y rotando durante la medición. Estas mediciones aseguraron la precisión de la temperatura del cultivo durante el estudio.

Procedimientos Analíticos - Se midieron las concentraciones celulares con un hemocitómetro y se evaluó la viabilidad por medio de exclusión con azul de trypan. Las concentraciones de partículas virales (PV) se midieron por medio de HPLC de intercambio aniónico (Ensayo AEX), usando una técnica adaptada de Shabram y col. (1997, Human Gene Therapy 8: 453-465). El coeficiente de variación para ensayo de HPLC de intercambio aniónico es típicamente inferior a 10%. Se usó un ensayo de potencia basado en PCR cuantitativa para estimar la infectividad del virus. Se usaron muestras del virus para infectar cultivos de 293 en monocapa en 96 pocillos. Se extrajo el ADN viral de cada pocillo a las 24 horas posteriores a la infección y se cuantificó por medio de un procedimiento de PCR. Se estimó la infectividad del virus a partir de un stock de virus patrón valorado por el ensayo tradicional de TCID₅₀.

Procedimientos de Cálculo - Se calculó la integral de tiempo de concentración celular viable multiplicando la concentración celular promedio con el tiempo de cultivo entre dos puntos de tiempo. La productividad específica del virus se calculó dividiendo la concentración de virus por la concentración de células viables en la infección.

Resultados:

Efectos de la Temperatura en la Productividad del Virus - Se tomaron muestras de todos los frascos rotativos en el día 2, 3, y 4 tras la infección del virus para mediciones de concentración viral. En experiencias previas, se mostró que la concentración del virus en el día 1 tras la infección estaba por debajo del límite de detección del ensayo AEX y por lo tanto no se tomó muestra del día 1 posterior a la infección en un esfuerzo para evitar una reducción en el volumen del cultivo de los frascos rotativos. Las muestras se concentraron aproximadamente diez veces centrifugando las células y resuspendiendo los sedimentos celulares infectados en un volumen más pequeño de medio de cultivo. Se midieron las concentraciones de partículas de virus en los sedimentos celulares por medio del ensayo de HPLC tras 3 procesos de congelación/descongelación para liberar el virus. Las concentraciones de partícula virales en los sedimentos celulares se normalizaron por células como se muestra en la Figura 4 (Figura 4A - Grupo I; Figura 4B - Grupo II). En el Grupo I, la concentración más alta del virus en los sedimentos celulares se presentó a 37°C en el día 2 posterior a la infección, sugiriendo que la velocidad de replicación del virus fue la más alta a esta temperatura. La desviación a cualquier lado de esta temperatura óptima dio por resultado una replicación más lenta del virus. Sin embargo, la concentración intracelular del virus medida de los sedimentos celulares parecía tener un máximo más temprano a temperaturas más altas. En el día 3 posterior a la infección, la concentración del virus en los sedimentos celulares disminuyó tanto a 37 como a 39°C. La concentración disminuida se debió probablemente a la liberación de viriones intracelulares en el medio de cultivo a ya que disminuyó rápidamente la viabilidad celular y se produjo lisis celular. Aunque el virus se replicó algo más lentamente a 35°C, la concentración del virus siguió creciendo en el día 3 posterior a la infección, excediendo la concentración máxima alcanzada a 37°C un día antes. La concentración intracelular del virus más alta en el día 4 cambió además descendente para 33°C. A 31°C, la concentración intracelular

del virus fue solamente una fracción de aquellas a temperaturas más altas, aunque siguió creciendo en el día 4. Sin embargo, fue improbable alcanzar un nivel significativamente más alto por la pobre cinética de replicación.

En el Grupo II, la máxima concentración intracelular del virus se presentó a 37°C en el día 2, a 35°C en el día 3, y a 33°C en el día 4, que es exactamente igual que en el Grupo I. La concentración intracelular máxima se presentó en el día 2 a 37 hasta 39°C, en el día 3 a 33 hasta 35°C, y en el día 4 a 31°C, que es también igual que en el Grupo I. Sin embargo, hay diferencias fundamentales entre los dos grupos. Primero, la concentración intracelular más alta del virus se presentó a 37°C en el día 2 en el Grupo II frente a 35°C en el día 3 en el Grupo I. En segundo lugar, la productividad del virus fue significativamente más alta en el Grupo II a través de todas las temperaturas. En la Figura 6C se muestra una comparación directa se grafican las relaciones de concentración viral del Grupo II con respecto al Grupo I en el mismo día para las cinco diferentes temperaturas. En el día 2 posterior a la infección, las concentraciones virales en el Grupo II fueron desde 60% hasta 200% más altas que en el Grupo I. Las diferencias fueron significativamente mayores a las altas temperaturas. Las diferencias entre los dos grupos llegaron a ser más pequeñas en el día 3 y 4 pero siguieron siendo significativas.

