

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 649**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2017 PCT/US2017/056588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018 WO18071817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2017 E 17859455 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024 EP 3526321**

54 Título: **Uso de agentes tonificantes para mejorar el rendimiento de virus adeno-asociados recombinantes**

30 Prioridad:

14.10.2016 US 201662408420 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2025

73 Titular/es:

**ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.
(100.00%)
60 Leveroni Court
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**JING, YING y
PANTEL, JAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 012 649 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

Uso de agentes tónicos para mejorar el rendimiento de virus adeno-asociados recombinantes

5 Campo de la invención

La invención se refiere en general con métodos para mejorar el rendimiento del vector viral adenoasociado recombinante (rAAV) y, más particularmente, la invención se refiere al uso de agentes tónicos para mejorar el rendimiento del rAAV.

10

Antecedentes

El virus adenoasociado(AAV) es un parvovirus no patógeno con replicación defectuosa. Los vectores AAV recombinantes (rAAV) tienen muchas características únicas que los hacen atractivos como vectores para la terapia genética. En particular, los vectores rAAV pueden proporcionar genes terapéuticos a células que se dividen y a células que no se dividen, y estos genes pueden persistir durante períodos prolongados sin integrarse en el genoma de la célula diana. Dadas las amplias aplicaciones terapéuticas del rAAV, existe una necesidad constante de métodos mejorados de producción de vectores rAAV, incluidos métodos para lograr rendimientos de vectores rAAV de alto título. Los intentos previos de mejorar la producción de una variedad de vectores virales han incluido el uso de aditivos para cultivos celulares, como metales, suplementos traza, sales y otros (véase, *por ejemplo*, Williams, J. Gen. Virol., 9(3): 251-5 (1970), Weinbauer et al., Limnology and Oceanography, 54(3): 774-784 (2009), Yang et al., Hepatology, 48(5): 1396-403 (2008), y la publicación de EE. UU. No. 20150353899). Los rAAV a menudo se producen por medio de un virus auxiliar, tal como un adenovirus (AV). Sin embargo, cualquier virus auxiliar es un contaminante que debe eliminarse antes de que el rAAV pueda utilizarse en aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, también existe una necesidad en la técnica de producir rAAV con la menor cantidad posible de virus auxiliares contaminantes.

Compendio de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una célula huésped utilizada en la producción de vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) producirá mayores cantidades de rAAV y menores cantidades de virus auxiliar cuando la osmolalidad del medio de cultivo celular aumenta mediante la adición de un agente tónico iónico, tal como NaCl. La invención también se basa, en parte, en el descubrimiento de que una célula huésped utilizada en la producción de rAAV producirá una menor cantidad de virus auxiliar cuando se aumenta la osmolalidad del medio de cultivo celular mediante la adición de un agente tónico no iónico como la sacarosa. En este documento se describe un método para producir un rAAV que comprende incubar una célula huésped en un medio de cultivo con osmolalidad aumentada. También se describe en este documento un método para disminuir la cantidad de virus auxiliar producido por una célula huésped productora de rAAV, que comprende incubar la célula huésped productora de rAAV en un medio de cultivo celular con mayor osmolalidad debido a la suplementación con un agente tónico no iónico como la sacarosa. Se describe en este documento un método para aumentar la producción de rAAV y disminuir la producción de virus auxiliar producido por una célula huésped, que comprende incubar la célula huésped en un medio de cultivo celular con mayor osmolalidad debido a la suplementación con un agente tónico iónico tal como NaCl. También se describen en este documento sistemas de cultivo celular que comprenden una célula huésped capaz de producir tanto rAAV como virus auxiliar, y un medio de cultivo celular con mayor osmolalidad debido a la suplementación con un agente tónico.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un sistema de cultivo celular para su uso en el aumento de la producción total de rAAV en comparación con la producción a partir de un sistema de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular que tiene una osmolalidad de 266 mOsm/kg, comprendiendo el sistema de cultivo celular:

a) una célula huésped HeLa capaz de producir rAAV;

b) un virus auxiliar; y

c) un medio de cultivo celular que comprende un agente tónico no iónico y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior cuando se mide inmediatamente después de que la célula huésped HeLa se introduce en el medio de cultivo celular.

Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, la célula huésped HeLa comprende un genoma, comprendiendo dicho genoma uno o más genes AAV integrados de forma estable en el mismo; opcionalmente en donde la célula huésped HeLa es capaz de producir un virus auxiliar seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus del herpes, baculovirus y formas recombinantes de cualquiera de los virus

anteriores. Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, el virus auxiliar es un adenovirus (AV); opcionalmente, en donde el virus auxiliar es Ad5.

5 Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, el medio de cultivo celular de la presente invención puede tener una osmolalidad de

d) 375 mOsm/kg o superior; o

e) 400 mOsm/kg o superior.

10

Opcionalmente, el sistema de cultivo celular de la presente invención puede comprender además uno o más agentes tonificantes iónicos; en donde el agente tonificante iónico se selecciona del grupo que comprende: NaCl, KCl, NaNO₃, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaNO₃, KNO₃, K₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄ y KNO₃; opcionalmente, en donde el agente tonificante es NaCl; además, opcionalmente, en donde la concentración de NaCl en el medio de cultivo celular es

15

f) 4,5 g/L o superior;

g) 6,5 g/L o superior;

20

h) 7 g/L o superior; o

i) 7,5 g/L o superior.

25

Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, el agente tonificante no iónico es un azúcar; opcionalmente un disacárido; además opcionalmente un disacárido seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, maltosa y trehalosa.

