

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 247**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2021** **PCT/EP2021/082615**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2022** **WO22112218**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2021** **E 21811385 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 4107252**

54 Título: **Método para la producción de AAV**

30 Prioridad:

**25.11.2020 EP 20209811**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.05.2025**

73 Titular/es:

**CEVEC PHARMACEUTICALS GMBH (100.00%)**  
**Gottfried-Hagen Strasse 62**  
**51105 Köln, DE**

72 Inventor/es:

**CORONEL, JULIANA y**  
**WISSING, SILKE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 017 247 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Método para la producción de AAV

La presente invención se refiere a métodos para la producción de virus adenoasociados (AAV), que comprenden las etapas de proporcionar una línea celular productora de AAV estable en la que al menos algunos o todos los genes que codifican los componentes necesarios para la producción del AAV están integrados de forma estable en el genoma celular, y cultivar dichas células en un cultivo de perfusión durante la etapa de producción de AAV (es decir, durante la etapa N), en donde dicho cultivo de perfusión comprende la sustitución continua de medios gastados por medios nuevos, y en donde dicha sustitución continua de medios gastados por medios nuevos continúa después de la inducción de la producción de AAV.

Recientemente ha habido un rápido aumento en el número de ensayos de terapia génica y productos basados en vectores derivados de AAV. Las ventajas de los vectores AAV en la terapia génica son un buen perfil de seguridad, el hecho de que dichos vectores no son patógenos, es decir, no están asociados con ninguna enfermedad, la expresión de transgenes a largo plazo y la posibilidad de transducir células en división así como células que no se dividen. Sin embargo, un desafío importante para la traducción de esta prometedora investigación en el desarrollo clínico es el desafío de administrar cantidades sustanciales de vectores virales AAV de alta calidad.

La producción de AAV recombinante requiere, entre otras cosas, la expresión de las proteínas Rep y Cap del AAV, normalmente codificadas por el genoma del AAV, para la producción del virus recombinante suministrado en *trans*. Además, se utilizan genes auxiliares que pueden derivar de diferentes virus auxiliares, siendo los más comunes los genes de los virus auxiliares tomados del adenovirus (AV), tales como el E1A, E1B, E2A, E4orf6 o ARN VA. Además, se necesita un vector de transferencia que contenga el gen de interés (GOI, por sus siglas en inglés *gen of interest*) flanqueado por secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV.

Los sistemas de producción actuales de AAV se basan principalmente en las siguientes técnicas que, sin embargo, tienen varios inconvenientes.

El sistema más común para la producción de AAV recombinante se basa en la introducción de todos los genes necesarios para la producción de AAV en las células de producción mediante transfección transitoria. La transfección transitoria normalmente requiere un sistema de dos o tres plásmidos: vector de transferencia que contiene el gen de interés; pHelper con funciones auxiliares adenovirales; y pAAV-Rep2Capx (CapX = función de cápside de diferentes serotipos de AAV) que suministran las funciones de la cápside y la replicasa. Sin embargo, este enfoque tiene varios inconvenientes. En particular, debido a la etapa de transfección transitoria, este método implica altos costes de ADN plasmídico y carece de suficiente escalabilidad, robustez y reproducibilidad.

Además, la etapa de transfección transitoria impide ciertas etapas de optimización del procedimiento para aumentar el título del producto o la calidad del producto, que son comunes en la producción de otros productos biológicos recombinantes, como la optimización extensiva de medios y alimentos, y la variación de los parámetros del procedimiento, como el pH, temperatura o densidad celular, durante la producción. En particular, este último es un enfoque prometedor para aumentar el título del producto en conjunto. Una densidad celular más alta en general conduce a un título mayor, siempre que no disminuya la productividad celular específica ("efecto de densidad celular"). En particular, mientras se usa la transfección transitoria, la productividad celular específica puede disminuir a la vez que aumenta la densidad celular. Esto también se describe en particular para la producción de vectores virales.

La producción de AAV da como resultado, independientemente del procedimiento de producción particular, siempre una mezcla de partículas de AAV completas, esto significa con el gen de interés (GOI) empaquetado flanqueado por las ITR de AAV, y partículas vacías sin el GOI empaquetado. Los títulos de AAV logrados mediante la transfección transitoria de células de mamíferos en suspensión, tales como, p. ej., células HEK293, están en el intervalo de  $1 \times 10^{13}$  a  $1 \times 10^{15}$  vg/l (genomas virales por l) dependiendo del procedimiento. Mediante transfección transitoria, se informó que la proporción de partículas completas era de un máximo del  $\approx 30$  % de partículas completas, pero normalmente está en el intervalo de 10-18 %. Esto implica que el 82-90 % son partículas vacías indeseables. Las partículas vacías son terapéuticamente inactivas y pueden aumentar las respuestas inmunitarias en los pacientes. Por lo tanto, en la posproducción en el procedimiento de purificación, estas partículas vacías deben eliminarse de la manera más eficiente posible. Esto se puede lograr mediante centrifugación, un procedimiento que es eficaz pero no escalable, o mediante métodos de cromatografía. Este último se puede utilizar también para la producción a gran escala, pero el enriquecimiento de la partícula completa normalmente solo está en el intervalo de  $\approx 3$  a 6 veces.

Por lo tanto, p. ej., el enriquecimiento de una muestra con aproximadamente 10 % de partículas completas da como resultado una proporción final de solo  $\approx 30$  a 60 % de partículas completas.

Las denominadas líneas celulares productoras con un gen de interés ya integrado de forma estable se basan principalmente en células HEK o HeLa. Sin embargo, necesitan la infección adicional con virus auxiliares, p. ej., adenovirus. Esta adición del virus auxiliar durante la producción de AAV requiere primero la producción del virus auxiliar correspondiente y, a continuación, la purificación exhaustiva del vector AAV producido con el fin de eliminar el virus auxiliar del producto final y una costosa prueba de la ausencia de virus auxiliares. Lo mismo se aplica al sistema basado en el virus del herpes simple (HSV). El sistema basado en el baculovirus también carece de suficiente

escalabilidad y robustez, y añade el riesgo de contaminaciones por proteínas de las células hospedantes de insectos y estructuras de glicosilación inmunogénicas específicas de las células de insectos.

Por lo tanto, los sistemas de producción de AAV actuales son limitados no solo con respecto a la escalabilidad, robustez, reproducibilidad, facilidad de uso y rentabilidad, sino también con respecto a la calidad del producto.

- 5 Por consiguiente, el problema técnico subyacente de la presente invención es la provisión de un sistema escalable para la producción estable de vectores AAV que no requiera transfección transitoria o virus auxiliares, permitiendo la producción robusta, industrial y escalable de vectores AAV para terapia génica, así como una amplia optimización del desarrollo del procedimiento de preparación, en particular con el objetivo de aumentar el título del producto y/o el rendimiento celular específico y, lo que es más importante, la calidad del producto, en particular en términos de la proporción de partículas completas.

La solución al problema técnico anterior se consigue mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de virus adenoasociados (AAV), que comprende las etapas de:

- 15 (a) proporcionar una línea celular hospedante productora de AAV estable en la que al menos algunos o todos los genes que codifican los componentes necesarios para la producción de AAV están integrados de manera estable en el genoma de la célula hospedante;
- (b) cultivar dichas células en cultivo de perfusión durante la etapa de producción de AAV (es decir, durante la etapa N), en donde dicho cultivo de perfusión comprende la sustitución continua de medios gastados por medios nuevos, y en donde dicha sustitución continua de medios gastados por medios nuevos continúa después de la inducción de la producción de AAV.

25 El AAV en la presente invención no se limita a serotipos de AAV particulares. Por lo tanto, el AAV se puede seleccionar del grupo que consiste en AAV de serotipo 1 (AAV1), AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVDJ, AAVDJ8, AAVrh10, híbridos de dos o más de dichos serotipos diferentes, y dichos serotipos tipos que tienen mutaciones que alteran el tropismo del serotipo del AAV. Preferiblemente, el AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 y AAV9, en donde se prefiere particularmente el AAV8.

Según la presente invención, todos los genes que codifican los componentes necesarios para la producción de AAV están integrados de manera estable en el genoma de la célula hospedante.

30 En este contexto, según la presente invención, los genes que codifican los componentes necesarios para la producción de AAV son los genes que codifican las proteínas Cap VP1, VP2 y VP3 del AAV; genes que codifican las proteínas Rep Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 del AAV; genes que codifican las funciones auxiliares adenovirales E4orf6, E2A y ARN-VA; genes que codifican los genes auxiliares de Ad5 E1A y E1A 1B; y el gen de interés (GOI) flanqueado por las ITR de AAV.

35 Los GOI que se van a usar en el contexto de la presente invención no están particularmente limitados e incluyen cualquier gen cuya transferencia al receptor del vector AAV sea de interés, p. ej., para el tratamiento de enfermedades oculares, enfermedades de ceguera, enfermedades musculares, distrofia muscular de Duchenne, gangliosidosis GM2 y tipo de ataxia espinocerebelosa, ELA, enfermedad de Huntington, inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (X-SCID), deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID), enfermedades del sistema nervioso central, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedades hepáticas, deficiencia de la enzima hepática ornitina transcarbamilasa (OTC), amaurosis congénita de Leber, hemofilia,  $\beta$ -talasemia, enfermedades cancerosas, cáncer de cabeza y cuello, melanoma metastásico, enfermedades cardíacas, enfermedades pulmonares o fibrosis quística, síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), leucodistrofia metacromática (MLD) y trastorno de deficiencia de lipoproteína lipasa (LPLD) grave enfermedades infecciosas, síndrome de inmunodeficiencia combinada grave, infección por VIH, enfermedades raras incluida la enfermedad de Niemann Pick de tipo C y la deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC).

45 La línea celular hospedante productora de AAV estable usada en la presente invención puede derivarse de cualquier línea celular adecuada conocida en la técnica. Sin embargo, en realizaciones preferidas, dicha línea celular deriva de una línea celular, o es una línea celular, seleccionada del grupo que consiste en células CAP, células AGE1.hn, HEK293, PER.C6, NSO1, COS-7, BHK, CHO, CV1, VERO, HeLa, MDCK, BRL3A, W138 y HepG2, en donde se prefieren particularmente las células CAP y células HEK293. En una realización específica, la línea celular anterior deriva de células CAP o es una línea celular CAP. En otra realización específica, la línea celular anterior deriva de células HEK293 o es una línea celular HEK293. En este contexto, la expresión "la línea celular hospedante productora de AAV estable deriva de una línea celular X" indica que dicha línea celular hospedante productora de AAV estable se genera integrando de manera estable los genes respectivos indicados anteriormente en células de la línea celular X. Por lo tanto, la expresión anterior abarca expresamente la línea celular hospedante productora de AAV estable que es una línea celular X, como se indicó anteriormente. En este contexto, la expresión "la línea celular hospedante productora de AAV estable deriva de una línea celular X" puede leerse como "la línea celular hospedante productora de AAV estable se basa en una línea celular X", y las respectivas expresiones se pueden usar indistintamente en el

presente documento.

La escala de producción de AAV según la presente invención puede variar desde volúmenes pequeños en el intervalo de mililitros a volúmenes de intervalo medio hasta volúmenes a gran escala con, p. ej., un volumen de 2000 L o 25.000 L por ciclo de producción.

- 5 El cultivo de perfusión en la etapa (b) de los métodos de la presente invención se puede realizar en cualquier recipiente o sistema de cultivo adecuado conocido en la técnica. Los diferentes tipos de biorreactores que pueden usarse a este respecto incluyen biorreactores de tanque agitado (STR), biorreactores de agitación orbital (OSB), biorreactores de lecho oscilante (p. ej., WAVE, Rocking Motion), biorreactores de agitación por aire o biorreactores tubulares. Para cualquiera de estos tipos de biorreactores, se pueden usar recipientes de biorreactores de vidrio, acero inoxidable o de un solo uso.

También se pueden usar biorreactores multiparalelos válidos, incluyendo biorreactores de alto rendimiento acoplados a dispositivos de perfusión. También se pueden usar biorreactores de perfusión diseñados para células adherentes, p. ej., biorreactores de fibra hueca (HFBR), biorreactores de lecho fijo (p. ej., biorreactores de lecho empaquetado) y biorreactores de lecho fluidizado.

- 15 Los modos operativos para el cultivo de perfusión incluyen, pero no se limitan particularmente a, perfusión estándar (continua), perfusión concentrada (continua), perfusión/discontinuo alimentado híbrido, perfusión con expansión de volumen y procedimientos continuos en dos etapas, como se conoce en la técnica. Los dispositivos de perfusión incluyen filtros de fibra hueca que funcionan con estrategias tales como TFF (filtración de flujo tangencial) y ATF (flujo tangencial alterno), membranas flotantes, filtros centrífugos y filtros cilíndricos giratorios (también conocidos como filtros de flujo de vórtice o filtros centrífugos externos) y filtros de disco giratorio (también conocidos como filtros de cizallamiento controlado), en donde se prefiere particularmente el cultivo de perfusión de ATF. También se pueden usar otros tipos de dispositivos de filtración, tales como módulos de membrana tubular o basados en fibras huecas que funcionan con bombas peristálticas, bombas de diafragma o bombas centrífugas basadas en levitación magnética (p. ej., Levitronix). Otros dispositivos más de perfusión incluyen sedimentadores gravitacionales (sedimentadores laminares, sedimentadores de células compactas), sedimentadores acústicos (también conocidos como filtros acústicos), centrífugas e hidrociclones, tal como se conoce en la técnica.

- Según la presente invención, el cultivo de perfusión abarca la sustitución continua de medios gastados por medios nuevos (es decir, cambio continuo de medio), en donde dicha sustitución continua de medios gastados por medios nuevos continúa después de la inducción de la producción de AAV. En realizaciones preferidas, dicha sustitución continua de los medios gastados por medios nuevos continúa durante al menos 24 horas después de la inducción, al menos 48 horas después de la inducción, al menos 72 horas después de la inducción y/o hasta la recolección del AAV. Como se conoce en la técnica, las expresiones "sustitución continua de medios gastados por medios nuevos" o "cambio continuo de medio" no requieren necesariamente la sustitución sin parar de medios gastados por medios nuevos (es decir, un cambio de medio sin parar), sino que también permiten pausar dicha sustitución durante intervalos varias veces al día, como se conoce en la técnica. A modo de ejemplo, las posibles pausas de la sustitución o cambio de medio son pausas de, p. ej., hasta 1 hora o hasta 2 horas, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 veces al día, o pausas de, p. ej., hasta 6 horas o hasta 12 horas, una o dos veces al día.