Las concentraciones de virus en los sobrenadantes fueron usualmente inferiores al límite de detección del ensayo de HPLC. Por consiguiente, se usó un ensayo de infectividad más sensible para medir este virus. Se realizaron comparaciones directas de mediciones de las muestras de sobrenadantes y de sedimentos celulares en el mismo ensayo para estimar la distribución intracelular y extracelular relativa de virus. Según lo esperado, se liberó al medio de cultivo una cantidad significativa de virus, especialmente en la etapa tardía de la replicación viral cuando la viabilidad celular se redujo significativamente. Estos datos confirmaron la suposición de que la reducción en la concentración del virus medida en los sedimentos celulares se debió principalmente a la liberación del virus en el medio de cultivo. Aunque la discusión anterior sobre productividad del virus se basó en mediciones solamente en sedimentos celulares, se obtuvo la misma imagen general cuando se explicaron los porcentajes de virus los sobrenadantes.

Los efectos de la temperatura del cultivo en la infección por adenovirus de células PER.C6TM se investigaron a fondo. Se observaron diferencias profundas en el crecimiento de células infectadas y en la producción del virus. Células infectadas con el mismo MOI pero incubadas a diferente temperatura tras la infección dieron lugar a diferentes comportamientos del crecimiento. A temperaturas altas (35-39°C), la infección del adenovirus dio por resultado una detención completa del crecimiento celular, pero se observó crecimiento celular significativo tras la infección a temperaturas más bajas (31-33°C) (Figura 2A para el Grupo I y Figura 2B para el Grupo II). La viabilidad celular tras la infección también mostró una fuerte dependencia con la temperatura del cultivo (Figura 3A para el Grupo I y Figura 3B para el Grupo II). Disminuyó rápidamente durante el curso de la replicación viral a temperaturas más altas pero se mantuvo en niveles razonablemente altos a temperaturas más bajas. El MOI usado para la infección debía ser lo suficientemente alto para una infección sincronizada. El efecto citopático limitado a temperaturas más bajas indica la replicación lenta y alterada del virus, que es coherente con las concentraciones bajas del virus medidas durante cuatro días tras la infección.

La temperatura también afectó la velocidad de replicación del adenovirus dramáticamente. Se encontró que el virus replicó más rápido a temperaturas altas, con la temperatura óptima en 37°C. Como resultado, la concentración del virus en el sedimento celular llegó al máximo más temprano a 37-39°C que a 31-35°C. Sin embargo, la temperatura cinética óptima no coincidió con la máxima productividad del virus. Las células cultivadas a 37°C previo a la infección produjeron la mayor concentración de virus a 35°C mientras que las células cultivadas a 33°C previo a la infección produjeron la concentración más alta a 37°C.

Se observó una fuerte correlación entre la liberación del virus al medio de cultivo y la viabilidad celular. Esta correlación proporciona una estimación simple y rápida del porcentaje de virus en el medio, que podría usarse para desarrollar estrategias de recogida, especialmente en casos en los que solamente puede recogerse virus intracelular. Se encontró que la historia del crecimiento celular tiene un impacto significativo en el crecimiento celular, metabolismo, y productividad del virus. Además, hubo diferencias significativas en la cinética de replicación y la productividad del adenovirus. Las células cultivadas a 33°C previo a la infección tuvieron productividades desde 60% hasta 200% más altas en todas las temperaturas.

Ejemplo 2

Efecto del Momento de Pasaje a la Temperatura Subóptima en la Producción del Virus