30

Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, el agente tonificante no iónico es sacarosa;

opcionalmente en donde la concentración de sacarosa en el medio de cultivo celular es

j) 6,8 g/L o superior;

35

k) 13,7 g/L o superior;

l) 29,4 g/L o superior; o

40

m) 41,1 g/L o superior.

Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular sin suero;

45

y/o un medio de cultivo celular sin proteínas;

y/o un medio de cultivo celular seleccionado del grupo que consiste en MEM, DMEM, RPMI, medio F-12 de Ham, medio L-15 de Leibovitz y mezclas de los mismos, estando dicho medio suplementado con uno o más agentes tonificantes no iónicos.

50

Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, el medio de cultivo celular consiste esencialmente en DMEM suplementado con uno o más agentes tonificantes no iónicos.

55

Opcionalmente, en el sistema de cultivo celular de la presente invención, la célula huésped HeLa comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por repeticiones terminales invertidas de AAV, genes rep y cap, y genes del virus auxiliar.

60

La presente invención proporciona un método para producir un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) utilizando un sistema de cultivo celular de la presente invención; opcionalmente en donde la célula huésped HeLa se incuba en el medio de cultivo celular durante un período de al menos 2 días; opcionalmente al menos 3 días; y además opcionalmente aproximadamente 4 días.

65

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además las etapas de recolectar y purificar el rAAV.

Opcionalmente, el método de la presente invención produce al menos un aumento del 50% en la producción

total de rAAV en comparación con la producción de un sistema de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular que tiene una osmolalidad de 266 mOsm/kg.

- 5 Opcionalmente, el método de la presente invención produce al menos una reducción del 50% en la producción total de virus auxiliar en comparación con la producción de un sistema de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular que tiene una osmolalidad de 266 mOsm/kg.

10 La presente invención proporciona un método para producir un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) utilizando un virus auxiliar, comprendiendo el método incubar una célula huésped HeLa capaz de producir rAAV en presencia de virus auxiliar durante un período de incubación de al menos 2 días en un medio de cultivo celular que contiene virus auxiliar y un agente tonificante no iónico y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior al inicio del período de incubación, y en donde el método produce al menos un aumento del 50% en la producción total de rAAV y una reducción del 20% en la producción total de virus auxiliar en comparación con una célula huésped incubada en un medio con una osmolalidad de 266 mOsm/kg.

15 En un aspecto de la invención, el agente tonificante es iónico. Se contempla que el agente tonificante puede ser cualquier agente tonificante iónico compatible con medios de cultivo de células de mamíferos o insectos. Los agentes tonificantes iónicos ilustrativos incluyen NaCl, KCl, NaNO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaNO₃, KNO₃, K₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, o KNO₃. En una realización, el agente tonificante es NaCl.
20 Se contempla que, cuando el agente tonificante es NaCl, éste puede estar presente en una concentración de al menos 4,5 g/L (77,0 mM). Se contempla además que el NaCl puede estar presente en una concentración de al menos 6,5 g/L (111,2 mM), o al menos 7,5 g/L (128,3 mM). Se entenderá que otros agentes tonificantes iónicos pueden sustituir al NaCl sustituyendo una cantidad osmolar igual de la sal alternativa.

25 En otro aspecto de la invención, el agente tonificante es no iónico. Se contempla que el agente tonificante pueda ser cualquier agente tonificante no iónico compatible con medios de cultivo celular de mamíferos o insectos. Por ejemplo, los agentes tonificantes no iónicos pueden ser un azúcar, incluidos disacáridos y monosacáridos, como sacarosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, maltosa y trehalosa. En una realización, el agente tonificante es sacarosa. Se contempla que, cuando el agente tonificante es sacarosa, puede estar presente a una concentración de la menos 6,8 g/L (19,9 mM). Se contempla además que la sacarosa puede estar presente en una concentración de al menos 13,7 g/L (40,0 mM), 29,4 g/L (85,9 mM) o 41,1 g/L (120,0 mM). Se entenderá que otros agentes tonificantes no iónicos pueden sustituir a la sacarosa sustituyendo una cantidad molar igual del agente tonificante no iónico alternativo.

35 Se contempla que la osmolalidad del medio de cultivo, cuando se mide al inicio de la incubación de la célula huésped, será de 360 mOsm/kg o superior, 375 mOsm/kg o superior, o 400 mOsm/kg o superior. En una realización, la osmolalidad del medio de cultivo es suficiente para producir al menos una reducción del 20% en la producción total del virus auxiliar, en relación con la producida por una célula huésped en un medio de cultivo celular a 266 mOsm/kg. Se contempla además que la reducción en la producción total del virus auxiliar puede ser del 30%, 40% o 50%. En otra realización, la concentración del agente tonificante iónico es suficiente para producir al menos un aumento del 50% en la producción total de rAAV, en relación con la producida por una célula huésped en un medio de cultivo celular a 266 mOsm/kg. Se contempla además que el aumento en la producción total de rAAV pueda ser del 100%, 150% o 200%. En una realización, el período de tiempo que la célula huésped se incuba en el medio de cultivo celular con osmolalidad aumentada es de al menos 2 días. Se contempla además que la incubación pueda ser de al menos 3 días o aproximadamente 4 días.

Se contempla que la célula huésped puede ser una célula de mamífero, por ejemplo, una célula HeLa, HEK293, COS, A549, BHK o Vero. También se contempla que la célula huésped puede ser una célula de insecto, por ejemplo, una célula Sf9, Sf-21, Tn-368 o BTI-Tn-5B1-4 (High-Five). En la presente invención, la célula huésped es una célula HeLa. Se contempla que la célula huésped puede comprender una secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por repeticiones terminales invertidas de AAV, genes rep y cap, o genes de virus auxiliares. En una realización, la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por repeticiones terminales invertidas de AAV, genes rep y cap, y genes del virus auxiliar. En una realización, la célula huésped comprende uno o más genes AAV integrados de forma estable en el genoma de la célula huésped.