- En realizaciones preferidas, la velocidad de perfusión celular específica (CSPR) durante el cultivo de perfusión es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,20 nl/célula/día. Además, la velocidad de perfusión es preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 vvd (volumen de medio nuevo/volumen de trabajo del reactor/día).

- Según la presente invención, los métodos pueden iniciarse con una densidad celular al sembrar con densidades de células viables (VCD) más bajas en el intervalo de aproximadamente  $0,1 \times 10^6$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml, o con una VCD más alta en el intervalo de aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $20 \times 10^6$  células/ml. En realizaciones preferidas, la densidad celular en la siembra del cultivo de perfusión es de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml.

- Además, la densidad celular en el punto temporal de inducción de la producción de AAV puede ser con una VCD más baja en el intervalo de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, con una VCD alta en el intervalo de aproximadamente  $10 \times 10^6$  a aproximadamente  $100 \times 10^6$  células/ml, o con una VCD muy alta en el intervalo de aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $200 \times 10^6$  células/ml. En realizaciones preferidas, la densidad celular en el punto temporal de la inducción de la producción de AAV es de aproximadamente  $20 \times 10^6$  células/ml o mayor.

En realizaciones específicas, los métodos de la presente invención pueden comprender una etapa de recolección de AAV del producto retenido del cultivo de perfusión.

- En los métodos de la presente invención, el tiempo del procedimiento desde después de la siembra hasta la inducción de la producción de AAV puede estar en el intervalo de 0 a 21 días. Además, el tiempo del procedimiento postinducción puede estar en el intervalo de 2 a 10 días postinducción.

Con el fin de lograr el título máximo de AAV, los parámetros del procedimiento, tales como la densidad celular en la siembra, temperatura, velocidad de agitación, pH, OD (oxígeno disuelto), osmolaridad y/o volumen de trabajo del biorreactor, pueden cambiarse durante el procedimiento de producción, como se conoce en la técnica. Además, con el fin de evitar la carencia de ciertos aminoácidos, sacáridos, ácidos orgánicos, cofactores, vitaminas, minerales y/u otros elementos, la suplementación del cultivo celular con los componentes que faltan puede ser parte del procedimiento de producción, como se conoce en la técnica.

La presente invención da como resultado un virus adenoasociado (AAV), que se puede obtener mediante el método según la presente invención como se definió anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende"/"comprende" incluye expresamente los términos "que consiste esencialmente en"/"consiste esencialmente en" y "que consiste en"/"consiste en", es decir, todos dichos términos son intercambiables entre sí.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, es una modificación del valor especificado de  $\pm 10\%$ , preferiblemente  $\pm 7\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$ ,  $\pm 1\%$  o  $\pm 0,5\%$ . A modo de ejemplo, el término "aproximadamente 10", como se usa en el presente documento, puede referirse a un intervalo de 9 a 11.

En la presente invención, las líneas celulares productoras de AAV completamente estables representan un método eficaz para la fabricación a gran escala de vectores AAV. Estas células productoras de AAV completamente estables consisten en células con una integración estable de los genes de cápside (VP1, VP2, VP3), genes reguladores (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), funciones auxiliares adenovirales (E1A, E1B, E4orf6, E2A y ARN-VA) y el transgén flanqueado por ITR (gen de interés; GOI). En este sistema, la expresión de las cuatro proteínas rep y las funciones auxiliares E2A y E4orf6 están bajo el control de un sistema inducible. Mediante la adición del inductor, se expresan las proteínas mencionadas anteriormente y se producen vectores AAV recombinantes (rAAV).

Este sistema estable presenta varias ventajas, ya que no es necesaria una etapa de transfección transitoria o una etapa de infección auxiliar. Por lo tanto, los costes de productos se reducen debido a los costes de los plásmidos omitidos o al coste adicional de la producción de virus auxiliares. El sistema es escalable, altamente reproducible con solo variaciones menores o nulas de un lote a otro.

Lo que es más importante, la línea celular estable de producción de AAV usada en la presente invención, sin necesidad de transfección transitoria o infección viral, también permite el desarrollo y optimización extensos del procedimiento de cultivo celular anterior, p. ej., con el fin de aumentar los rendimientos de los títulos virales (productividad volumétrica y/o rendimiento celular específico de virus) y/o para aumentar la calidad del producto, en particular en términos de la proporción de partículas completas.

En general, los procedimientos de cultivo celular en la fase de producción inicial se pueden operar en modos discontinuo, discontinuo alimentado, continuo o continuo con recirculación celular (perfusión) o modos híbridos (p. ej., híbridos de perfusión y discontinuo alimentado). El modo operativo determina el perfil de crecimiento y la cinética de producción.

En el modo de perfusión, la alimentación del medio nuevo (entrada) y la retirada del medio gastado (salida) se realizan normalmente con el mismo caudal en la entrada y en la salida, de modo que el volumen del biorreactor se mantenga constante. Las células son retenidas en el sistema de producción (biorreactor) usando un dispositivo de retención (o perfusión) celular. Por consiguiente, se pueden obtener altas densidades celulares. Típicamente, la perfusión permite una mayor productividad volumétrica, con menos espacio ocupado, en comparación con otros modos operativos.

Se pueden usar diferentes dispositivos de perfusión, que usan diferentes mecanismos para la separación celular: sedimentación (bajo campo gravitatorio o centrífugo), agregación bajo campo ultrasónico (seguida de sedimentación) y filtración. Por lo tanto, la eficiencia de la separación depende de la selección del dispositivo. Los ejemplos son: centrífugas, sedimentadores gravitacionales (sedimentadores laminares, sedimentadores de células compactas), sedimentadores acústicos (también conocidos como filtro acústico), centrífugas, hidrociclones y filtros. La filtración se llevó a cabo bajo diferentes estrategias: TFF (filtración de flujo tangencial) y ATF (flujo tangencial alterno), membranas flotantes, filtros centrífugos y filtros cilíndricos giratorios (también conocidos como filtros de flujo de vórtice o filtros centrífugos externos) y filtros de disco giratorio (también conocidos como filtros de cizallamiento controlado). Entre los diferentes tipos de filtros, el TFF y el ATF se utilizan habitualmente para la perfusión. En ambos casos, se usa un módulo de fibra hueca que contiene membranas de filtro. En el caso del ATF, el flujo bidireccional se obtiene por medio de una bomba de diafragma. Hoy en día, el ATF es el dispositivo de retención celular más utilizado para la producción de proteínas recombinantes (productos biofarmacéuticos). Aunque la perfusión está bien establecida para los procedimientos de fabricación de productos biofarmacéuticos, todavía no está disponible para la fabricación escalable de vectores virales.

En resumen, el procedimiento de perfusión para la producción de rAAV según la presente invención permitía títulos más altos (vg/l), así como mayor rendimiento celular específico de virus (vg/célula), en comparación con el procedimiento discontinuo convencional con células productoras de AAV estables. Inesperadamente, cuando se aplica la perfusión en el sistema estable de producción de AAV, la relación entre partículas virales completas y vacías aumentó drásticamente en comparación con el procedimiento discontinuo tradicional. Además, la recolección de los

vectores virales AAV podía realizarse a partir del producto retenido (suspensión de células enteras, recolectada de la masa del biorreactor) en lugar del permeado, lo que reduce drásticamente el volumen para el posterior procedimiento de purificación del AAV, lo que hace que el procedimiento general sea más eficiente.

La utilización de la plataforma productora de AAV completamente estable descrita en la presente invención da como resultado un porcentaje similar de partículas completas en comparación con el enfoque completamente transitorio. Sin embargo, esto solo es cierto para la fabricación de la partícula de AAV en un enfoque discontinuo o discontinuo alimentado. Inesperadamente, la fabricación de vectores virales de AAV con un sistema de células productoras completamente estable que utiliza la perfusión da como resultado ventajosamente un porcentaje drásticamente mayor de partículas completas de hasta aproximadamente 10 veces en comparación con un procedimiento discontinuo de referencia. Por lo tanto, en la etapa posterior de enriquecimiento de partículas completas utilizando, p. ej., cromatografía AEX, se puede lograr una proporción final de 75 % o más de partículas completas.

Las figuras muestran:

Figura 1:

Crecimiento de un productor de AAV CAP estable en matraces de agitación (SF) en modo de pseudoperfusión.

A) Crecimiento celular y viabilidad de los cultivos en matraces de agitación (SF) 1 y 2 (duplicados biológicos) hasta alta densidad celular. B) Velocidad de perfusión celular específica (CSPR) calculada con la VCD promedio de los duplicados biológicos.

Figura 2:

Esquema simplificado del procedimiento de perfusión basado en ATF para la producción de rAAV.

Se realiza la adición continua de medio nuevo (alimentación) y la retirada del medio gastado (permeado). El ATF (flujo tangencial alterno) se muestra como dispositivo de perfusión.

Figura 3:

Procedimiento de perfusión basado en ATF para la producción de rAAV con células CAP estables productoras de AAV.

Densidad de células viables (VCD, línea continua) y viabilidad (línea discontinua) de una línea celular CAP productora de AAV en un biorreactor de perfusión. Tres cultivos independientes: experimentos 1 (◆), 2 (O) y 3 (•). El modo de perfusión se inicia 3 días después de la inoculación (línea vertical gris). La producción de rAAV se inicia 7 días después de la inoculación (línea vertical discontinua). La fase de producción se lleva a cabo hasta 5 días postinducción.

Figura 4:

Procedimiento discontinuo convencional para la producción de rAAV con células CAP estables productoras de AAV.

Densidad de células viables (VCD, línea continua) y viabilidad (línea discontinua) de una línea celular CAP productora de AAV en un biorreactor en modo discontinuo. Dos cultivos independientes: experimentos 1 (■) y 2 (□). La producción de rAAV se inicia 3 días después de la inoculación (línea vertical discontinua).

Figura 5:

Producción de rAAV en modo de perfusión en comparación con el procedimiento discontinuo con células CAP estables productoras de AAV.

Se realizaron tres experimentos en modo de perfusión y dos experimentos en modo discontinuo, con una línea celular CAP productora de AAV. A) Títulos de genomas de AAV8 determinados por qPCR. B) Concentración de cápsides determinada por ELISA. Los datos se normalizan respecto al valor promedio de los dos procedimientos discontinuos el día 5 postinducción.

Figura 6:

Porcentaje mayor de cápsides completas en el modo de perfusión con células CAP estables productoras de AAV.

Comparación con un procedimiento de referencia discontinuo. El porcentaje se calculó como la relación entre el título genómico (Fig. 5A) y el título de cápsides (Fig. 5B). Los datos se normalizan respecto a los experimentos discontinuos. A) Evolución temporal de los procedimientos en modo de perfusión (n = 3) y en modo discontinuo (n = 2), donde n representa el número de repeticiones biológicas. B) Los datos de las cápsides completas se representan como promedio ± desviación típica de las repeticiones biológicas.

Figura 7:

Mayor rendimiento celular específico de virus (CSVY) en modo de perfusión con células CAP estables productoras de AAV.

5 Comparación con un procedimiento de referencia discontinuo. El rendimiento se calculó como la relación del título genómico en el momento de la recolección a la densidad de células viables en el momento de la inducción. Los datos se representan como promedio  $\pm$  desviación típica de las repeticiones biológicas (perfusión:  $n = 3$ , discontinuo:  $n = 2$ ). Los datos se normalizan respecto al lote el día 5 postinducción.

Figura 8:

10 Infectividad de las partículas de AAV derivadas de CAP durante la producción en perfusión y discontinua. Los datos se normalizan respecto al día 3 postinducción de cada experimento de producción.

Figura 9:

15 La interrupción del procedimiento de perfusión basado en ATF durante la fase de producción de AAV da como resultado una disminución de la densidad de células viables y de la viabilidad celular postinducción. Densidad de células viables (VCD, línea continua) y viabilidad (línea discontinua). El modo de perfusión se inicia 3 días después de la inoculación (línea vertical gris). La producción de rAAV se inicia 8 días después de la inoculación (línea vertical discontinua). La fase de producción se realiza en modo discontinuo hasta 4 días postinducción.

Figura 10:

20 La interrupción del procedimiento de perfusión basado en ATF durante la fase de producción de AAV da como resultado una disminución drástica del título de AAV.

Títulos de genomas de AAV8 determinados por qPCR. Título del modo discontinuo-alta densidad celular (HCD) medido en el momento de la recolección. Los datos se normalizan respecto al modo discontinuo-baja densidad celular (LCD) convencional el día 5 postinducción.

Figura 11:

25 Procedimiento de perfusión basado en ATF para la producción estable de rAAV con grupo de células HEK293 estables productoras de AAV.

Densidad de células viables (VCD, línea continua) y viabilidad (línea discontinua) de un grupo de HEK293 estables productoras de AAV en un biorreactor de perfusión (◆). La perfusión se inicia 3 días después de la inoculación (línea vertical gris). La producción de rAAV se inicia 6 días después de la inoculación (línea vertical discontinua). La fase de producción dura hasta 4 días postinducción.

30 Figura 12:

Producción estable de rAAV con grupo de células HEK293 estables productoras de AAV en modo discontinuo. Densidad de células viables (VCD, línea continua) y viabilidad (línea discontinua) de un grupo de HEK293 estables productoras de AAV en un matraz de agitación discontinuo (□). La producción en modo discontinuo se inicia 3 días después de la inoculación (línea vertical discontinua) y se lleva a cabo hasta 5 días postinducción.

35 Figura 13:

Producción de rAAV en modo de perfusión con grupo de células HEK293 estables productoras de AAV. Un experimento en modo de perfusión y un experimento en modo discontinuo. A) Títulos de genomas de AAV8 determinados por qPCR. B) Concentración de cápsides determinada por ELISA. Los datos se normalizan respecto al día 3 postinducción del control discontinuo.

40 Figura 14:

Mayor rendimiento celular específico de virus (CSVY) en el modo de perfusión con grupo de células HEK293 estables productoras de AAV.

El rendimiento se calculó como la relación del título genómico máximo a la densidad de células viables en el momento de inducción. El resultado se normaliza respecto al control discontinuo.

45 Figura 15:

Porcentaje mayor de cápsides completas en el modo de perfusión con grupo de células HEK293 estables productoras de AAV.

El porcentaje se calculó como la relación entre el título genómico normalizado (Fig. 13A) y el título de cápsides normalizado (Fig. 13B). Los datos se normalizan respecto al control discontinuo.

Figura 16:

- 5 La tinción con SyproRuby de partículas de AAV de diferentes fracciones de los experimentos de AEX pone de manifiesto una relación de VP1 a VP2 a VP3 de ~1:1:10.
- Las cápsides de diferentes fracciones de dos experimentos diferentes de AEX se visualizaron mediante tinción con SyproRuby.