Los Materiales y Procedimientos son esencialmente como se describieron en el Ejemplo 1. Brevemente, la Figura 5 resume el diseño experimental. Se inocularon dos biorreactores con células PER.C6[®] en medio sin suero 293 SFM II (Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado con L-glutamina 6 mM (Biowhittaker Inc., Walkersville, MD) a 33,0 y 36,5°C. Las células se cultivaron hasta aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml y se diluyeron en biorreactores nuevos a la temperatura adecuada. El esquema de control de temperaturas para cada recipiente está representado en la Figura 5, usando "cambios de temperatura" de 33,0°C variando desde 2 pasajes hasta 4 horas. Se infectaron las células con un adenovirus defectuoso para la replicación que codificaba un transgen gag de VIH-1 usando una multiplicidad de infección de 70 partículas virales por célula viable. Se cambió la temperatura de todos los reactores hasta 36,5°C inmediatamente tras la infección. La concentración viral a las 48 horas tras la infección (hpi) de muestras del sobrenadante y de caldo entero lisado con Triton-X100 se determinó diariamente por medio de ensayos de HPLC. A continuación se recogió la carga de virus por medio de la adición de un tampón de lisis celular para liberar los virus

intracelulares restantes en el sobrenadante o por medio de liberación de virus intracelulares usando cizallamiento mecánico. Posteriormente se purificó la carga de virus resultante del caldo completo a través de múltiples etapas para eliminar restos celulares, proteínas y ADN de la célula huésped, proteínas y ADN viral no empaquetados, y otras impurezas. Este ejemplo reitera los resultados presentados en el Ejemplo 1, a saber que los estudios en frascos rotativos y en biorreactores de 2 litros indican que controlando la temperatura a 33,0°C durante el crecimiento celular (durante dos pasajes) y a 37,0°C durante la infección aumenta la producción del virus. El cultivo celular a 33,0°C es más lento (tiempo de duplicación de aproximadamente 50 horas) que a 36,5°C (tiempo de duplicación de aproximadamente 30 horas). Esto da como resultado un aumento en el tiempo total del lote desde aproximadamente 12 días en biorreactores hasta aproximadamente 17 días, que disminuye la producción de virus específica del tiempo de una fábrica. Puede corresponder al experto en la técnica optimizar el sistema respectivo tal que se genere la producción óptima de virus a partir del pasaje de temperatura "subóptima" mientras se mantiene la producción viral aumentada observada en los experimentos anteriores.

La Figura 6 muestra la producción de virus bajo diferentes esquemas de control de temperaturas, a saber difiriendo períodos de tiempo a una temperatura subóptima previo a la siembra del virus y elevando la temperatura del cultivo nuevamente hasta la temperatura óptima fisiológica. Estos datos muestran que un cambio de temperatura de algunas horas no proporciona una mejora óptima de la productividad del virus. La duración del "crecimiento celular subóptimo" a una temperatura reducida puede optimizarse además para minimizar la duración proceso de producción. Los datos son coherentes con los resultados obtenidos en frascos rotativos como se describió en el Ejemplo 1. Se obtiene una mejora de 2-3 veces en la productividad del virus con la estrategia de cambio de la temperatura para tiempos de incubación subóptima que varían desde 7 hasta 16 días en comparación con el control de 36,5°C. Debe reconocerse que estos datos pueden ser reflejo de peculiaridades del experimento particular, y que un experto en la técnica puede optimizar las condiciones de cultivo además de la temperatura para acortar el tiempo de incubación subóptima necesario para el crecimiento viral óptimo desde el intervalo mostrado aquí y para ajustar el tiempo para el ascenso de la temperatura relacionado con el momento de la infección con el virus.

El ámbito de la presente invención no debe quedar limitado por las formas de realización específicas descritas en este documento. De hecho, a partir de la anterior descripción resultarán evidentes para los expertos en la técnica diversas modificaciones de la invención además de aquellas descritas en este documento. Tales modificaciones tienen de hecho la intención de estar dentro del alcance de las reivindicaciones.

En este documento se citan diversas publicaciones, cuyas descripciones se incorporan por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir adenovirus, que comprende:

5 a) inocular y cultivar células huésped en un medio adecuado a una temperatura inferior a la fisiológicamente óptima para el crecimiento de la célula huésped;

10 b) infectar las células huésped con un adenovirus, dando como resultado las células huésped infectadas por adenovirus;

c) cultivar las células huésped infectadas por adenovirus a la temperatura fisiológica óptima o a una temperatura próxima para producir adenovirus;

15 d) recoger los virus y/o las células que contienen virus del cultivo; y,

e) purificar los virus fuera de las células huésped y contaminantes del cultivo, dando como resultado un producto purificado del virus.

20 2. Un procedimiento para producir adenovirus, que comprende:

a) cultivar células huésped a una temperatura inferior a la fisiológicamente óptima para promover el crecimiento de las células huésped;

25 b) infectar las células huésped con un adenovirus, dando como resultado las células huésped infectadas por adenovirus;

c) cultivar las células huésped infectadas por adenovirus a la temperatura fisiológica óptima o a una temperatura próxima para producir adenovirus;

30 d) recoger los virus y/o las células que contienen virus del cultivo; y,

e) purificar los virus fuera de las células huésped y contaminantes del cultivo, dando como resultado un producto purificado del virus.