Se contempla que el virus auxiliar puede ser cualquier virus capaz de permitir que el AAV contenido en una célula huésped entre en la fase de infección, por ejemplo, adenovirus, virus del herpes simple, virus del papiloma o baculovirus. En una realización, el virus auxiliar es el adenovirus subtipo 5 (Ad5).

60 En algunas realizaciones, la célula huésped será capaz de producir tanto rAAV como virus auxiliar. Una célula huésped es capaz de producir rAAV o AV si, en ausencia de intervención y dadas las condiciones de cultivo adecuadas, la célula producirá partículas virales, independientemente de que las partículas se liberen o no en el medio de cultivo celular. Una célula huésped puede ser capaz de producir un virus porque fue infectada por un virus vivo, o porque fue transfectada con genes virales que pueden existir en la célula transitoriamente, por ejemplo, en un plásmido u otro cuerpo extracromosómico, o estar integrados permanentemente en el genoma

de la célula huésped. Se contempla que las células huésped transfectadas transitoriamente con uno o más plásmidos que contienen repeticiones terminales invertidas de AAV, genes rep y cap, e infectadas por un virus auxiliar vivo pueden considerarse capaces de producir tanto rAAV como virus auxiliar. Se contempla además que las células huésped que contienen repeticiones terminales invertidas de AAV, genes rep y cap integrados en los cromosomas de la célula huésped e infectadas con un virus auxiliar vivo se considerarán capaces de producir tanto rAAV como virus auxiliar.

En otras realizaciones, la célula huésped se inocula con un virus auxiliar no replicante. En esta situación, la célula huésped es capaz de producir rAAV pero no de producir virus auxiliares y, por lo tanto, no se producirán los efectos beneficiosos del aumento de la osmolalidad en la producción de virus auxiliares, aunque aún se producirá el efecto beneficioso del aumento de la producción de rAAV.

En otros aspectos, esta divulgación proporciona un rAAV producido por cualquiera de los métodos contemplados, una composición que comprende un rAAV producido por cualquiera de los métodos contemplados, o un sistema de cultivo celular que comprende una célula huésped capaz de producir tanto rAAV como virus auxiliar y medios de cultivo celular con una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior.

Estos y otros aspectos y características de la invención se describen en la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas, como se ilustra en los dibujos adjuntos. Los elementos referenciados similares identifican características comunes en los dibujos correspondientes.

La FIG. 1A representa el efecto de la adición del agente tonificante iónico NaCl sobre la producción de rAAV extracelular y Ad5 en una línea celular productora HeLa a los 4 días posteriores a la inoculación y la infección. La producción de rAAV y Ad5 se cuantificó mediante qPCR. Cada valor representa la media de dos experimentos independientes.

La FIG. 1B representa el efecto de la adición del agente tonificante NaCl en la producción de rAAV total y Ad5 en una línea productora HeLa a los 4 días posteriores a la inoculación y la infección. La producción de rAAV y Ad5 se cuantificó mediante qPCR. Cada valor representa la media de dos experimentos independientes.

La FIG. 2A representa el efecto de la adición del agente tonificante no iónico sacarosa sobre la producción de rAAV y Ad5 extracelulares en una línea celular productora de HeLa a los 4 días de la inoculación y la infección. La producción de rAAV y Ad5 se cuantificó mediante qPCR.

La FIG. 2B representa el efecto de la adición del agente tonificante no iónico en la producción de rAAV total y Ad5 en una línea productora HeLa a los 4 días posteriores a la inoculación y la infección. La producción de rAAV y Ad5 se cuantificó mediante qPCR. Cada valor representa la media de dos experimentos independientes.

Descripción detallada

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la producción de rAAV y virus auxiliar en una célula huésped se puede optimizar aumentando la osmolalidad del medio de cultivo mediante el uso de un agente tonificante, tal como NaCl o sacarosa. En un aspecto, la invención proporciona un método para producir rAAV utilizando un virus auxiliar, comprendiendo el método la incubación de una célula huésped capaz de producir tanto rAAV como virus auxiliar en un medio de cultivo celular que contiene uno o más agentes tonificantes y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior al inicio del período de incubación. En otro aspecto, la invención proporciona un método para disminuir la cantidad de virus auxiliar producido durante la producción de rAAV incubando una célula huésped en un medio de cultivo celular que contiene uno o más agentes tonificantes y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior al inicio del período de incubación. En incluso otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la cantidad de rAAV producido por una célula huésped mientras disminuye simultáneamente la cantidad de virus auxiliar producido por una célula huésped, incubando una célula huésped en un medio de cultivo celular que contiene uno o más agentes tonificantes y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior al inicio del período de incubación.

1. Virus adenoasociado

El virus adenoasociado (AAV) es un virus icosaédrico pequeño y sin envoltura del género Dependoparvovirus y la familia Parvovirus. El AAV tiene un genoma de ADN lineal monocatenario de aproximadamente 4,7 kb. El AAV incluye numerosos tipos serológicamente distinguibles, incluidos los serotipos AAV-1 a AAV-12, así como más de 100 serotipos de primates no humanos (véase, *por ejemplo*, Srivastava, J. Cell Biochem., 105(1): 17-24 (2008), y Gao et al., J. Virol., 78(12), 6381-6388 (2004)). Se puede utilizar cualquier tipo de AAV en los

métodos de la presente invención. El AAV es capaz de infectar tanto células en división como células quiescentes de varios tipos de tejidos, y los diferentes serotipos de AAV exhiben diferente tropismo tisular. El AAV no se replica de forma autónoma y tiene un ciclo de vida con una fase latente y una fase infecciosa. En la fase latente, después de que una célula se infecta con un AAV, el sitio AAV se integra específicamente en el genoma del huésped como un provirus. La fase infecciosa no ocurre a menos que la célula también esté infectada con un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus (AV) o virus del herpes simple (VHS)), que permite que el AAV se replique.