Figura 17:

- 10 Relación de completo a vacío después de purificación por AEX.
- Tras la determinación de la partícula viral por ELISA y el título de genomas virales por qPCR, se calculó la relación de partículas completas frente a vacías de las diferentes fracciones de dos experimentos de AEX de una producción de AAV utilizando perfusión de ATF.

La presente invención se refiere a las siguientes secuencias de nucleótidos:

- SEQ ID NO: 1
- 15 Cebador directo de PoliA de SV40  
AGCAATAGCATCACAAATTCACAA
- SEQ ID NO: 2
- Cebador inverso de PoliA de SV40  
CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT
- 20 SEQ ID NO: 3
- Sonda de poliA de SV40  
AGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC
- SEQ ID NO: 4
- Cebador directo de GFP
- 25 TTCTTCAAGTCCGCCATGCC
- SEQ ID NO: 5
- Cebador inverso de GFP  
AAGTCGATGCCCTTCAGCTC
- SEQ ID NO: 6
- 30 Sonda de GFP  
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA

La presente invención se ilustrará más detalladamente mediante los siguientes ejemplos sin limitarse a ellos.

### Ejemplos

#### Procedimientos experimentales

- 35 Líneas celulares productoras:
- Se seleccionaron líneas celulares productoras de AAV estables que albergan todos los componentes necesarios para la producción de AAV para el desarrollo del procedimiento de perfusión. Se usaron dos líneas celulares: (1) basada en células CAP y (2) basada en células HEK293.
- 40 (1) Clones de células individuales CAP estables productoras de AAV que contienen las secuencias del inductor Tet3G, replicasa inducible, auxiliar inducible (E2A, E4orf6), ARN-VA, VP1, VP2 y VP3 de la cápside específica del serotipo (AAV8) y el gen de interés (GOI) GFP flanqueado por ITR. Además, los genes auxiliares de Ad5, E1A y E1B, ya están



integrados de manera estable en las células CAP, ya que fueron inmortalizados de esta manera.

(2) Grupo de HEK293 estables productoras de AAV que contienen las secuencias del inductor Tet3G, replicasa inducible, auxiliar inducible (E2A, E4orf6), ARN-VA, VP1, VP2 y VP3 de la cápside específica del serotipo (AAV8) y el gen de interés (GOI) GFP-luciferasa flanqueado por ITR. Además, los genes auxiliares de Ad5, E1A y E1B, ya están integrados de manera estable en las células HEK, ya que fueron inmortalizados de esta manera.

Cultivo celular:

(1) Para el cultivo normal, las células CAP se cultivaron en medio de expresión de proteínas (PEM) (Life Technologies/Gibco) suplementado con GlutaMAX (Gibco) 4 mM, en matraces de agitación sin deflectores a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y de 120 a 185 rpm en una incubadora con agitación. Las células se hicieron pasar de forma rutinaria con medio nuevo hasta una densidad de células viables de 0,5x10<sup>6</sup> a 1x10<sup>6</sup> células/ml cada 3 a 4 días.

(2) Para el cultivo normal, las células HEK293 se cultivaron en medio de expresión de proteínas (PEM) (Life Technologies/Gibco) suplementado con GlutaMAX (Gibco) 4 mM, en matraces de agitación sin deflectores a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y de 170 a 200 rpm en una incubadora con agitación. Las células se hicieron pasar de forma rutinaria con medio nuevo hasta una densidad de células viables de 0,3x10<sup>6</sup> a 0,5x10<sup>6</sup> células/ml cada 2 a 3 días.

Producción de AAV utilizando la plataforma de producción de AAV estable:

La producción de AAV se indujo con adición de doxyciclina al cultivo.

qPCR para determinar el título viral:

Se usó la siguiente combinación de cebador/sonda con marcaje doble (MWG, Eurofins; tabla 1) dirigida contra el poliA de SV40 o el GOI (GFP) para medir el título viral.

Tabla 1: Combinaciones de cebador/sonda usadas para medir el título viral

Cebador/Sonda	Secuencia
Cebador directo de PoliA de SV40	5'- AGC AAT AGC ATC ACA AAT TTC ACA A -3' (SEQ ID NO: 1)
Cebador inverso de PoliA de SV40	5'- CCA GAC ATG ATA AGA TAC ATT GAT GAG TT - 3' (SEQ ID NO: 2)
Sonda de poliA de SV40	Fam-5'- AGC ATT TTT TTC ACT GCA TTC TAG TTG TGG TTT GTC -3'- BHQ1 (SEQ ID NO: 3)
Cebador directo de GFP	5'- TTC TTC AAG TCC GCC ATG CC -3' (SEQ ID NO: 4)
Cebador inverso de GFP	5'- AAG TCG ATG CCC TTC AGC TC -3' (SEQ ID NO: 5)
Sonda de GFP	Hex-5'-CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC A- 3'-BHQ2 (SEQ ID NO: 6)
Fam: 6-carboxifluoresceína; BHQ1: Inactivador Black Hole; Hex: 5-hexaclaro-fluoresceína	

Como referencia, se usó un plásmido transgénico linealizado con un número de copias definido. La reacción de qPCR contenía los siguientes componentes: 2 × Mezcla maestra para qPCR Brilliant Multiplex (Agilent), H<sub>2</sub>O sin nucleasas (Thermo Fisher Scientific), mezcla de cebador/sonda y muestra/referencia. La qPCR se llevó a cabo en un Agilent Mx3005P de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ELISA para cápsides ensambladas:

El ELISA específico para cápsides ensambladas se realizó con kits de ELISA disponibles en el mercado (Progen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

SDS-PAGE y tinción con SyproRuby:

Con el fin de determinar la relación de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, las proteínas de la cápside se separaron en una SDS PAGE y se visualizaron mediante tinción con SyproRuby. En resumen, las muestras se mezclaron con 4 x tampón LDS y luego se incubaron a 70 °C en un bloque térmico seco durante 10 min. Los tubos se

centrifugaron y los pocillos se cargaron con una muestra de 10 µl. Los geles Bis-Tris al 4-12 % se analizaron en tampón MES SDS a 200 V durante 40 min. La tinción con SyproRuby se realizó incubando durante una noche en solución de tinción, seguida de una etapa de lavado de 30 min en metanol al 10 %, ácido acético al 7 % y un lavado final en ddH<sub>2</sub>O.

5 Separación de partículas de AAV completas y partículas de AAV vacías mediante cromatografía de intercambio aniónico:

Las partículas de AAV del lisado de la suspensión de células enteras se sometieron a cromatografía enriquecida. La separación de las completas frente a vacías se logró utilizando la columna de cromatografía de intercambio aniónico.

Ejemplo 1:

Experimento de pseudoperfusión de crecimiento celular)

10 Las densidades celulares más altas requieren velocidades de perfusión más altas, usando la mayoría de los medios de cultivo celular, con el fin de mantener la viabilidad celular y soportar el crecimiento celular. A medida que la densidad celular cambia durante el procedimiento de producción, la velocidad de perfusión celular específica (CSPR) es un determinante para la velocidad de perfusión durante todo el procedimiento basado en la densidad celular.

La CSPR indica el suministro de nutrientes por célula por día en un procedimiento continuo:

15 
$$CSPR = P/VCD,$$

donde P = velocidad de perfusión (1/día) y VCD = densidad de células viables ( $1 \times 10^6$  células/ml).

Para determinar la CSPR para el procedimiento de biorreactor de perfusión, se cultivó un productor de AAV estable CAP (clon de célula individual) en matraces de agitación en PEM con GlutaMax 4 mM en matraces de agitación sin deflectores. A partir del día 3 de cultivo, se realizó el cambio diario de medio. Tras la centrifugación, se desechó el medio gastado. El sedimento celular después se resuspendió en una cantidad igual de medio nuevo. Es decir, la velocidad de perfusión se mantuvo a 1 vvd hasta que se observó una caída en la viabilidad.

20 Se observó crecimiento celular exponencial y viabilidades altas (> 90%) hasta el día 7, lo que corresponde a una VCD de  $20 \times 10^6$  células/ml y una CSPR de aproximadamente 0,05 nl/célula/d (Fig. 1). Estos parámetros se seleccionaron como el objetivo para el aumento de escala a un biorreactor de perfusión. Para mantener densidades celulares más altas utilizando un medio PEM suplementado como medio de perfusión, se debe aplicar una velocidad de perfusión más alta.

25 Ejemplo 2:

Producción de AAV en modo de perfusión utilizando células individuales CAP estables productoras de AAV

30 Con el fin de evaluar las ventajas de usar una perfusión basada en ATF frente a un procedimiento discontinuo convencional, la producción de AAV con células CAP estables productoras de AAV se realizó en un procedimiento discontinuo o como un procedimiento de perfusión basado en ATF. Ambos se realizaron en un biorreactor de tanque agitado en condiciones controladas.

Procedimiento discontinuo convencional:

35 Las células se cultivaron en un biorreactor de tanque agitado, p. ej., el recipiente 10c de un solo uso (Eppendorf), sistema BioFlo320 (Eppendorf). Se inocula en el biorreactor una densidad celular baja comparable ( $0,5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  células/ml), en medio PEM suplementado con GlutaMax 4 mM. El procedimiento se operó en modo discontinuo. Después de que las células crecieran hasta la densidad de células viables objetivo para la producción de AAV (normalmente 3 días después de la siembra), la producción de AAV se inició con 1 µg/ml de doxiciclina.

Configuración de la perfusión:

40 La configuración de la perfusión basada en ATF consistía en un biorreactor de tanque agitado conectado a una unidad de ATF. Las células se cultivaron en un biorreactor de tanque agitado, p. ej., el recipiente 3c recipiente de un solo uso (Eppendorf), sistema BioFlo320 (Eppendorf).

Procedimiento de AAV basado en perfusión:

45 Se inoculó en un biorreactor una densidad celular baja comparable ( $0,5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  células/ml), en medio PEM suplementado con GlutaMax 4 mM. El procedimiento se operó en modo discontinuo durante 3 días. Posteriormente, se inició la perfusión, alimentando con medio PEM suplementado, seguido de una velocidad de perfusión celular específica (CSPR) de aproximadamente 0,05 nl/célula/d a aproximadamente 0,10 nl/célula/d. Después de que las células crecieran hasta aproximadamente  $20 \times 10^6$  células viables/ml (día 7), la inducción de la producción de AAV se hizo con 1 µg/ml de doxiciclina. Durante la fase de producción, la velocidad de perfusión se mantuvo aproximadamente constante en aproximadamente 1 vvd.

50

Se observó un crecimiento celular fuerte hasta  $20 \times 10^6$  células/ml en los tres experimentos de perfusión (Fig. 3). El crecimiento celular en el biorreactor de perfusión era comparable al experimento de semiperfusión en el matraz agitado (Fig. 1). Se observó un aumento de aproximadamente 5 veces de la VCD en el momento de la inducción en comparación con el procedimiento discontinuo (Fig. 4).

5 En el modo de perfusión, el título genómico (vg/ml) fue extraordinariamente alto (Figura 5). Teniendo en cuenta los títulos máximos, se obtuvo un aumento de 42 veces en el procedimiento de perfusión con CAP (promedio de tres cultivos independientes) en comparación con el procedimiento discontinuo de referencia (promedio de dos cultivos independientes). Esto se debió en parte a la mayor VCD, pero lo que es más importante, a un aumento significativo en la producción celular específica de virus (vg/célula), que fue en promedio 9 veces mayor en la perfusión (Fig. 7).

10 Inesperadamente, la proporción de partículas completas también aumentó significativamente en el procedimiento de perfusión (Fig. 6), en comparación con el procedimiento discontinuo. El porcentaje máximo de partículas completas en perfusión (aproximadamente 4 d.p.i.) fue aproximadamente 10 veces mayor en comparación con el valor obtenido en el procedimiento discontinuo de referencia en el mismo punto temporal. En promedio, el porcentaje máximo de partículas de AAV completas fue 9,3 veces mayor en los experimentos de perfusión, cuando se compararon los datos de los tres experimentos de perfusión y los dos experimentos discontinuos. Las posibles explicaciones podrían ser que el entorno de perfusión contribuyó a una mejor amplificación del ADN del vector AAV o a un mayor empaquetamiento de los genomas virales en la partícula de AAV.

Las partículas de AAV infecciosas se determinaron mediante ensayo de transducción. Se calculó la relación de las unidades de transducción (TU) a los genomas virales (VG) (TU:VG). Para el experimento discontinuo 2, se determinó la TU:VG del día 3 al día 6 postinducción (d.p.i.). El valor máximo se obtuvo el 3 d.p.i. Para los experimentos de perfusión 1 y 2, el valor máximo también se obtuvo el 3 d.p.i. Por lo tanto, la relación de TU:VG de cada muestra se normalizó respecto a 3 d.p.i. para cada ensayo.

El resultado (Fig. 8) sugiere que se mantuvo una mayor infectividad a lo largo del tiempo en el modo de perfusión en comparación con el discontinuo. Entre 3 a 5 días postinducción, aproximadamente 30% de las partículas de AAV infecciosas perdieron infectividad en el modo discontinuo, mientras que en el de perfusión (1 vvd), la pérdida fue inferior a 18% durante el mismo período.

Ejemplo 3:

Uso de la perfusión de ATF para la generación de un cultivo de células CAP productoras de alta densidad celular

30 Con el fin de determinar si el aumento significativo en la productividad celular específica, el aumento del título volumétrico, así como el aumento en el porcentaje de partículas completas se debían principalmente al modo de perfusión antes de la inducción de la producción de AAV, se llevó a cabo el siguiente experimento. Las células se cultivaron en modo de perfusión en el biorreactor N como se describe en el ejemplo 2 hasta que se alcanzó la densidad de células viables objetivo de  $20 \times 10^6$  células/ml. Sin embargo, inmediatamente después de inducción de la producción de AAV por inducción con doxiciclina, se detuvo la perfusión y la fase de producción se operó en modo discontinuo, lo que significa que no se realizó ningún otro cambio de medios en la fase de producción.

Configuración de la perfusión:

La configuración de la perfusión basada en ATF consistía en un biorreactor de tanque agitado conectado a una unidad de ATF. Las células se cultivaron en un biorreactor de tanque agitado, p. ej., el recipiente 3c recipiente de un solo uso (Eppendorf), sistema BioFlo320 (Eppendorf).