35 3. Un procedimiento para producir adenovirus, que comprende:

a) inocular y cultivar células huésped en un medio adecuado a una temperatura fisiológicamente óptima o a una temperatura próxima para el crecimiento de las células huésped;

40 b) cambiar la temperatura del cultivo celular de la etapa a) hasta una temperatura por debajo de la fisiológicamente óptima para el crecimiento de las células huésped;

45 c) infectar las células huésped de la etapa b) con un adenovirus, dando como resultado las células huésped infectadas por adenovirus;

d) cultivar las células huésped infectadas por adenovirus a la temperatura fisiológica óptima o a una temperatura próxima para producir adenovirus;

50 e) recoger los virus y/o las células que contienen virus del cultivo; y,

f) purificar los virus fuera de las células huésped y contaminantes del cultivo, dando como resultado un producto purificado del virus.

55 4. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que se hace disminuir la temperatura de cultivo en la etapa b) hasta una temperatura por debajo de la fisiológicamente óptima durante al menos los pasajes celulares completos previos a la infección de las células huésped con el virus.

60 5. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que se hace disminuir la temperatura de cultivo en la etapa b) hasta una temperatura por debajo de la fisiológicamente óptima durante al menos 24 horas previo a la infección de las células huésped con el virus.

6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que la temperatura para el crecimiento celular en la etapa b) está entre 31°C y 34°C.

65 7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en el que la temperatura para el crecimiento celular en la etapa a) está entre 35°C y 38°C.

ES 2 299 715 T3

8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 en el que la temperatura de crecimiento de las células huésped infectadas de la etapa d) está entre 35°C y 38°C.

5 9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 en el que la temperatura de crecimiento de las células huésped infectadas de la etapa d) está entre 36°C y 38°C.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