El genoma del AAV de tipo salvaje contiene dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 nucleótidos, que contienen secuencias de señal que dirigen la replicación del AAV, la encapsidación y la integración del genoma. Además de los ITR, tres promotores de AAV, p5, p19 y p40, impulsan la expresión de dos marcos de lectura abiertos que codifican los genes rep y cap. Dos promotores rep, acoplados con el empalme diferencial del único intrón AAV, dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40) a partir del gen rep. Las proteínas rep son responsables de la replicación genómica. El gen Cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica tres proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) que son variantes de empalme del gen cap. Estas proteínas forman la cápside de la partícula AAV.

Debido a que las señales que actúan en *cis* para la replicación, encapsidación e integración están contenidas dentro de los ITR, parte o la totalidad del genoma interno de 4,3 kb puede reemplazarse con ADN extraño, por ejemplo, un casete de expresión para una proteína exógena de interés. En este caso las proteínas rep y cap se proporcionan en *trans* en, por ejemplo, un plásmido. Para producir un vector AAV, una línea de células huésped permisiva de la replicación de AAV debe expresar los genes rep y cap, el casete de expresión flanqueado por ITR y las funciones auxiliares proporcionadas por un virus auxiliar, por ejemplo, los genes AV E1a, E1b55K, E2a, E4orf6 y VA (Weitzman et al., Adeno-associated virus biology. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols, págs. 1-23, 2011). La producción del vector AAV también puede dar lugar a la producción de partículas de virus auxiliar, que deben eliminarse o inactivarse antes del uso del vector AAV. Numerosos tipos de células son adecuados para producir vectores AAV, incluidas las células HEK293, las células COS, las células HeLa, las células BHK, las células Vero y las células A549, así como las células de insectos, incluidas las células Sf9, Sf-21, Tn-368 y BTI-Tn-5B1-4 (High-Five) (véanse, *por ejemplo* las patentes de EE. UU. Nos. 6,156,303, 5,387,484, 5,741,683, 5,691,176, 5,688,676, 8,163,543, la publicación de EE. UU. No. 20020081721, las publicaciones PCT Nos. WO00/47757, WO00/24916 y WO96/17947). Los vectores AAV generalmente se producen en estos tipos de células mediante un plásmido que contiene el casete de expresión flanqueado por ITR y uno o más plásmidos adicionales que proporcionan los genes adicionales del AAV y del virus auxiliar.

En la presente invención se puede utilizar AAV de cualquier serotipo. De manera similar, se contempla que se puede utilizar cualquier tipo de AV, y un experto en la materia podrá identificar AAV y tipos de AV adecuados para la producción de su vector AAV recombinante (rAAV) deseado. Las partículas de AAV y AV se pueden purificar, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad, gradiente de iodixonal o gradiente de CsCl.

El genoma del AAV de tipo salvaje es ADN monocatenario y tiene aproximadamente 4,7 kb. Los vectores AAV pueden tener genomas monocatenarios de un tamaño de 4,7 kb, o son mayores o menores de 4,7 kb, incluidos genomas de gran tamaño de hasta 5,2 kb o tan pequeños como 3,0 kb. Además, los genomas vectoriales pueden ser sustancialmente autocomplementarios, de modo que dentro del virus el genoma es sustancialmente bicatenario. Los vectores AAV que contienen genomas de todos los tipos son adecuados para su uso en el método de la presente invención.

Como se discutió anteriormente, el AAV requiere coinfección con un virus auxiliar para entrar a la fase infecciosa de su ciclo de vida. Los virus auxiliares incluyen el adenovirus (AV), incluido el AV recombinante, y el virus del herpes simple (VHS), incluido el VHS recombinante. También existen sistemas para producir AAV en células de insectos utilizando baculovirus, incluido el baculovirus recombinante. También se ha propuesto que los virus del papiloma pueden proporcionar una función auxiliar para el AAV (véase, *por ejemplo*, Hermonat et al., Molecular Therapy 9, S289-S290 (2004)), y se pueden utilizar virus del papiloma adecuados en los métodos de la presente invención. Los virus auxiliares incluyen cualquier virus capaz de crear un AAV que permita la replicación. AV es un virus de ADN nuclear sin envoltura con un genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 36 kb. AV es capaz de rescatar AAV latente en una célula, al proporcionar los genes E1a, E1b55K, E2a, E4orf6 y VA, permitiendo la replicación y encapsidación de AAV. El VHS es una familia de virus que tienen un genoma de ADN lineal bicatenario relativamente grande encapsidado en una cápside icosaédrica, que está envuelta en una envoltura de bicapa lipídica. El VHS es infeccioso y altamente transmisible. Se identificaron las siguientes proteínas de replicación de VHS-1 como necesarias para la replicación de AAV: el complejo helicasa/primasa (UL5, UL8 y UL52) y la proteína de unión al ADN ICP8 codificada por el gen UL29, con otras proteínas que mejoran la función auxiliar.