40 Procedimiento de AAV de perfusión/discontinuo:

Se inoculó en un biorreactor una densidad celular baja comparable ( $0,5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  células/ml), en medio PEM suplementado con GlutaMax 4 mM. El procedimiento se operó en modo discontinuo durante 3 días. Posteriormente, se inició la perfusión, alimentando con medio PEM suplementado, seguido de una velocidad de perfusión celular específica (CSPR) de aproximadamente 0,05 nl/célula/d a aproximadamente 0,10 nl/célula/d. Después de que las células crecieran hasta aproximadamente  $20 \times 10^6$  células viables/ml, la inducción de la producción de AAV se hizo con 1 µg/ml de doxiciclina. Tras la inducción, se detuvo la perfusión.

El cultivo de perfusión siguió el mismo perfil de crecimiento que en los experimentos anteriores (Fig. 3) y se alcanzaron  $2,0 \times 10^6$  células/ml en el punto temporal de inducción (Fig. 9). Tras el cambio del modo operativo a discontinuo, la concentración celular se mantuvo durante 24 horas postinducción. Posteriormente, hubo una caída drástica en la concentración y viabilidad de las células. Es interesante que la productividad volumétrica así como la celular específica era extremadamente baja, con un título de genomas 4 días postinducción aproximadamente 40 veces menor en comparación con el procedimiento discontinuo de referencia (Fig. 10). Los resultados indican que no solo el modo de perfusión antes de la inducción y, por lo tanto, el aumento de la densidad de células viables en el punto temporal de la inducción es responsable del asombroso aumento de la productividad volumétrica, productividad celular específica y aumento del porcentaje de partículas de AAV completas anteriormente mencionados (Ejemplo 2).

Los resultados del presente ejemplo (Ejemplo 3) muestran claramente que solo cuando el modo de perfusión continúa más allá de la postinducción y, por lo tanto, durante toda la fase de producción, asegurando la sostenibilidad de las células, se obtiene una producción de AAV eficiente con alto rendimiento celular específico de virus y mayor porcentaje de partículas de AAV completas.

#### 5 Ejemplo 4:

Modo de perfusión usando células HEK293 estables productoras de AAV para la producción de AAV

Este experimento se realizó con el fin de demostrar que los efectos beneficiosos del procedimiento de perfusión con respecto al rendimiento celular específico de virus, productividad volumétrica y aumento del porcentaje de partículas de AAV completas no se limitan a las células CAP estables productoras de AAV (Ejemplo 2), sino que pueden transferirse a otros sistemas de producción de AAV. Por lo tanto, se desarrolló un procedimiento de perfusión similar para un grupo de HEK293 estables productoras de AAV. Como control interno, el AAV también se produjo utilizando grupo de células HEK293 productoras de AAV cultivadas en matraz de agitación y operadas en modo discontinuo.

Procedimiento discontinuo:

Las células se cultivaron en un matraz de agitación sin deflectores de 125 ml con un volumen de cultivo de 30 ml. Se inoculó en el cultivo una densidad celular baja comparable ( $0,5 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^6$  células/ml), en medio PEM suplementado con GlutaMax 4 mM. El procedimiento se operó en modo discontinuo. Tras un período de crecimiento celular de 3 días, se inició la producción de AAV con 1 µg/ml de doxiciclina.

Configuración de la perfusión:

La configuración de la perfusión basada en ATF consistía en un biorreactor de tanque agitado conectado a una unidad de ATF. Las células se cultivaron en un biorreactor de tanque agitado, p. ej., el recipiente 3c recipiente de un solo uso (Eppendorf), sistema BioFlo320 (Eppendorf).

Procedimiento de AAV basado en perfusión:

Se inoculó en un biorreactor una densidad celular baja comparable ( $0,5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  células/ml), en medio PEM suplementado con GlutaMax 4 mM. El procedimiento se operó en modo discontinuo durante 3 días. Posteriormente, se inició la perfusión, alimentando con medio PEM suplementado, seguido de una velocidad de perfusión celular específica (CSPR) de aproximadamente 0,05 nl/célula/d a aproximadamente 0,10 nl/célula/d. Después de que las células crecieran hasta aproximadamente  $20 \times 10^6$  células viables/ml (día 7), la inducción de la producción de AAV se hizo con 1 µg/ml de doxiciclina. Durante la fase de producción, la velocidad de perfusión se mantuvo aproximadamente constante en aproximadamente 1,25 vvd.

Se observó crecimiento celular hasta  $20 \times 10^6$  células/ml en perfusión con viabilidad alta antes de la inducción (Fig. 11), que corresponde a aproximadamente 6 veces la densidad de células viables en el momento de la inducción en discontinuo (Fig. 12).

Como ya se ha visto para las células individuales CAP estables productoras de AAV en el ejemplo 2, se podía lograr un enorme aumento en la productividad volumétrica de aproximadamente 30 veces (Fig. 13) cultivando un grupo de células HEK293 estables productoras de AAV en modo de perfusión durante toda la fase de producción (es decir, antes y después de la inducción de la producción de AAV). Una vez más, el aumento de la productividad volumétrica no se debió simplemente al aumento del número de células viables en el punto temporal de la inducción, ya que este aumento era solo de aproximadamente 6 veces. Por lo tanto, el aumento global del título se logró mediante un rendimiento celular específico de virus 5 veces mayor en el modo de perfusión en comparación con el modo discontinuo (Fig. 14).

Como se observa para las células individuales CAP estables productoras de AAV (Ejemplo 2), el procedimiento de perfusión con el grupo de células HEK293 estables productoras de AAV da como resultado un aumento de aproximadamente 4 veces en la proporción de partículas de AAV completas (Fig. 15) en comparación con el procedimiento discontinuo. El menor aumento para el procedimiento de perfusión de HEK293 estables en comparación con el procedimiento de perfusión de CAP se debe muy probablemente al hecho de que se utilizó un grupo policlonal para el procedimiento de HEK293, mientras que para el procedimiento de perfusión de CAP se utilizó un clon de célula individual monoclonal.

#### Ejemplo 5:

Enriquecimiento de partículas de AAV completas a partir del material de perfusión por AEX

Inesperadamente, se descubrió que al aplicar la perfusión de ATF para la producción de partículas de AAV con una línea celular CAP productora de AAV completamente estable, se podía lograr un aumento significativo de aproximadamente 9 veces en la relación de partículas completas en comparación con el procedimiento discontinuo convencional.

Con el fin de probar si al comenzar con un porcentaje ya más alto de partículas completas, también se puede lograr un enriquecimiento adicional de partículas completas utilizando la cromatografía AEX, se realizó el siguiente experimento.

5 La suspensión celular del producto retenido de una operación de perfusión con células CAP estables productoras de AAV (Ejemplo 2) se lisó y las partículas de AAV se enriquecieron por cromatografía. Las fracciones mezcladas que contenían las partículas de AAV se sometieron luego a cromatografía de intercambio aniónico. En el gradiente de elución, las partículas de AAV completas se enriquecieron en las fracciones 2 para el experimento de perfusión AEX 1 y en las fracciones 5-7 para el experimento de perfusión AEX 2 (Fig. 16).

10 Como se muestra en la figura 16, la separación del material del procedimiento de perfusión dio como resultado un porcentaje de partículas completas de hasta 78 %.

15 Con el fin de determinar la relación de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, las diferentes fracciones de dos experimentos distintos de AEX se separaron en una SDS PAGE y se visualizaron mediante tinción con SyproRuby. Como se muestra en la figura 17, en todas las fracciones de ambos experimentos, las tres proteínas de la cápside mostraron la relación esperada de ~1:1:10, lo que demuestra que el procedimiento de perfusión no altera la composición de la cápside del AAV.

En resumen, esto demuestra que el procedimiento desarrollado con perfusión de ATF es un método excelente para asegurar un alto porcentaje de partículas de AAV completas en el producto final.

#### Discusión:

20 La presente invención muestra explícitamente que el rendimiento celular específico de virus aumenta significativamente en el procedimiento de perfusión según la presente invención en comparación con un procedimiento discontinuo (Fig. 7). Esto demuestra que el aumento del título observado en la presente invención no solo se debe a una mayor densidad de células viables en el punto temporal de la inducción, sino que se debe a un aumento del título por célula.

25 Además, el ejemplo 3 y las Figs. 9 y 10 muestran un procedimiento de perfusión en el que se aumentó la densidad de células viables antes de la inducción de la producción de AAV mediante doxiciclina por el procedimiento de perfusión, pero directamente después de la inducción se detuvo el procedimiento de perfusión. Por lo tanto, la producción de AAV se realizó en un procedimiento discontinuo con altas densidades celulares, demostrando que el aumento de la productividad no se debía solo a una alta densidad celular en el punto temporal de la inducción, sino que se debía también al procedimiento de perfusión posterior.

30 Además, el ejemplo 4 y las Figs. 11 a 15 muestran un procedimiento de perfusión según la presente invención con células HEK293 estables productoras de AAV, que demuestra que el aumento de la productividad de AAV (volumétrico y celular específico) y la mejora de la calidad del AAV debido a una mayor relación de completas frente a vacías no se limitan a las células CAP, sino que también son reproducibles con otra línea celular, es decir, HEK293.

35 Por lo tanto, la presente invención proporciona ventajosamente no solo un aumento en la productividad celular específica en los métodos de la presente invención, sino también un aumento en las partículas de AAV completas frente a vacías, lo cual es inesperado y sorprendente. Estas propiedades ventajosas no se deben a un mero aumento en el número total de células, como se muestra en las Figs. 9 y 10, sino que son resultado de la perfusión continuada postinducción.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción de virus adenoasociados (AAV), que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar una línea celular hospedante estable productora de AAV en la que todos los genes que codifican los componentes necesarios para la producción de AAV están integrados de manera estable en el genoma de la célula hospedante 5;
  - (b) cultivar dichas células en cultivo de perfusión durante la etapa de producción de AAV, en donde dicho cultivo de perfusión comprende la sustitución continua de medios gastados por medios nuevos, y en donde dicha sustitución continua de medios gastados por medios nuevos continúa después de la inducción de la producción de AAV,
- 10 en donde los siguientes genes están integrados de manera estable en el genoma de la célula hospedante:
  - los genes que codifican las proteínas Cap de AAV VP1, VP2 y VP3;
  - los genes que codifican las proteínas Rep de AAV Rep78 y Rep68,
  - los genes que codifican las proteínas Rep de AAV Rep52 y Rep40;
  - los genes que codifican las funciones auxiliares adenovirales E4orf6, E2A y ARN-VA,
  - 15 los genes que codifican los genes auxiliares de Ad5 E1A y E1B, y
  - el gen de interés (GOI) flanqueado por las ITR de AAV,
  - y en donde la expresión de las cuatro proteínas Rep y la expresión de las funciones auxiliares adenovirales E2A y E4orf6 están bajo el control de un sistema inducible.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en donde el AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV de serotipo 1 (AAV1), AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVDJ, AAVDJ8, AAVrh10, híbridos de dos o más de dichos serotipos diferentes, y dichos serotipos tipos que tienen mutaciones que alteran el tropismo del serotipo del AAV.
- 25 3. El método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde la línea celular hospedante productora de AAV estable es una línea celular seleccionada del grupo que consiste en células CAP, células AGE1.hn, HEK293, PER.C6, NSO1, COS-7, BHK, CHO, CV1, VERO, HeLa, MDCK, BRL3A, W138 y HepG2.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cultivo de perfusión se realiza en un biorreactor de tanque agitado (STR), biorreactor de agitación orbital (OSB), biorreactor de lecho oscilante, biorreactor de agitación por aire, biorreactor tubular, biorreactor de fibra hueca (HFBR), biorreactor de lecho fijo o biorreactor de lecho fluidizado.
- 30 5. Los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el dispositivo de perfusión usado para el cultivo de perfusión es un filtro de fibra hueca usado en modo TFF (filtración de flujo tangencial) o modo ATF (flujo tangencial alterno); una membrana flotante, un filtro centrífugo, un filtro cilíndrico giratorio, un filtro de disco giratorio, una centrífuga, un sedimentador gravitacional, un sedimentador laminar, un sedimentador celular compacto, un sedimentador acústico o un hidrociclón.
- 35 6. El método según la reivindicación 5, en donde el dispositivo de perfusión usado para el cultivo de perfusión es un filtro de fibra hueca usado en modo ATF.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha sustitución continua del medio gastado por medio nuevo continúa durante al menos 24 horas, al menos 48 horas o al menos 72 horas después de la inducción de la producción de AAV, y/o hasta la recolección del AAV.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la velocidad de perfusión celular específica (CSPR) es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,20 nl/célula/día.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la velocidad de perfusión es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 vvd (volumen de medio nuevo/volumen de trabajo del reactor/día).
- 45 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la densidad celular en la siembra del cultivo de perfusión es de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la densidad celular en el punto temporal de la inducción de la producción de AAV es de aproximadamente  $20 \times 10^6$  células/ml o mayor.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho método comprende además la etapa de recolectar el AAV del producto retenido del cultivo de perfusión.