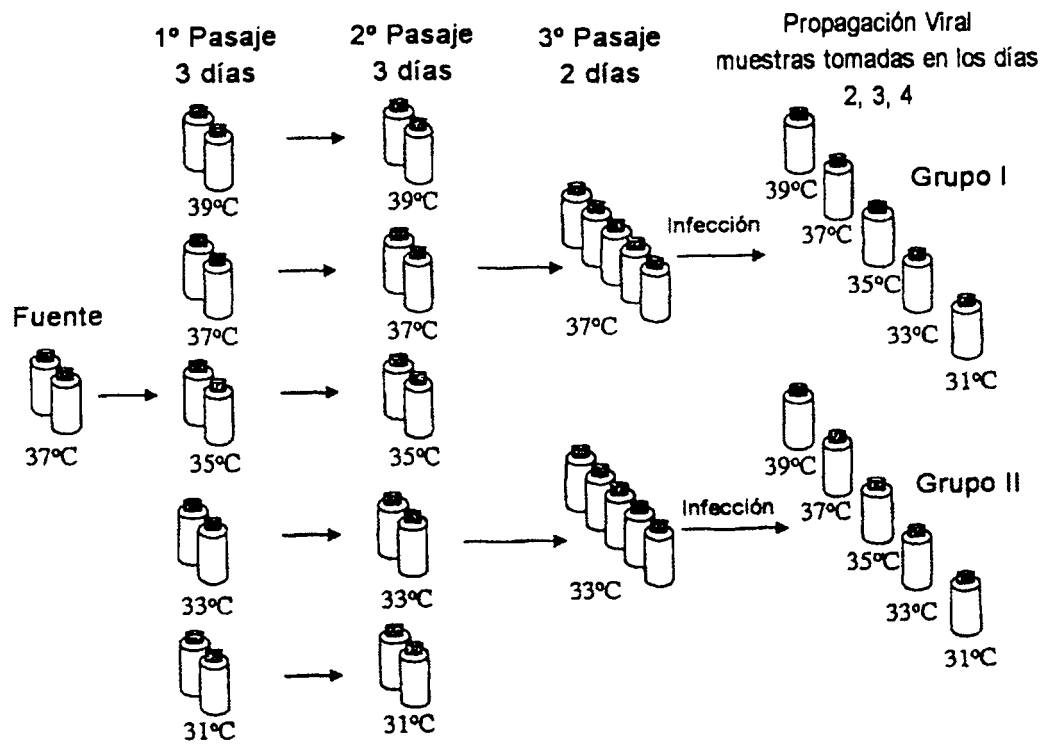


FIGURA 1

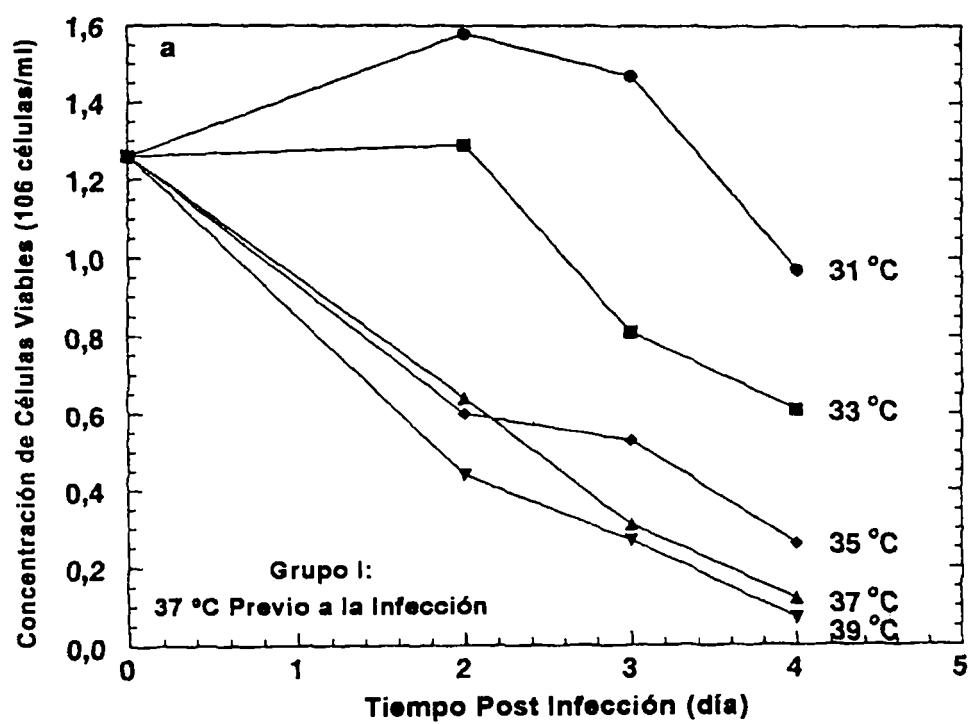


FIGURA 2A

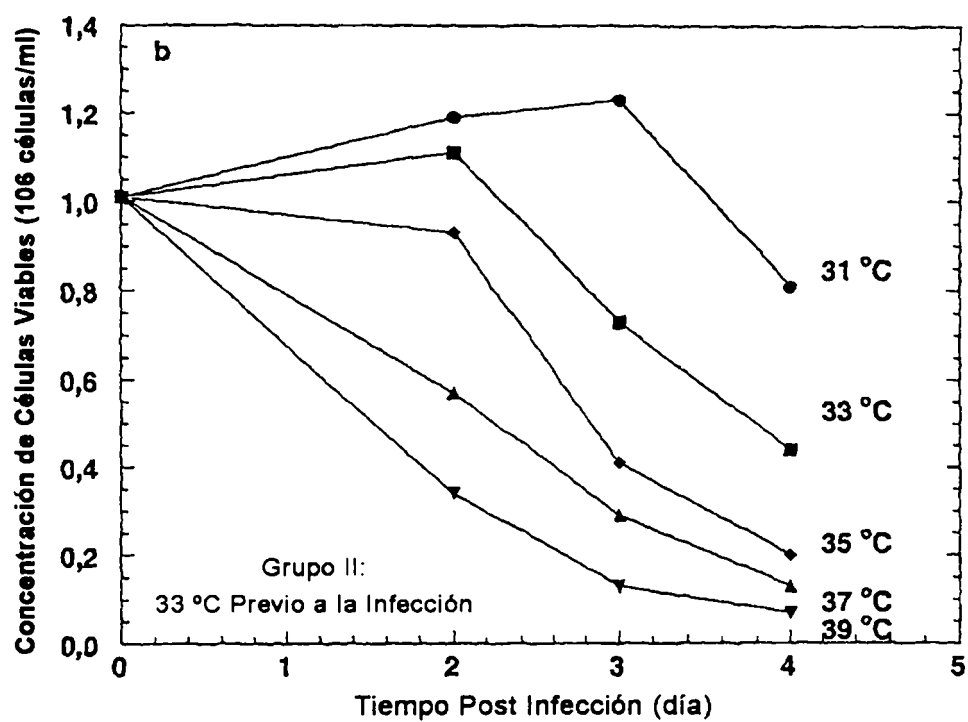