2. Producción de rAAV

La presente invención comprende la producción de un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV) a partir

de una célula huésped, utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tal como se utiliza en este documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier célula o células capaces de producir un rAAV. La célula huésped puede ser una célula de mamífero, por ejemplo, una célula HeLa, una célula COS, una célula HEK293, una célula A549, una célula BHK o una célula Vero. La célula huésped puede ser una célula de insecto, por ejemplo, una célula Sf9, una célula Sf-21, una célula Tn-368 o una célula BTI-Tn-5B 1-4 (High-Five). A menos que se indique lo contrario, se entiende que los términos "célula" o "línea celular" incluyen variantes modificadas o diseñadas mediante ingeniería de la célula o línea celular indicada.

Como se discutió anteriormente, para permitir la producción de rAAV, la célula huésped debe estar provista de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV (que pueden, por ejemplo, flanquear una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés), funciones de los genes rep y cap de AAV, así como funciones auxiliares adicionales. Estos pueden proporcionarse a la célula huésped utilizando una variedad de plásmidos o vectores apropiados. Se pueden proporcionar funciones auxiliares adicionales, por ejemplo, mediante una infección por adenovirus (AV), mediante un plásmido que lleve todos los genes de función auxiliar de AV necesarios, o mediante otros virus como VHS o baculovirus. Cualquier gen, funciones génicas u otro material genético necesario para la producción de rAAV por la célula huésped puede existir transitoriamente dentro de la célula huésped o insertarse de manera estable en el genoma de la célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula productora que comprende funciones de los genes rep y cap de AAV y un genoma del vector rAAV. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de empaquetamiento que comprende funciones de genes rep y cap de AAV, a la que en el momento de la producción se le proporciona un genoma de vector de rAAV mediante un virus recombinante separado. Los métodos de producción de rAAV adecuados para su uso con los métodos de la presente invención incluyen los descritos en Clark et al., Human Gene Therapy 6:1329-1341 (1995), Martin et al., Human Gene Therapy Methods 24:253-269 (2013), Thorne et al., Human Gene Therapy 20:707-714 (2009), Fraser Wright, Human Gene Therapy 20:698-706 (2009), y Virag et al., Human Gene Therapy 20:807-817 (2009).

3. Agentes tonificantes

Se contempla que en la presente invención se puede utilizar cualquier medio de cultivo celular apropiado para la propagación de la célula huésped. Los medios de cultivo celular ilustrativos incluyen medio esencial mínimo (MEM), tal como medio de cultivo de Eagle, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo alfa (MEM-alfa), medio basal de células mesenquimales (MSCBM), medio F-12 de Ham y medio F-10 de Ham, medio DMEM/F12, medio E de William, medio RPMI-1640, medio MCDB, medio 199, medio de Fisher, medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), medio L-15 de Leibovitz y medio modificado de McCoy.

La osmolalidad es una medida del número de partículas disueltas por kilogramo de disolvente. La osmolalidad de una disolución se puede medir mediante la depresión del punto de congelación o la depresión de la presión de vapor. Un agente tonificante es cualquier agente capaz de aumentar la osmolalidad de una disolución sin afectar negativamente de forma sustancial otros atributos importantes de la disolución. Los agentes tonificantes apropiados variarán de ese modo según la naturaleza y el propósito de la disolución. En el caso de los medios de cultivo celular, un agente tonificante apropiado es aquel que no es tóxico y no altera sustancialmente el pH, la capacidad de amortiguación y la densidad de nutrientes del medio. Los agentes tonificantes son aquellos que se disocian en iones, por ejemplo, sales como NaCl, KCl, NaNO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaNO₃, KNO₃, K₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄ y KNO₃. Los agentes tonificantes no iónicos son aquellos que no se disocian en iones, por ejemplo, azúcares como sacarosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, maltosa y trehalosa.

En algunas realizaciones de la presente invención, las células huésped se cultivan en cultivo en suspensión. Durante el cultivo en suspensión, las células metabólicamente activas acidificarán el medio de cultivo celular en el que crecen, y el pH del medio de cultivo debe ajustarse periódicamente mediante la adición de Na₂CO₃ o NaOH estéril para devolver el pH a niveles óptimos. Será evidente que la adición de Na₂CO₃ o NaOH, así como la actividad metabólica de las células en cultivo, aumentarán la osmolalidad del medio de cultivo. Por esta razón, la osmolalidad aumentada de la presente invención es la osmolalidad más baja a la que están expuestas las células, y la osmolalidad aumenta a lo largo de la duración del cultivo.

4. Purificación de partículas rAAV

En algunas realizaciones de la presente invención, las partículas de rAAV se recolectan y/o purifican a partir de la célula huésped que se ha incubado en un medio de cultivo celular que contiene uno o más agentes tonificantes y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior al inicio del período de incubación. Las partículas de rAAV se pueden obtener a partir de células huésped mediante la lisis de las células. La lisis de las células huésped se puede lograr mediante métodos que tratan químicamente o enzimáticamente las células para liberar partículas virales infectantes. Estos métodos incluyen el uso de nucleasas como la benzonasa o la ADNasa, proteasas como la tripsina o detergentes o tensioactivos. También se pueden utilizar disrupciones físicas, como homogeneización o molienda, o la aplicación de presión a través de una celda de presión de microfluidizador, o ciclos de congelación-descongelación. Alternativamente, el sobrenadante puede

recolectarse de las células huésped sin necesidad de lisis celular. Como se utiliza en este documento, "rAAV total" se refiere al rAAV total producido por una célula huésped, y "rAAV secretado" o "rAAV extracelular" se refiere al rAAV que se puede recolectar de una célula huésped sin una etapa de lisis celular.