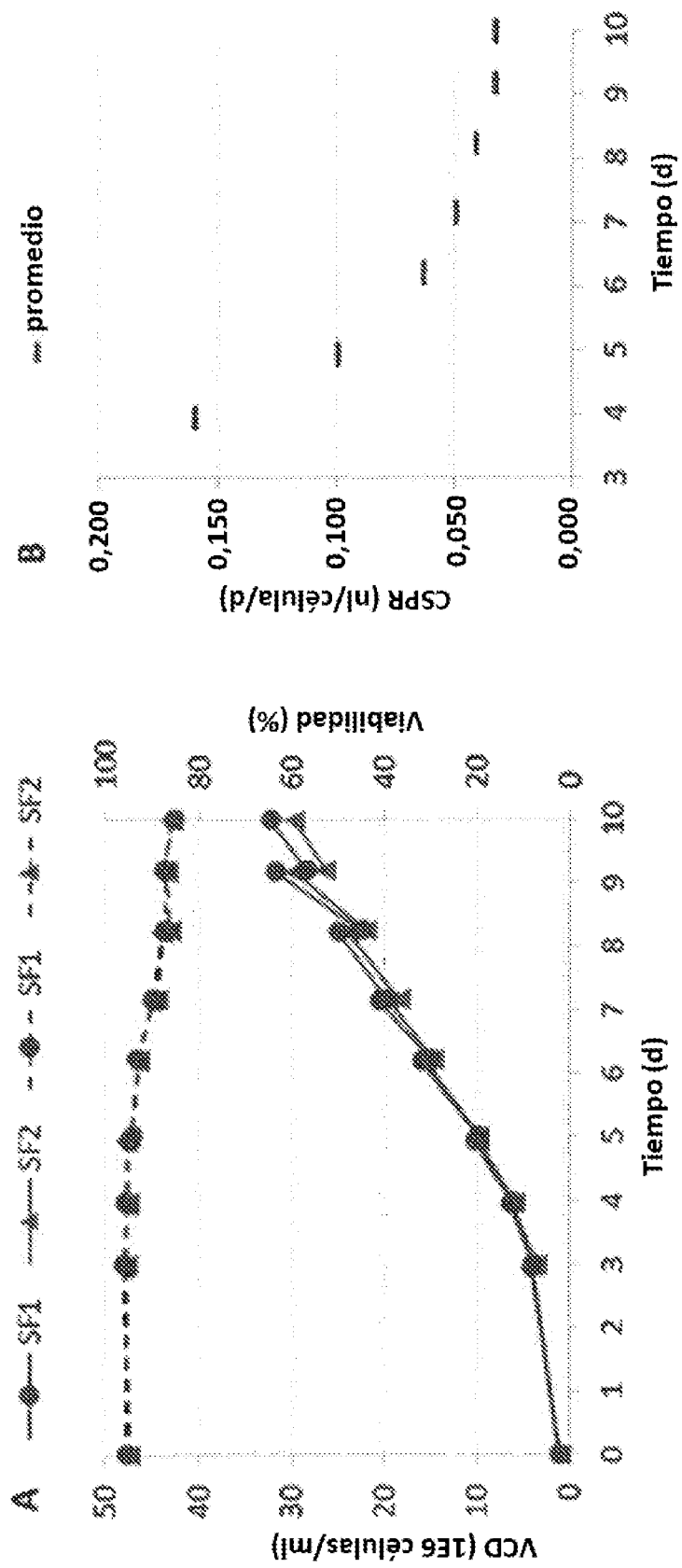


Figura 1



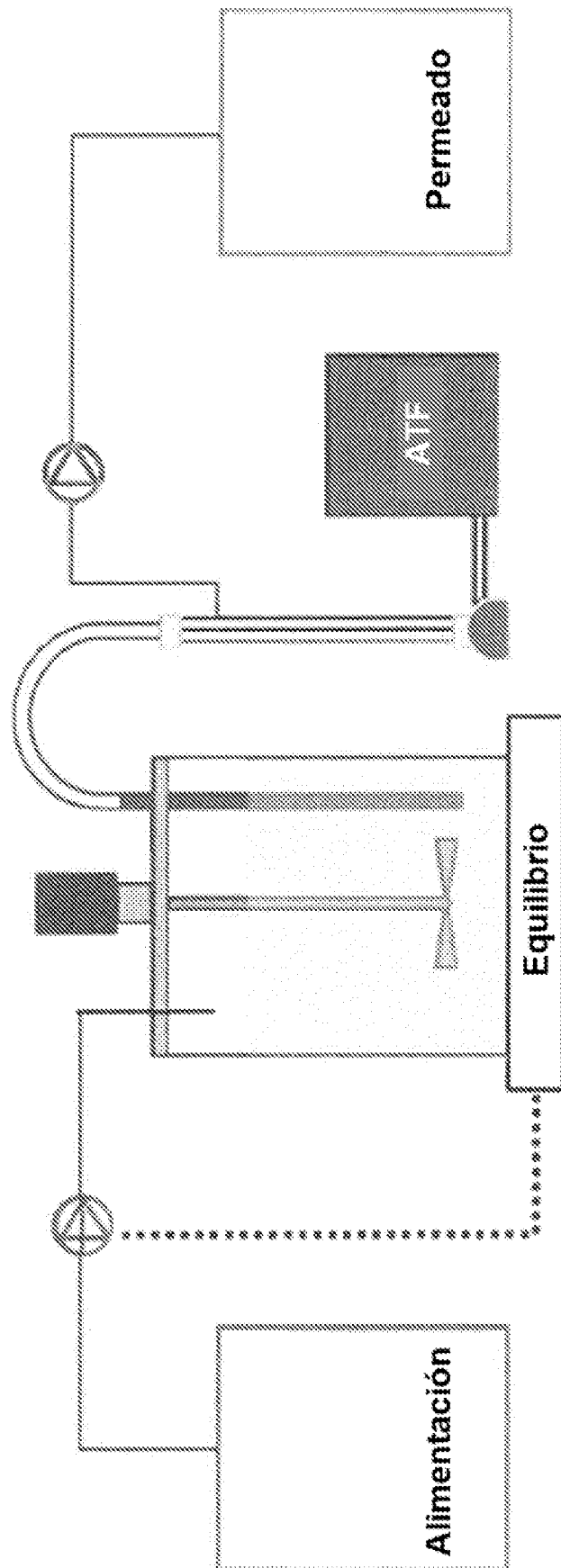


Figura 2

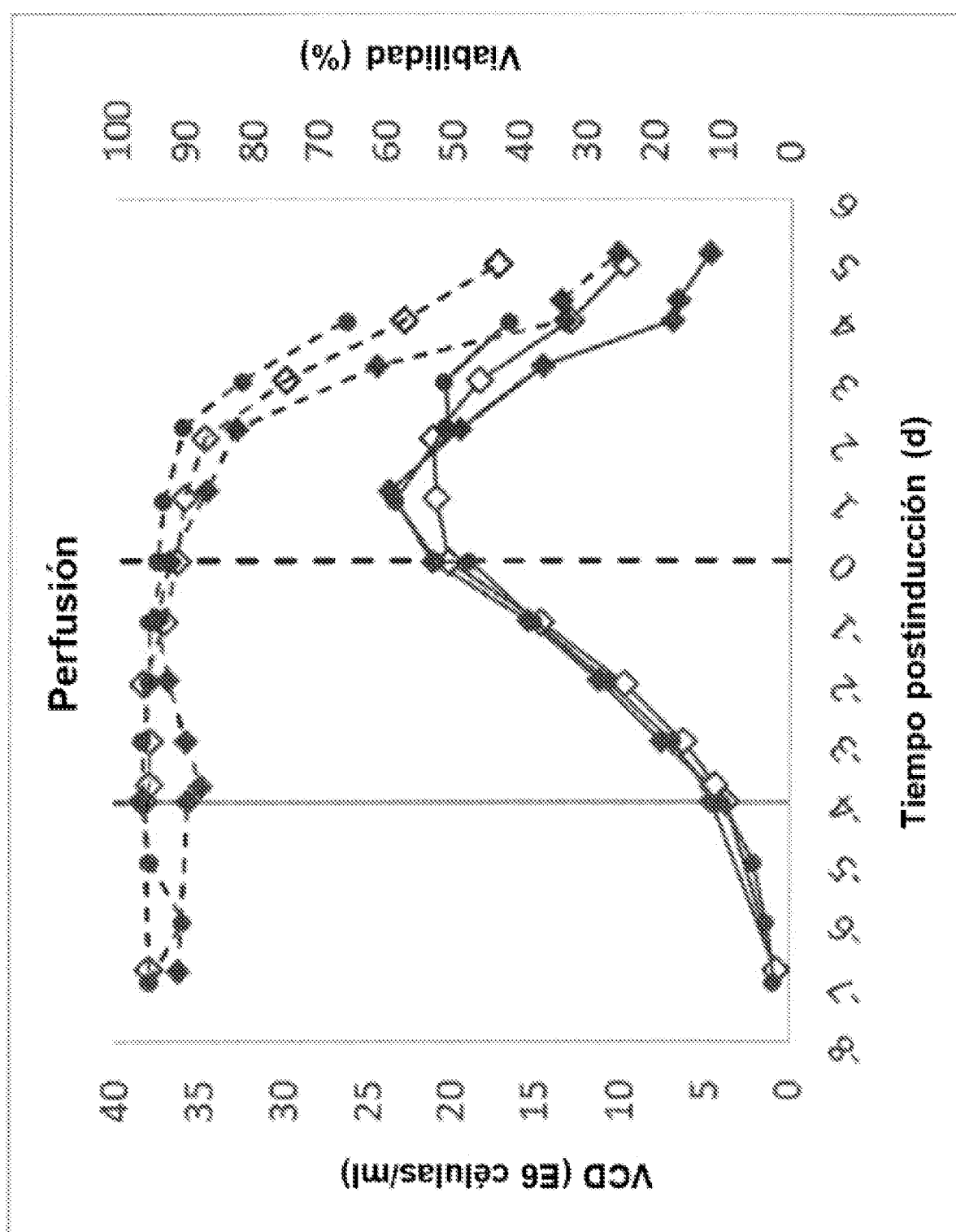


Figura 3

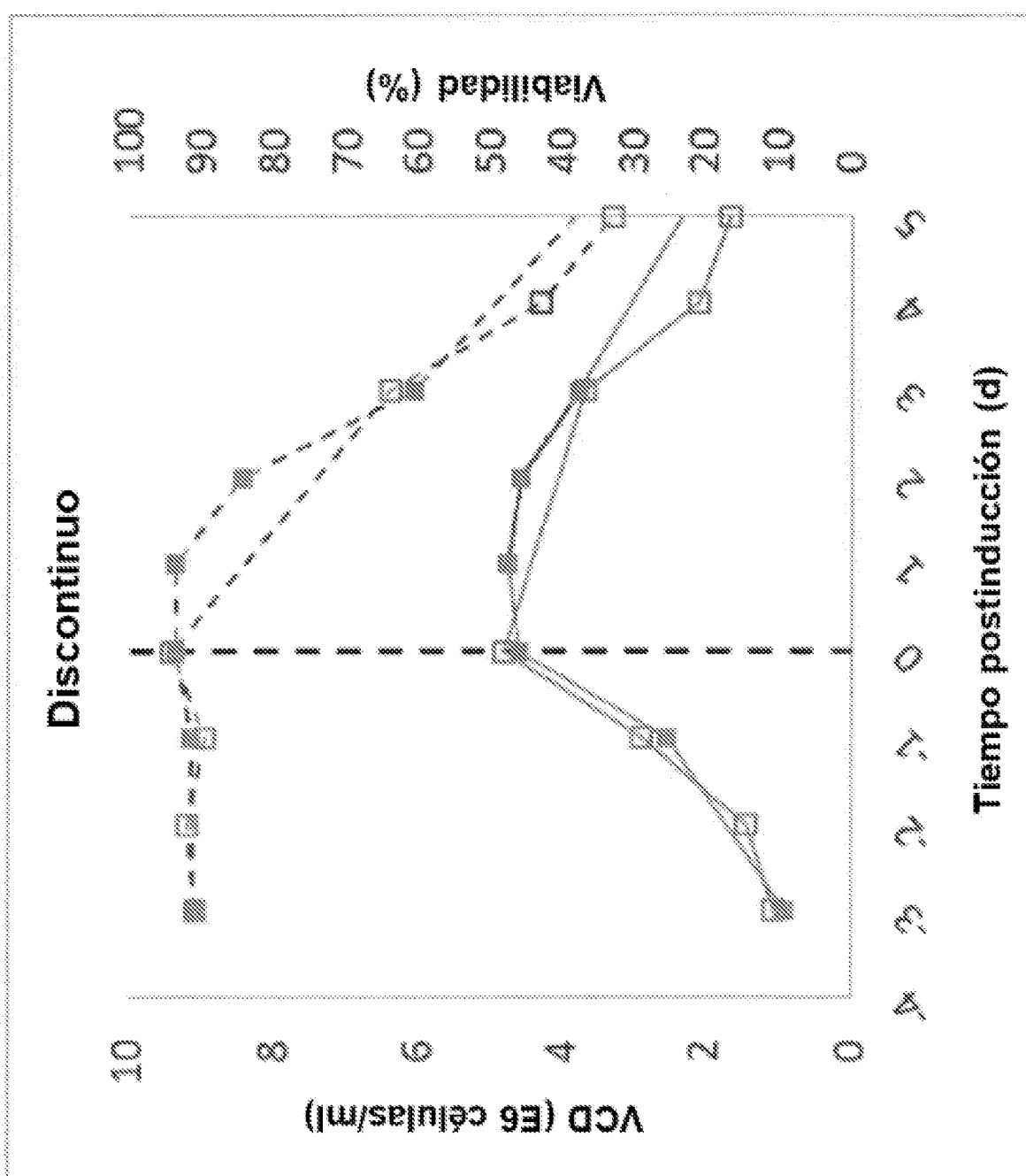


Figura 4