FIGURA 2B

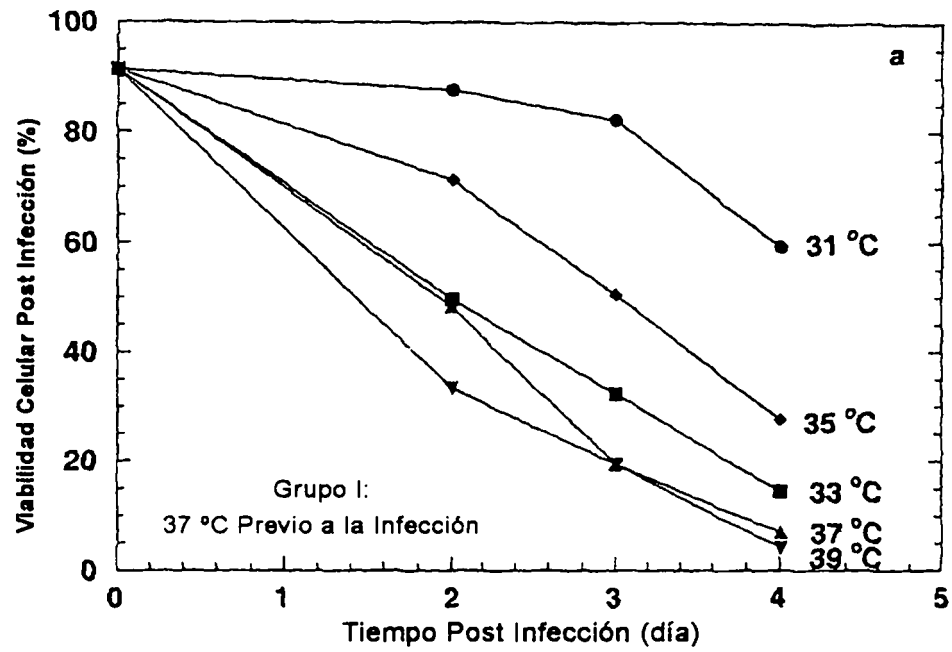


FIGURA 3A

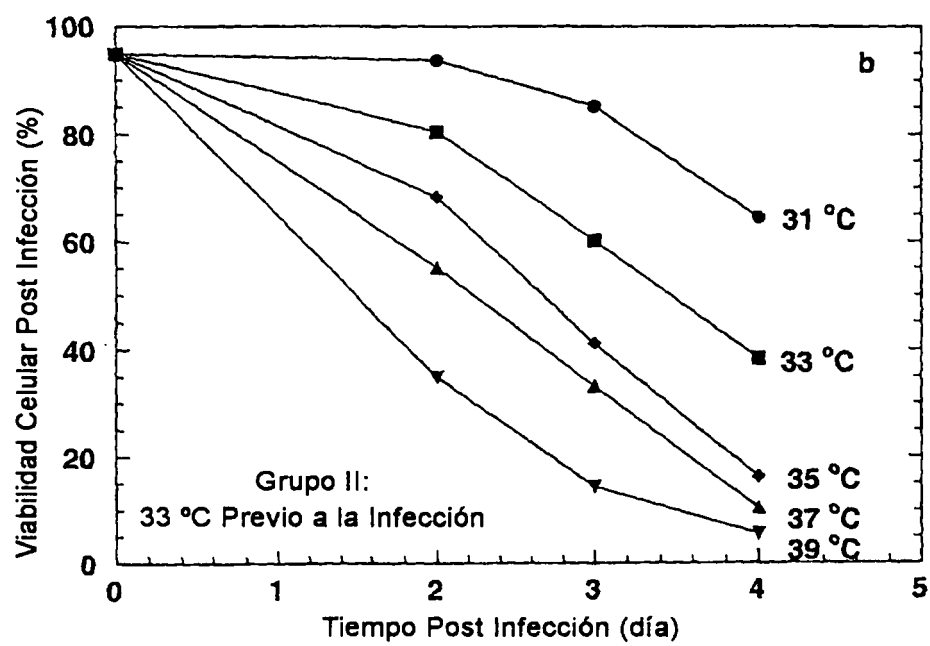


FIGURA 3B