- 5 Después de recolectar partículas de rAAV, puede ser necesario purificar la muestra que contiene rAAV para eliminar, por ejemplo, los restos celulares resultantes de la lisis celular. En la técnica se conocen métodos de purificación mínima de partículas de AAV. Dos métodos de purificación ilustrativos son la purificación por gradiente de densidad basada en cloruro de cesio (CsCl) y en iodixanol. Ambos métodos se describen en Strobel et al., *Human Gene Therapy Methods*, 26(4): 147-157 (2015). También se puede lograr una purificación mínima mediante cromatografía de afinidad utilizando, por ejemplo, resina de afinidad AVB Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Los métodos de purificación de AAV utilizando resina de afinidad AVB Sepharose se describen, por ejemplo, en Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2:15040 (2015). Después de la purificación, las partículas de rAAV pueden filtrarse y almacenarse a $\leq 60^\circ\text{C}$.

15 5. Cuantificación de partículas rAAV

La cuantificación de partículas de rAAV se complica por el hecho de que la infección por AAV no produce un efecto citopático *in vitro* y, por lo tanto, no se pueden utilizar ensayos de placa para determinar títulos infecciosos. Sin embargo, las partículas de rAAV se pueden cuantificar utilizando varios métodos, incluida la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) (Clark et al., *Hum. Gene Ther.* 10, 1031-1039 (1999)) o la hibridación dot-blot (Samulski et al., *J. Virol.* 63, 3822-3828 (1989)), o por densidad óptica de preparaciones de vector altamente purificadas (Sommer et al., *Mol. Ther.* 7, 122-128 (2003)). Las partículas resistentes a la ADNasa (DRP) se pueden cuantificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) (DRP-qPCR) en un termociclador (por ejemplo, un termociclador de formato de bloque de 96 pocillos iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA)). En esta técnica, las muestras que contienen partículas de rAAV se incuban en presencia de DNasa I (100 U/ml; Promega, Madison, WI) a 37°C durante 60 min, seguida de digestión con proteinasa K (Invitrogen, Carlsbad, CA) (10 U/ml) a 50°C durante 60 min y, a continuación, se desnaturalizan a 95°C durante 30 min. El conjunto de cebadores y sondas utilizado debería ser específico para una porción no nativa del genoma del vector de rAAV, por ejemplo, la secuencia poli(A) de la proteína de interés. El producto de PCR se puede amplificar utilizando cualquier conjunto apropiado de parámetros de ciclo, basado en la longitud y la composición de los cebadores, la sonda y la secuencia amplificada. Se divulgan protocolos alternativos, por ejemplo, en Lock et al., *Human Gene Therapy Methods* 25(2): 115-125 (2014).

35 La infectividad de las partículas de rAAV se puede determinar utilizando un ensayo de TCID₅₀ (dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50%), como se describe, por ejemplo, en Zhen et al., *Human Gene Therapy* 15:709-715 (2004). En este ensayo, las partículas del vector rAAV se diluyen en serie y se utilizan para coinfectar una línea celular que expresa Rep/Cap junto con partículas AV en placas de 96 pocillos. 48 horas después de la infección, se extrae el ADN celular total de los pocillos infectados y de control. A continuación se mide la replicación del vector rAAV utilizando qPCR con sonda y cebadores específicos del transgén. La infectividad TCID₅₀ por mililitro (TCID₅₀/ml) se calcula con la ecuación de Kärber, utilizando las proporciones de pocillos positivos para AAV en diluciones seriadas 10 veces.

En toda la memoria descriptiva, cuando se describen aparatos, dispositivos y sistemas como que tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, o cuando se describen procesos y métodos se describen como que tienen, incluyen o comprenden etapas específicas, se contempla que, adicionalmente, hay aparatos, dispositivos y sistemas de la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes mencionados y que hay procesos y métodos según la presente invención que consisten esencialmente en o consisten en las etapas de procesamiento mencionadas.

La práctica de la invención se entenderá mejor a partir de los siguientes ejemplos, que se presentan en este documento solo para propósitos ilustrativos, y de ninguna forma deberían interpretarse como una limitación de la invención.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

Se utilizó una línea celular productora HeLa derivada de la línea celular parental HeLa S3 para producir rAAV en este experimento. En este sistema, se transfectó un único plásmido que contenía tres componentes: la secuencia del vector, los genes rep y cap de AAV y un gen marcador seleccionable en células HeLa S3 y se seleccionó un integrante estable. Las células se cultivaron en un medio de cultivo celular definido químicamente, sin proteínas, con una fracción del 10 % del medio de cultivo transferido a través de la inoculación. Los medios de cultivo se complementaron con NaCl hasta una osmolalidad final de 266, 342 o 370 mOsmo/Kg en matraces de agitación de 250 mL con un volumen inicial de 100 mL y una densidad celular inicial de 1×10^6 células/mL. Las células se mantuvieron a 37°C y 5 % de CO₂ durante 4 días con una fracción del

10 % de alimento para todas las condiciones. Se tomaron muestras de los cultivos diariamente para monitorizar el crecimiento celular y los metabolitos y el pH se ajustó de manera uniforme en todos los matraces según fuera necesario utilizando Na_2CO_3 1M. Al final de 4 días de cultivo, se determinó el rendimiento total y extracelular de rAAV y Ad5.

5

El rendimiento extracelular se determinó retirando muestras de medio de cultivo celular que contenía células suspendidas de cada matraz de agitación al final de 4 días, filtrando con un filtro de jeringa de PES (polietersulfona) de 0,2 μm y cuantificando los genomas de rAAV y Ad5 en cada muestra utilizando PCR cuantitativa en tiempo real.