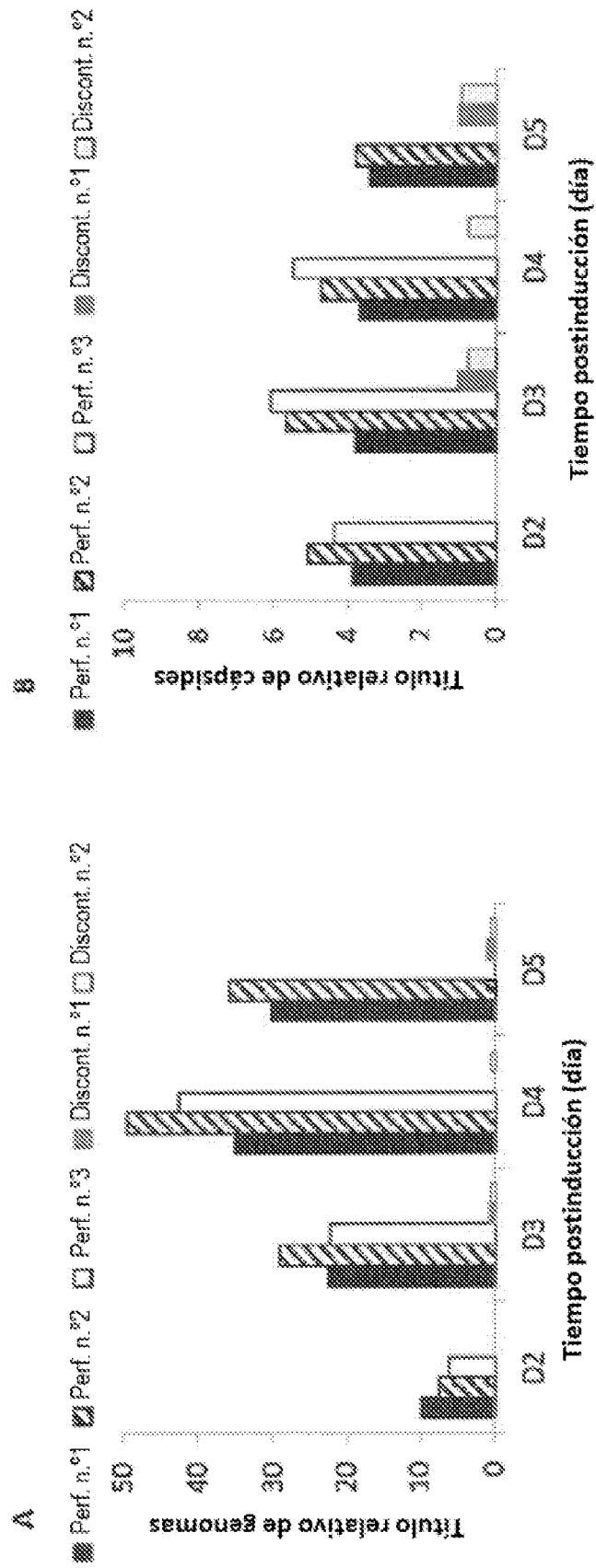


Figura 5

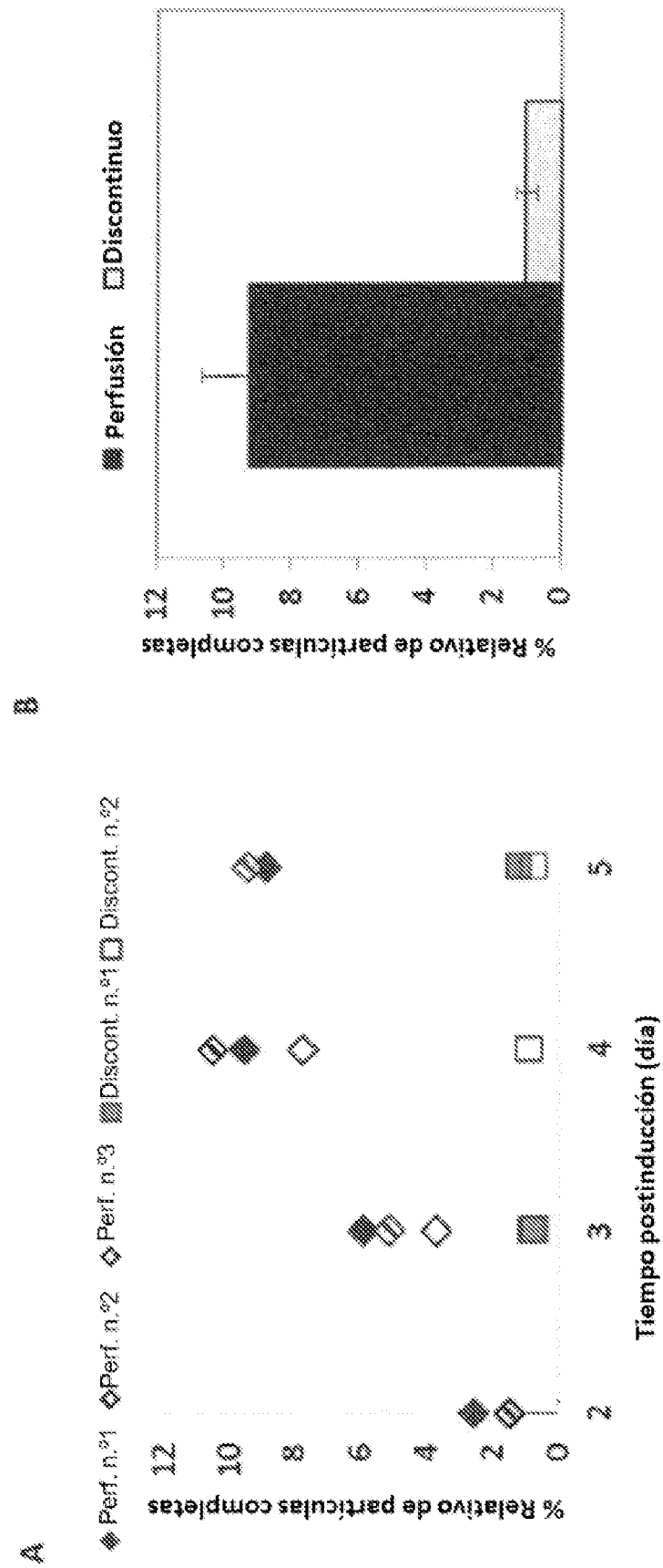


Figura 6

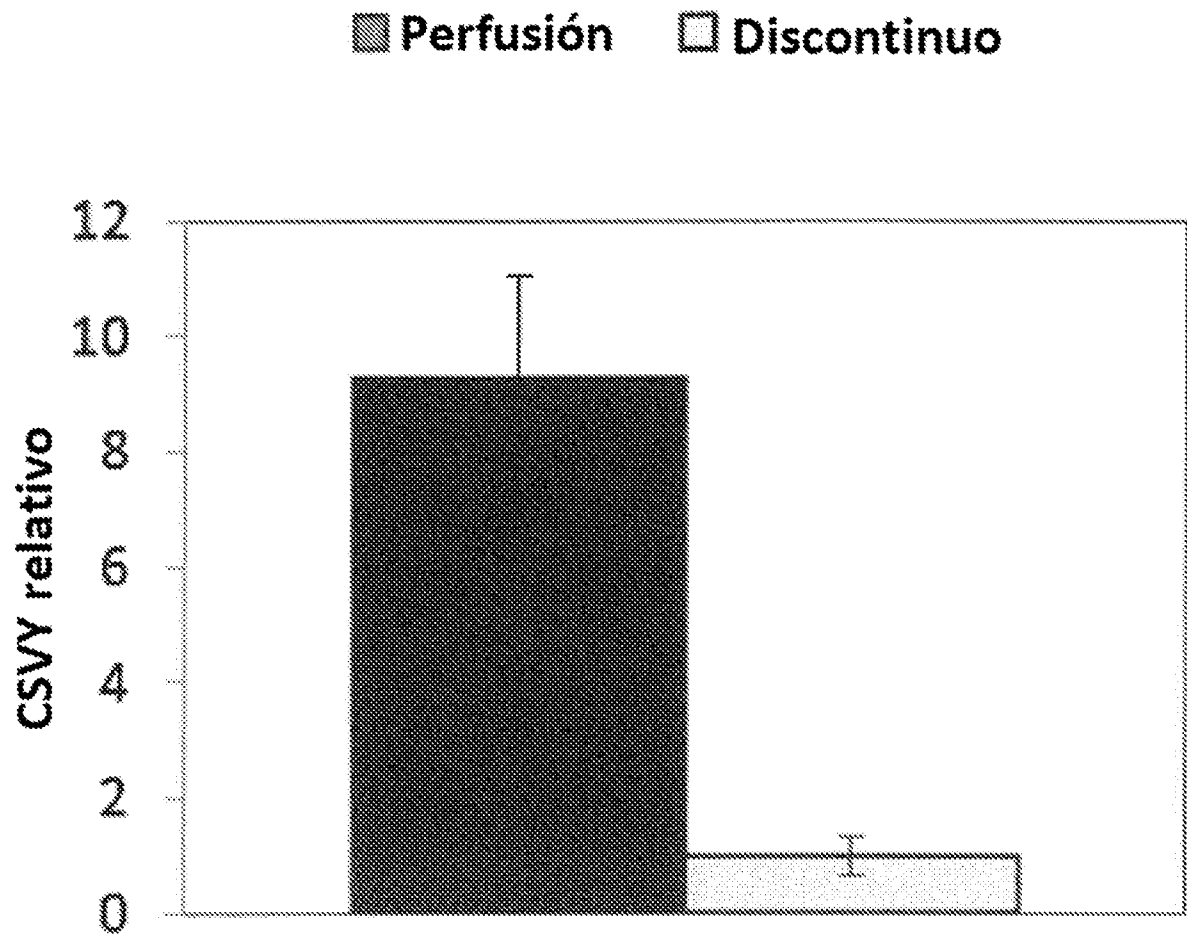


Figura 7

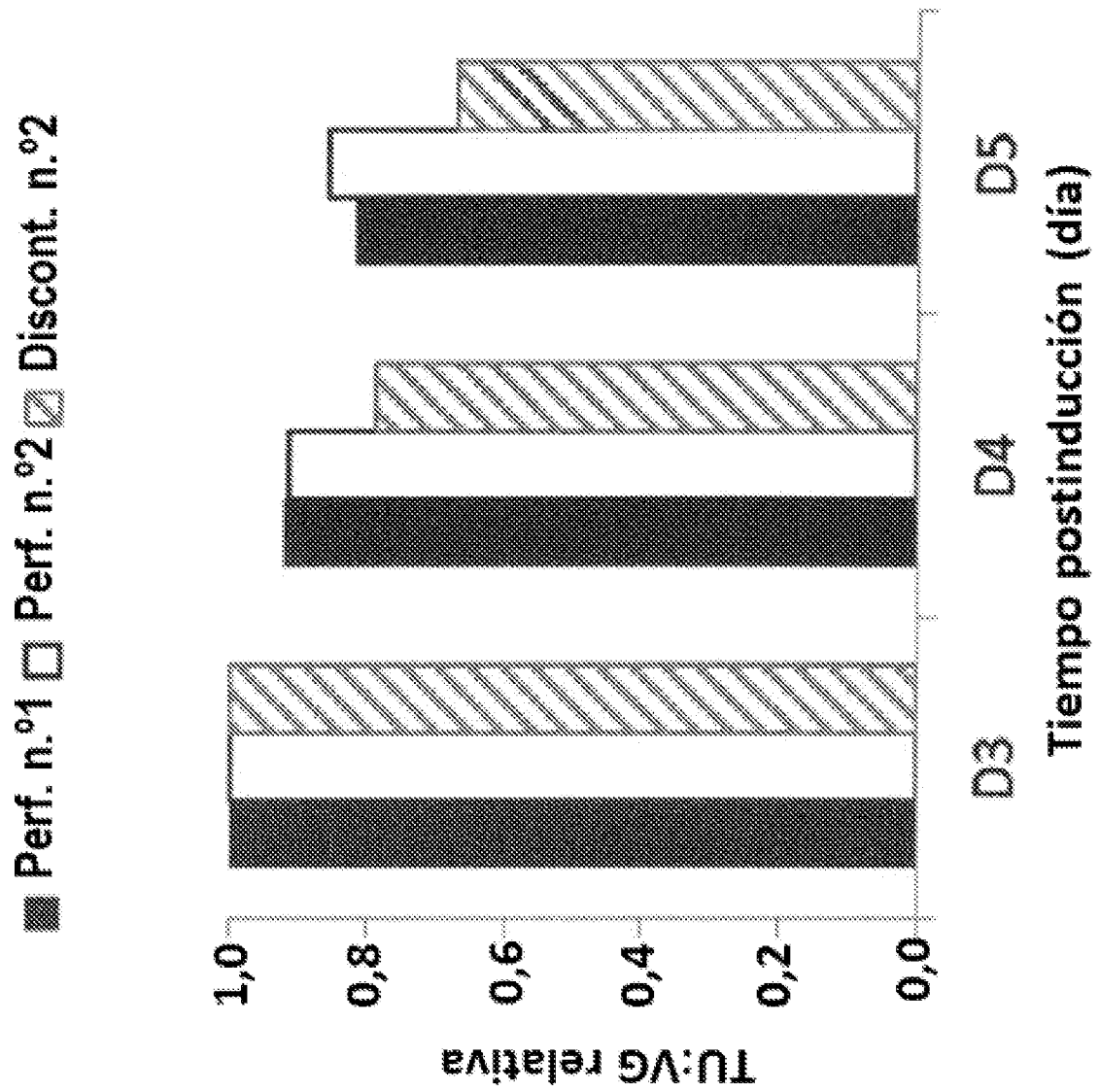


Figura 8

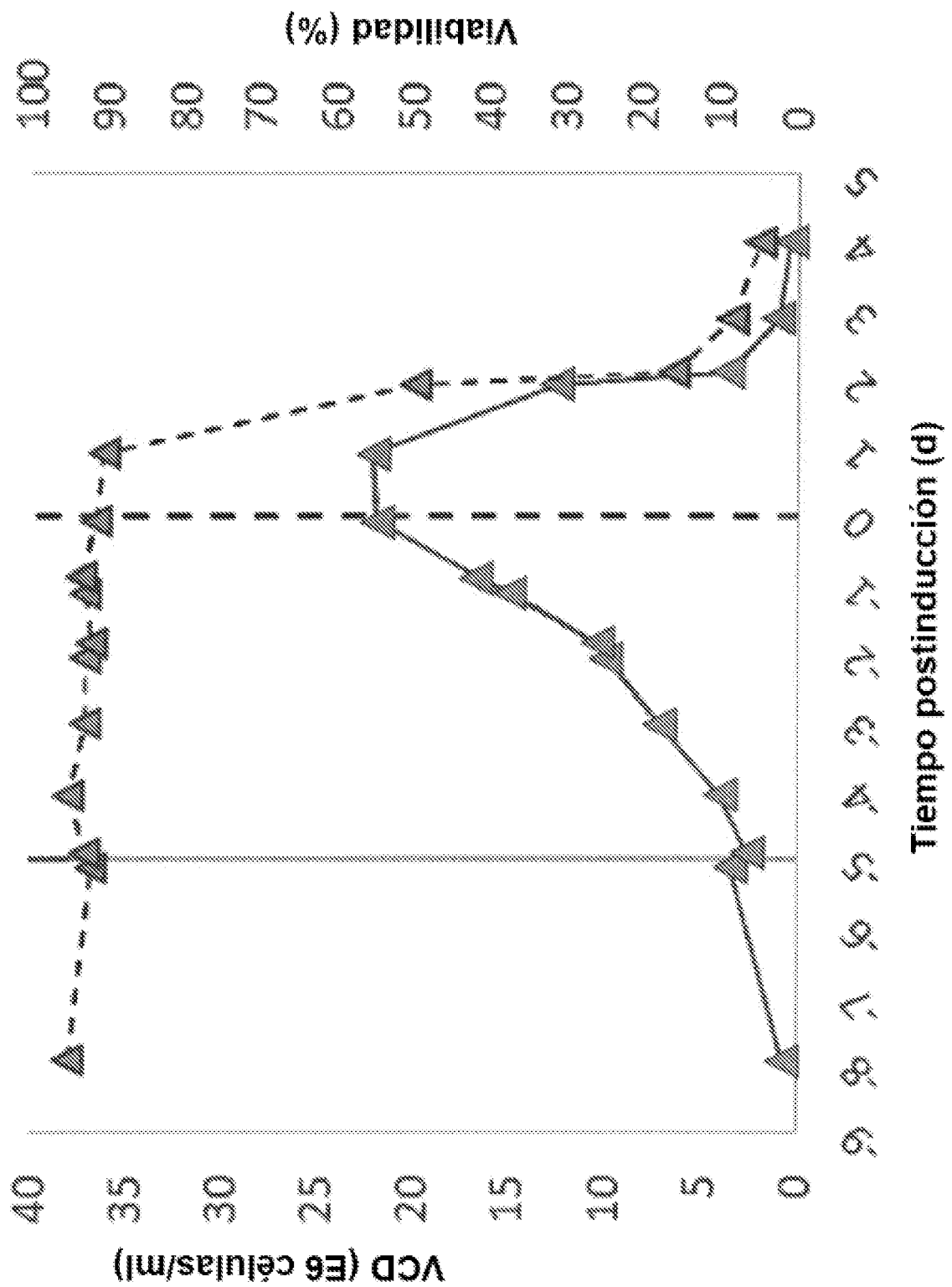