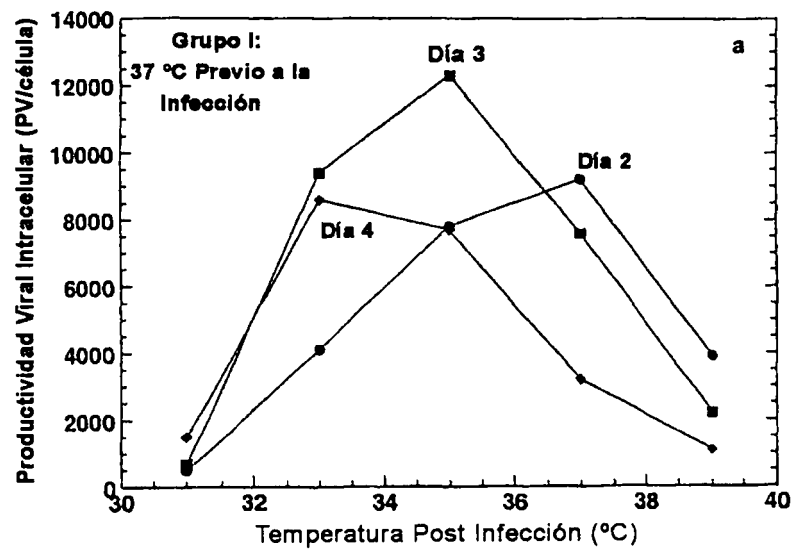


FIGURA 4A

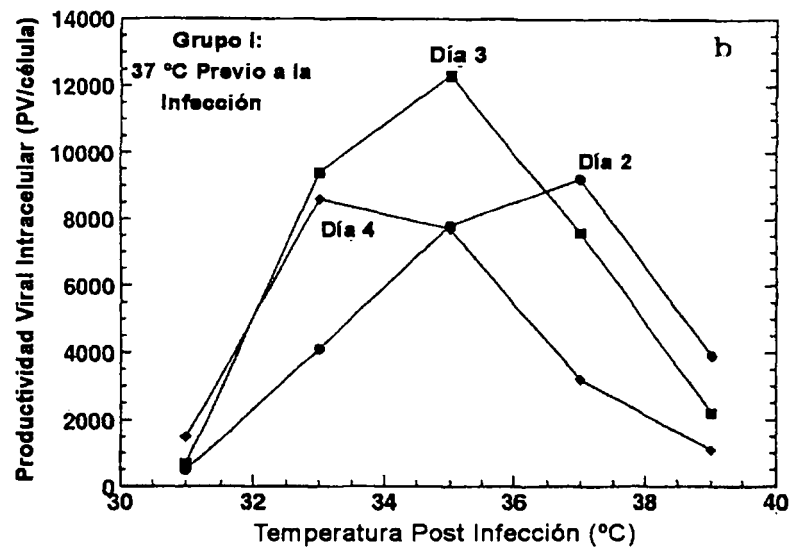


FIGURA 4B

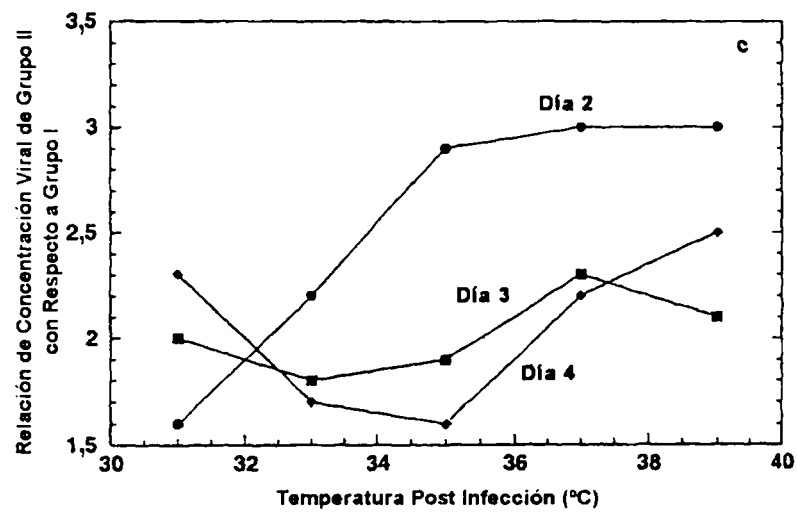