10

El rendimiento extracelular se determinó retirando muestras de medio de cultivo celular que contenía células suspendidas de cada matraz de agitación al final de 4 días, lisando células con detergente, filtrando con un filtro de jeringa de PES (polietersulfona) de 0,2 μm y cuantificando los genomas de rAAV y Ad5 en cada muestra utilizando PCR cuantitativa en tiempo real.

15

Los resultados de este experimento se presentan en las FIG. 1A y 1B. Como se representa en la FIG. 1A, el aumento de la osmolalidad de los medios de cultivo mediante la adición de un agente tonificante iónico, NaCl, dio como resultado un aumento en la producción de rAAV extracelular, sin cambios significativos en la producción de Ad5 extracelular. Como se muestra en la FIG. 1B, el aumento de la osmolalidad de los medios de cultivo mediante la adición de un agente tonificante iónico, NaCl, dio como resultado un aumento en la producción de rAAV total, junto con una disminución en la producción de Ad5 total.

20

Ejemplo 2

25

Las células se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que los medios se suplementaron con el agente tonificante no iónico sacarosa hasta una osmolalidad final de 266, 286, 305, 353 o 390 mOsmo/Kg y no se añadió NaCl adicional.

30

Los resultados de este experimento se presentan en las FIG. 2A y 2B. Como se representa en la FIG. 2A, el aumento de la osmolalidad de los medios de cultivo mediante la adición de un agente tonificante no iónico, la sacarosa, dio como resultado un aumento en la producción extracelular de rAAV y una disminución en la producción extracelular de Ad5. Como se muestra en la FIG. 2B, el aumento de la osmolalidad de los medios de cultivo mediante la adición de un agente tonificante no iónico, la sacarosa, no produjo cambios en la producción total de rAAV y produjo una disminución en la producción total de Ad5.

35

Equivalentes

40

Las realizaciones anteriores se van a considerar en todos los aspectos ilustrativas y no limitan la invención descrita en este documento. Por lo tanto, el alcance de la invención está indicado por las reivindicaciones adjuntas y no por la descripción que antecede.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de cultivo celular para su uso en el aumento de la producción total de rAAV en comparación con la producción a partir de un sistema de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular que tiene una osmolalidad de 266 mOsm/kg, comprendiendo el sistema de cultivo celular:
 - a) una célula huésped HeLa capaz de producir rAAV;
 - b) un virus auxiliar; y
 - c) un medio de cultivo celular que comprende un agente tonificante no iónico y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior cuando se mide inmediatamente después de que la célula huésped HeLa se introduce en el medio de cultivo celular.
2. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1, en donde la línea celular HeLa comprende un genoma, comprendiendo dicho genoma uno o más genes AAV genes integrados de forma estable en él;
opcionalmente en donde la célula huésped HeLa es capaz de producir virus auxiliares seleccionados del grupo que consiste en adenovirus, virus del herpes, baculovirus y formas recombinantes de cualquiera de los virus anteriores.
3. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 o 2, en donde el virus auxiliar es un adenovirus (AV);
opcionalmente en donde el virus auxiliar es Ad5.
4. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el medio de cultivo celular tiene una osmolalidad de
 - a) 375 mOsm/kg o superior; o
 - b) 400 mOsm/kg o superior.
5. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que además comprende uno o más agentes tonificantes iónicos; en donde el agente tonificante iónico se selecciona del grupo que comprende: NaCl, KCl, NaNO₃, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaNO₃, KNO₃, K₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄ y KNO₃; opcionalmente, en donde el agente tonificante es NaCl; además, opcionalmente, en donde la concentración de NaCl en el medio de cultivo celular es
 - a) 4,5 g/L o superior;
 - b) 6,5 g/L o superior;
 - c) 7 g/L o superior; o
 - d) 7,5 g/L o superior.
6. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el agente tonificante no iónico es un azúcar; opcionalmente un disacárido; además opcionalmente un disacárido seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, maltosa y trehalosa.
7. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 6, en donde el agente tonificante no iónico es sacarosa;
opcionalmente en donde la concentración de sacarosa en el medio de cultivo celular es
 - a) 6,8 g/L o superior;
 - b) 13,7 g/L o superior;
 - c) 29,4 g/L o superior; o
 - d) 41,1 g/L o superior.
8. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular sin suero;
y/o un medio de cultivo celular sin proteínas;

- y/o un medio de cultivo celular seleccionado del grupo que consiste en MEM, DMEM, RPMI, medio F-12 de Ham, medio L-15 de Leibovitz y mezclas de los mismos, estando dicho medio suplementado con uno o más agentes tonificantes no iónicos.
- 5
9. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el medio de cultivo celular consiste esencialmente en DMEM suplementado con uno o más agentes tonificantes no iónicos.
- 10
10. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la célula huésped HeLa comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por repeticiones terminales invertidas de AAV, genes rep y cap, y genes del virus auxiliar.
- 15
11. Un método para producir un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) utilizando un sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10; opcionalmente en donde la célula huésped HeLa se incuba en el medio de cultivo celular durante un período de al menos 2 días; opcionalmente al menos 3 días; y además opcionalmente aproximadamente 4 días.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende además las etapas de recolectar y purificar el rAAV.
- 20
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde el método produce al menos un aumento del 50% en la producción total de rAAV en comparación con la producción a partir de un sistema de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular que tiene una osmolalidad de 266 mOsm/kg.
- 25
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde el método produce al menos una reducción del 50% en la producción total de virus auxiliares en comparación con la producción a partir de un sistema de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular que tiene una osmolalidad de 266 mOsm/kg.
- 30
15. Un método para producir un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) utilizando un virus auxiliar, comprendiendo el método incubar una célula huésped HeLa capaz de producir rAAV en presencia de virus auxiliar durante un período de incubación de al menos 2 días en un medio de cultivo celular que contiene virus auxiliar y un agente tonificante no iónico y que tiene una osmolalidad de 360 mOsm/kg o superior al inicio del período de incubación, y en donde el método produce al menos un aumento del 50% en la producción total de rAAV y una reducción del 20% en la producción total de virus auxiliar en comparación con una célula huésped incubada en un medio con una osmolalidad de 266 mOsm/kg.
- 35