Figura 9



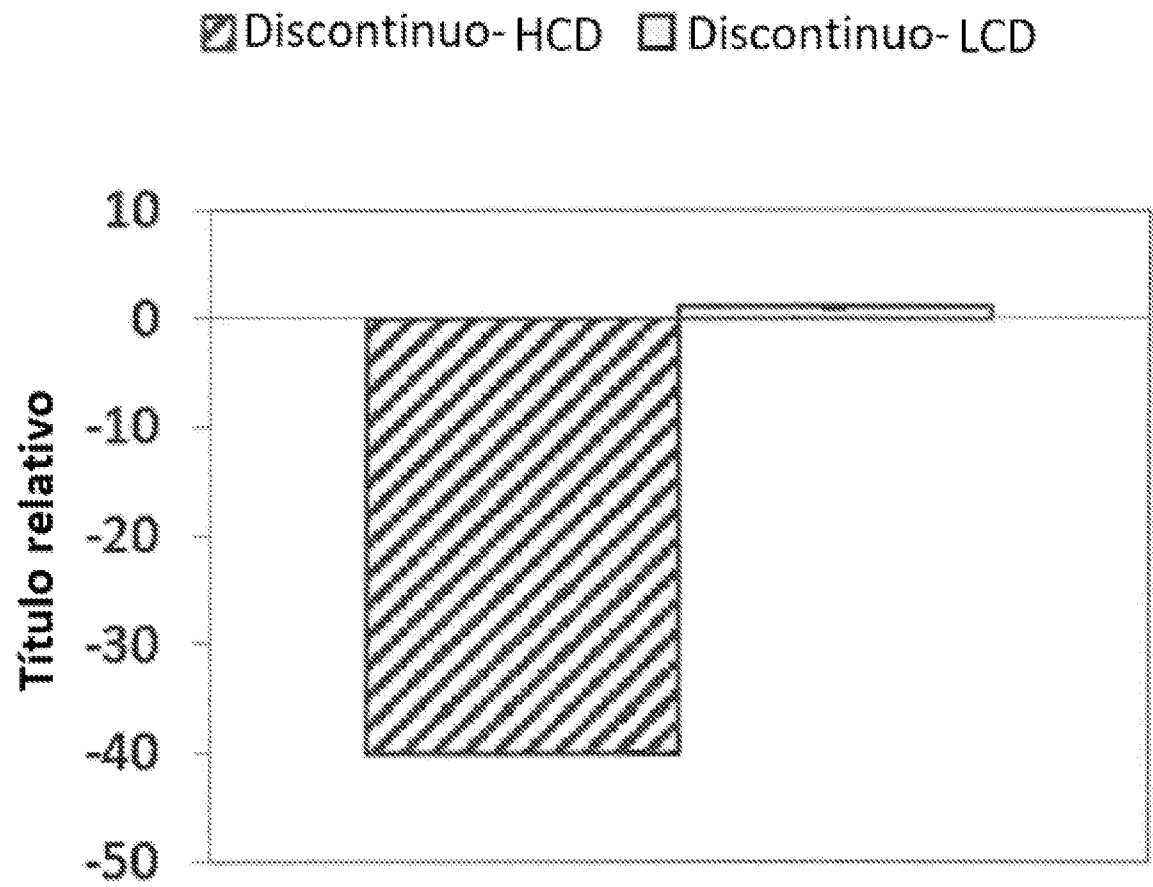


Figura 10

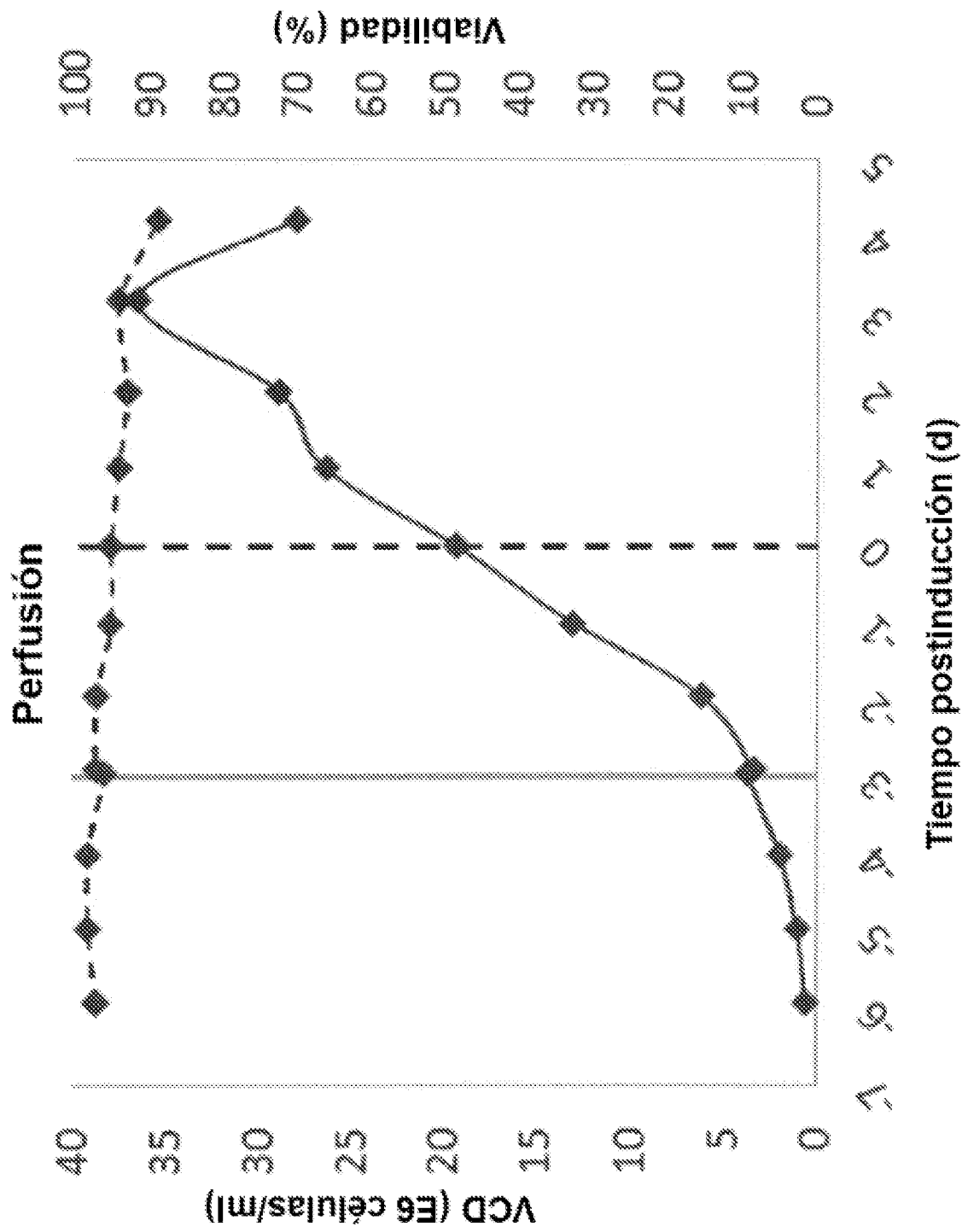


Figura 11

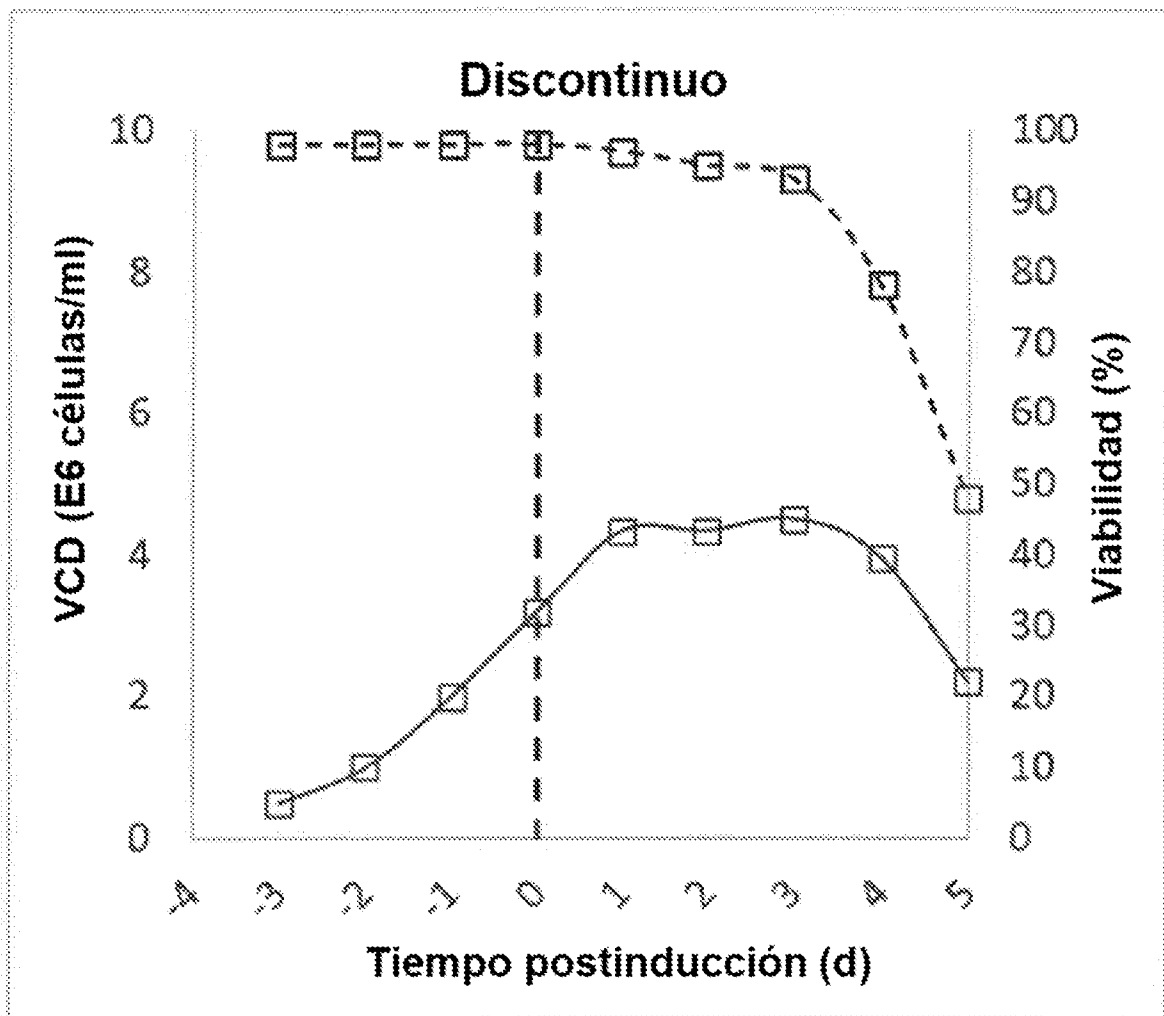


Figura 12

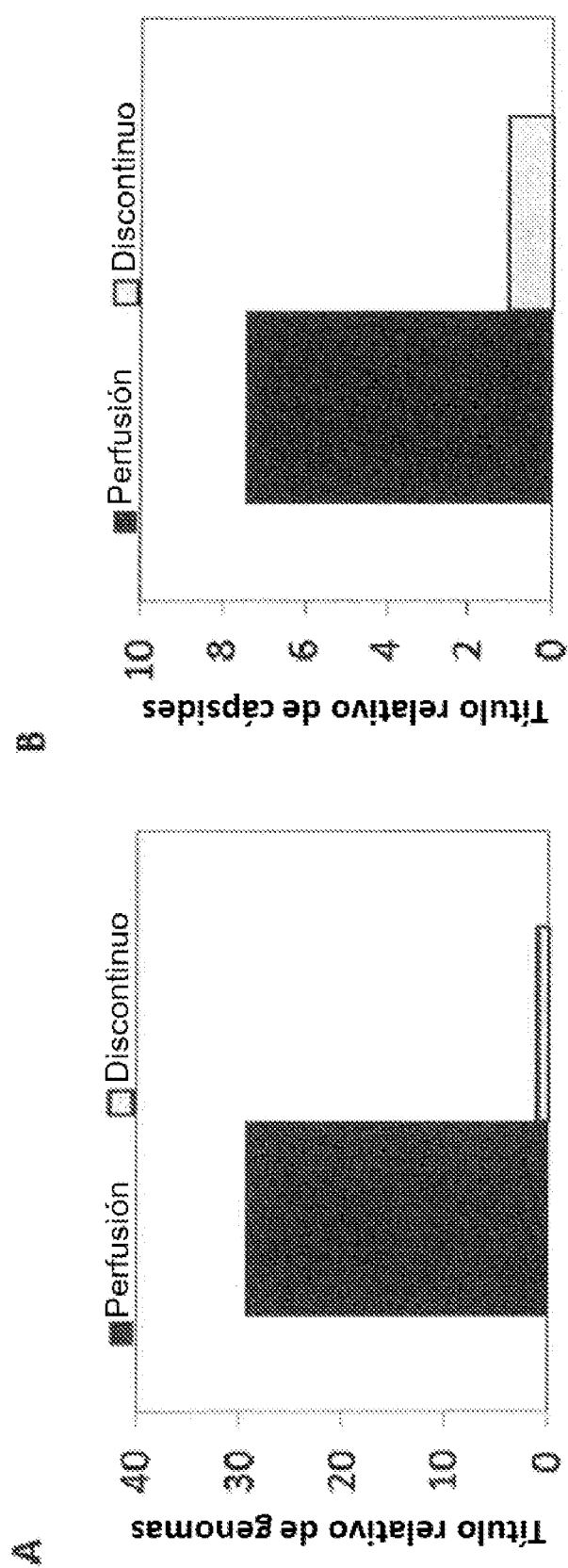