FIGURA 4C

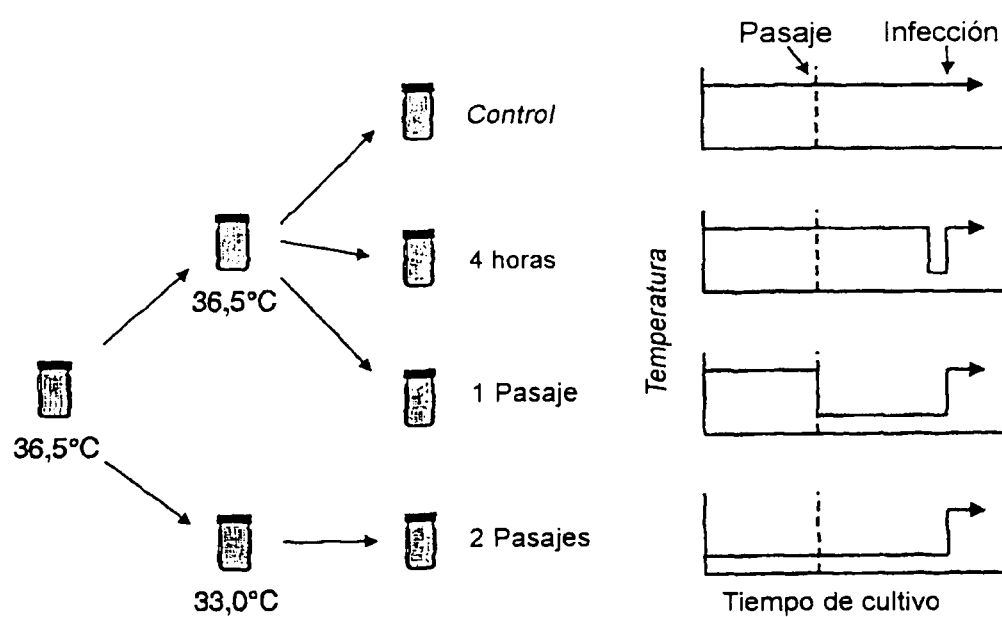


FIGURA 5

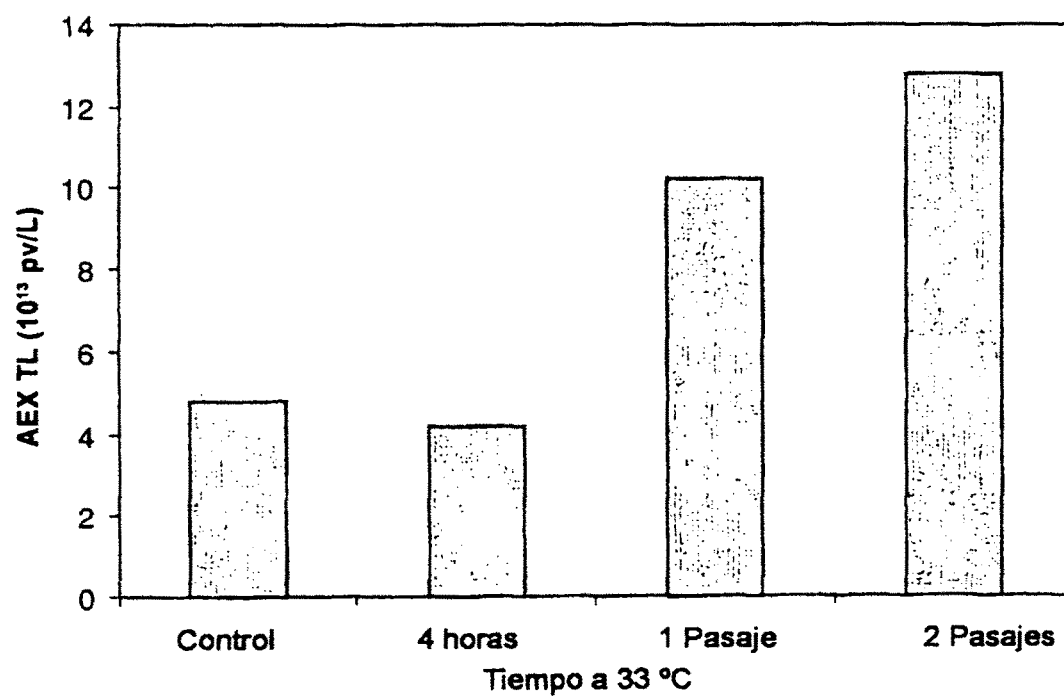


FIGURA 6