FIG. 1A

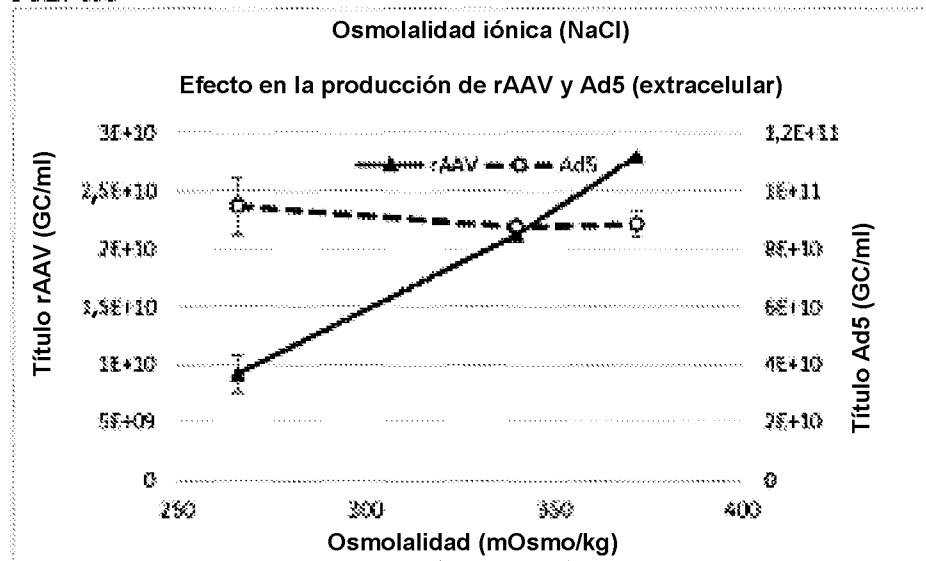


FIG. 1B

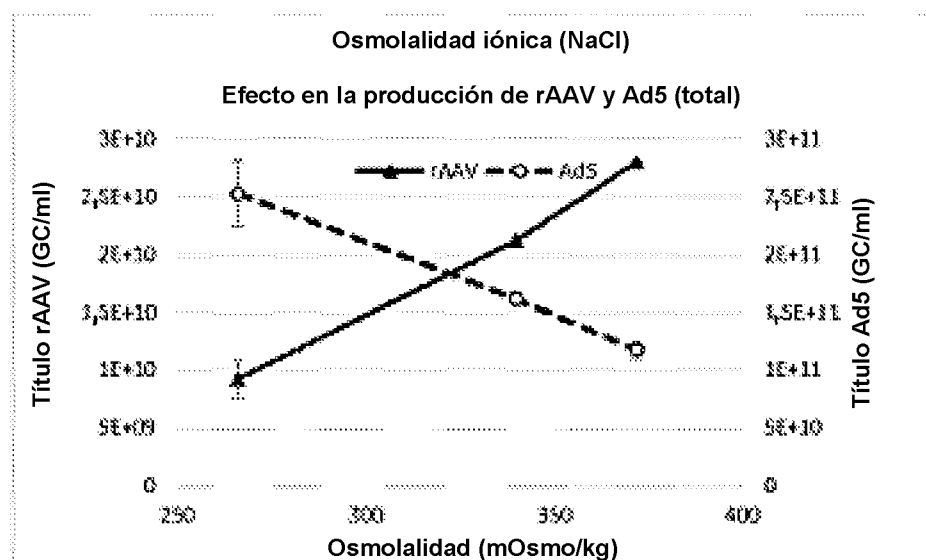


FIG. 2A

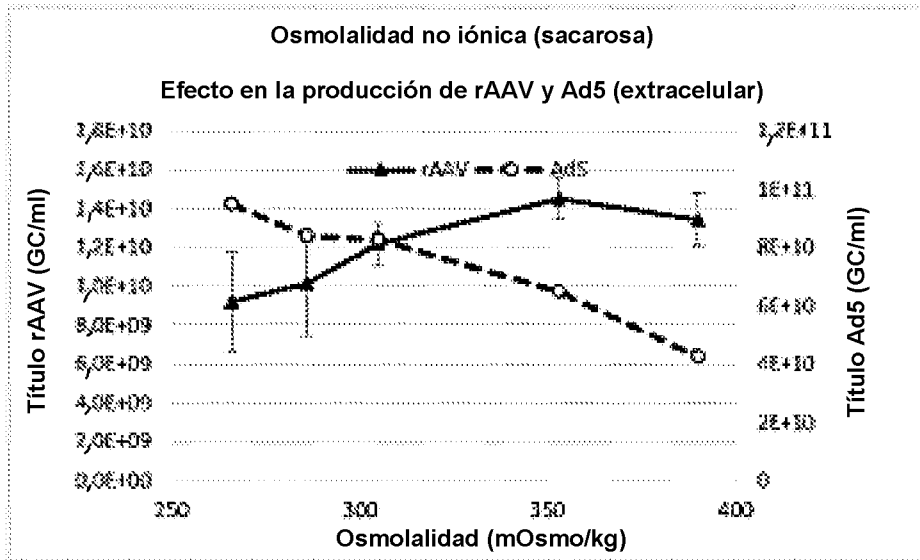


FIG. 2B