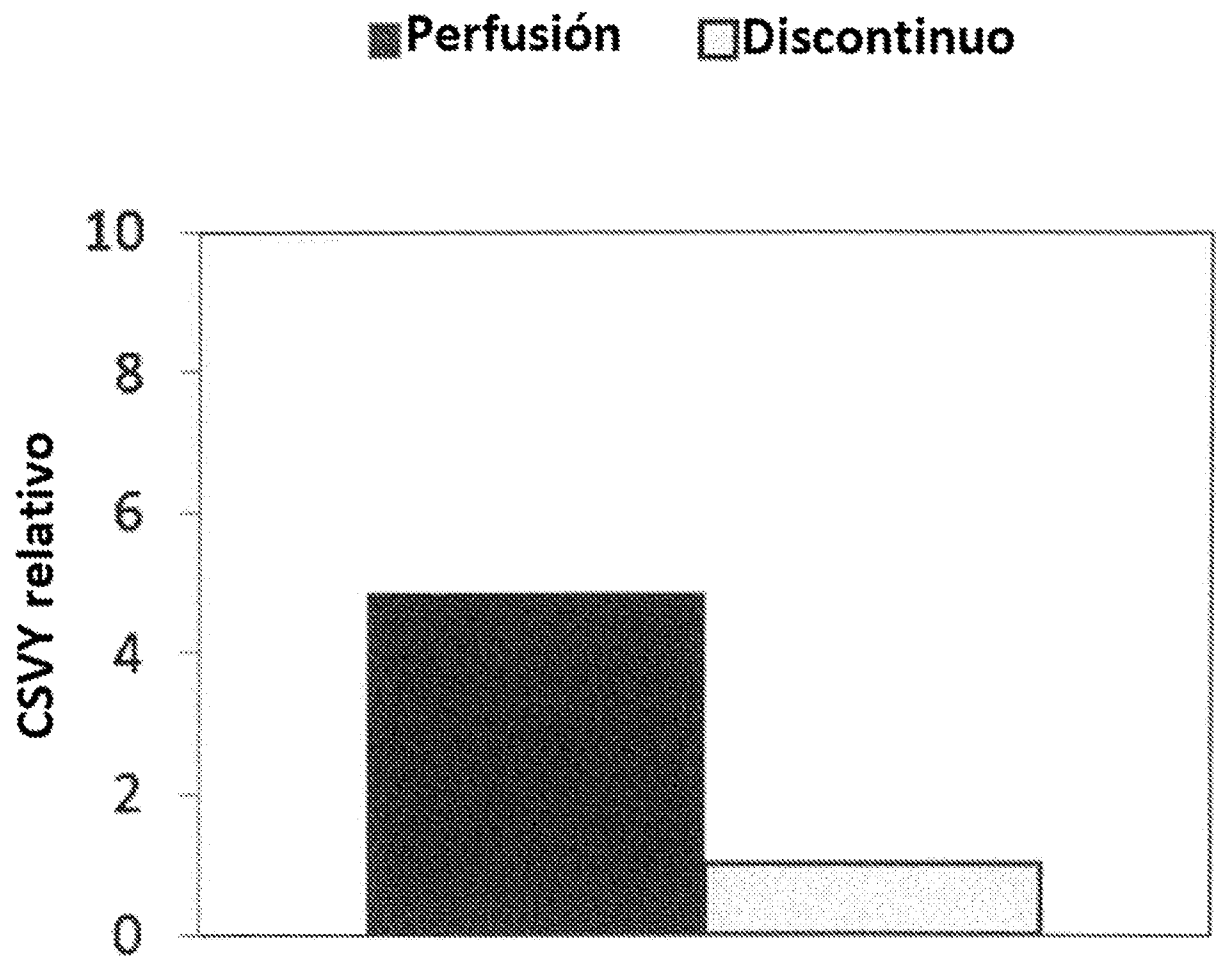


Figura 13



**Figura 14**

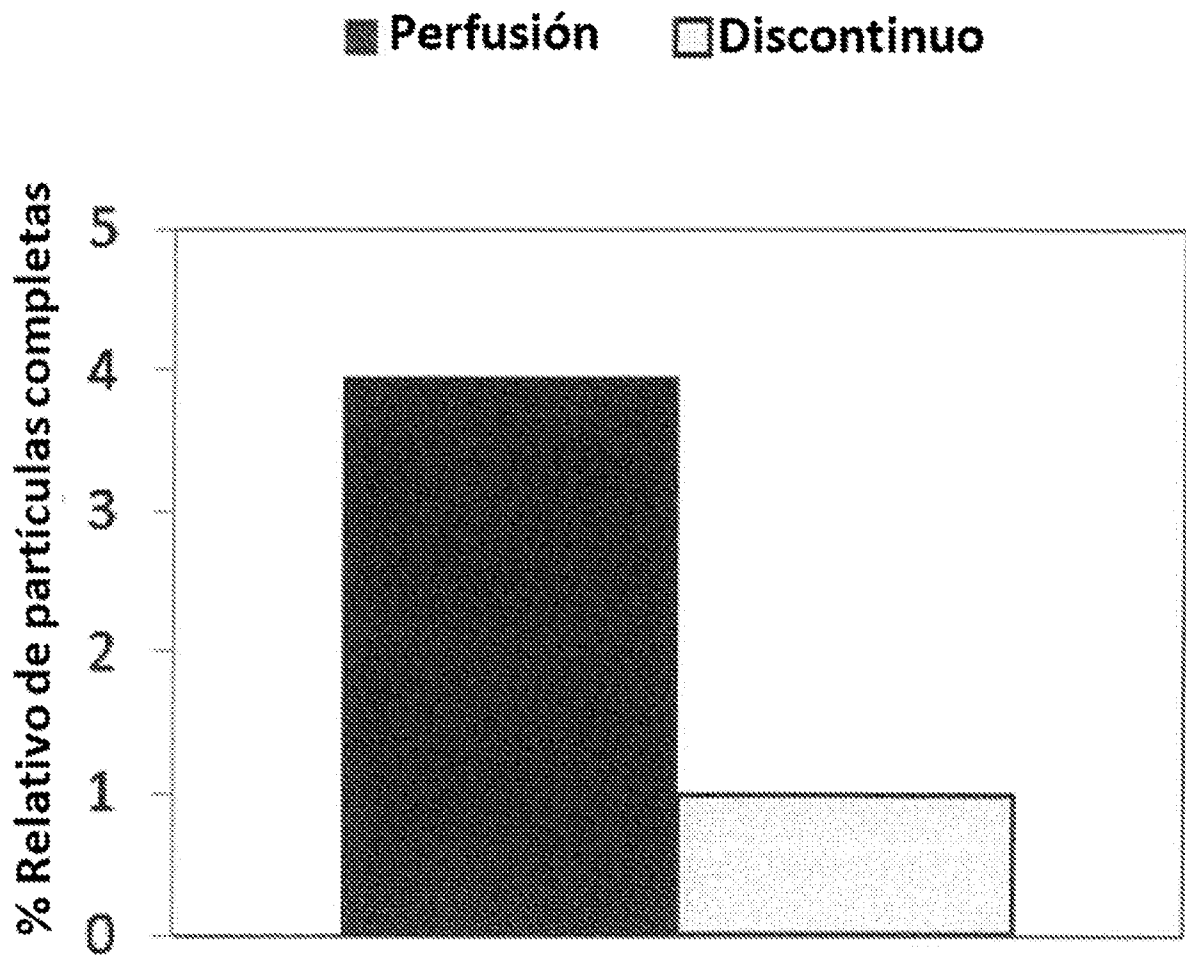


Figura 15

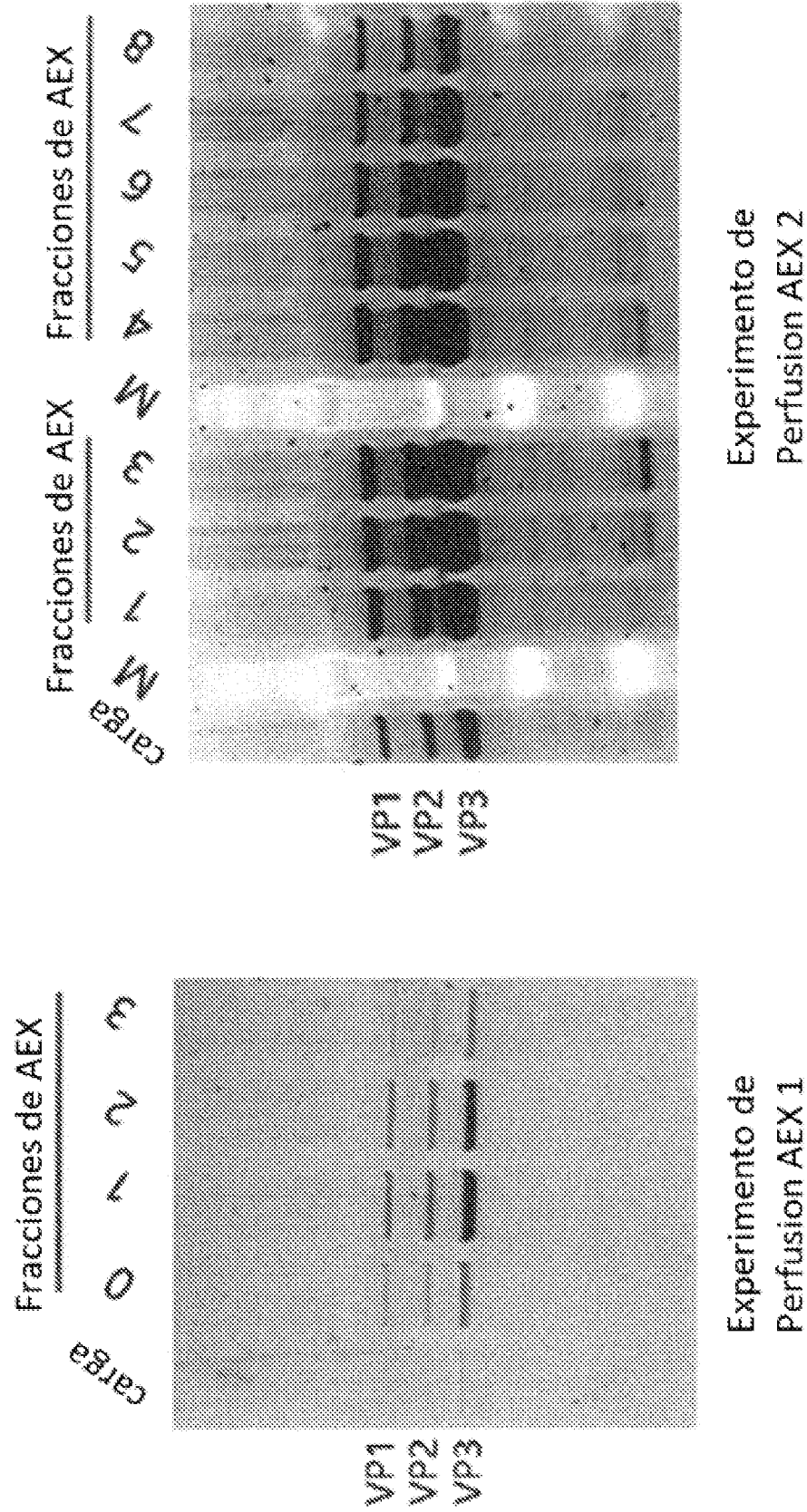


Figura 16

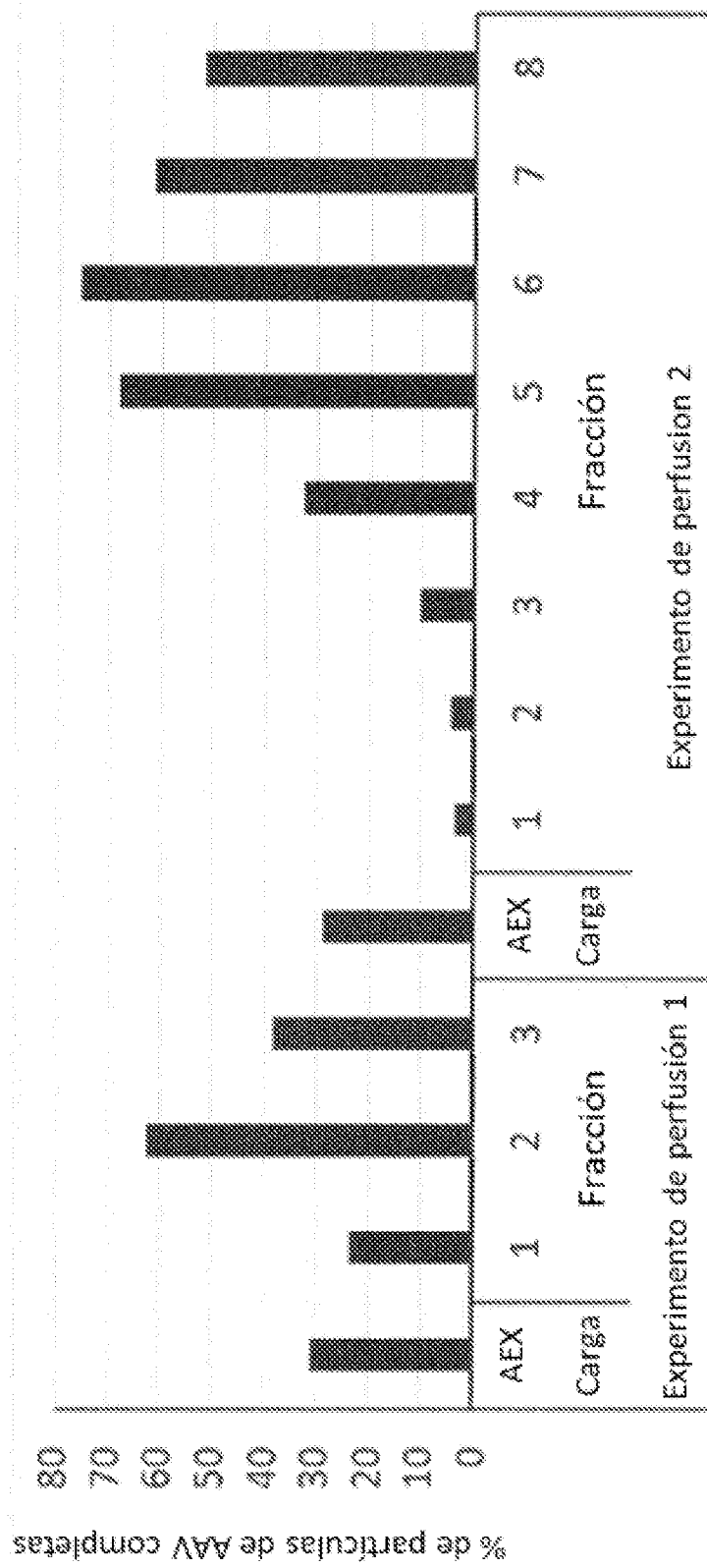


Figura 17