

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 257 861**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.1999 PCT/US1999/09813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.1999 WO9957297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.1999 E 99921681 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **07.09.2016 EP 1078095**

54 Título: **Procedimiento de producción viral**

30 Prioridad:

04.05.1998 US 73076

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
23.03.2017

73 Titular/es:

**CANJI, INC. (100.0%)
3525 John Hopkins Court
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**GIROUX, DANIEL, D.;
GOUDREAU, ANN, M.;
RAMACHANDRA, MURALIDHARA y
SHABRAM, PAUL, W.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción viral

5 **Antecedentes de la invención**

Una variedad de productos de la terapia génica *in vivo* en desarrollo se basa en la administración de un transgen terapéutico mediante vectores virales recombinantes. Un vehículo común para la administración de los transgenes son los adenovirus recombinantes, por lo general los deficientes en la replicación en cualquier otra célula diferente de la línea celular de empaquetamiento específica. Estas líneas celulares de empaquetamiento específicas expresan ciertos genes adenovirales necesarios para la replicación de los virus que se han suprimido en el virus deficiente. Para la producción de adenovirus que contienen deleciones en la región E1, la línea celular utilizada más comúnmente es la línea celular 293. La producción del adenovirus deficiente en la replicación en las células 293 es difícil porque es difícil que la línea celular crezca. Por ejemplo, las células 293 requieren la unión a un sustrato y parecen diferenciarse a una confluencia elevada. Otra limitación es que los adenovirus deficientes en la replicación no replican como los virus de tipo salvaje. Mientras la producción de virus específica para el adenovirus de tipo salvaje en las células 293 es de aproximadamente 80.000 a 100.000 partículas por célula, el adenovirus deficiente en la replicación E1 produce típicamente sólo de 1.000 a 2.000 partículas por célula. Las estimaciones basadas en las evaluaciones actuales de los regímenes de dosificación y en el tamaño del mercado terapéutico, han indicado que será necesaria la producción anual de aproximadamente 10^{18} partículas para satisfacer la demanda de algunos productos de terapia génica. Por lo tanto se requieren mejoras en la producción de adenovirus recombinantes a niveles que satisfagan el mercado anticipado de los productos de terapia génica adenoviral para hacer que esta tecnología sea factible comercialmente.

25 La presente invención describe un procedimiento basado en un microvehículo para la producción de vectores virales en líneas celulares de empaquetamiento que dependen del anclaje, lo que permite una producción eficaz en el coste de productos de la terapia génica adenoviral suficiente para satisfacer la demanda de mercado proyectada. La presente invención describe un procedimiento de producción escalable que produce más de 2×10^{15} partículas virales en un biorreactor de 5 litros. Este procedimiento es completamente escalable para la obtención de las 10^{18} partículas proyectadas por año con un biorreactor tan pequeño como columnas de purificación de 100 litros y de 5 litros.

Sumario de la invención

35 La presente invención se dirige a un procedimiento para la producción de vectores virales recombinantes a títulos elevados que incorporan una variedad de progresos importantes de la técnica. El procedimiento de la presente invención incorpora las características múltiples que proporcionan la producción incrementada de virus, particularmente los virus que codifican los transgenes exógenos. El procedimiento ilustrado específicamente describe un procedimiento para la producción de medio libre de suero de título elevado de los adenovirus defectuosos en la replicación recombinante que contienen un transgen exógeno. La presente invención proporciona procedimientos para la preparación de microvehículos, procedimientos para la siembra de biorreactores a una densidad celular elevada, para incrementar la infectividad de las células productoras a los virus, procedimientos para incrementar el rendimiento de producto a través de la sincronización del ciclo celular de las células productoras y procedimientos para minimizar los efectos perjudiciales de los genes transgénicos. La presente invención proporciona además células productoras preparadas mediante el procedimiento de la presente invención. La presente invención proporciona además los virus producidos según el procedimiento.

Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 es una representación fotográfica de los microvehículos recubiertos con células examinadas bajo microscopio óptico. El panel A representa los microvehículos confluentes que poseen aproximadamente 10^6 células/ml o un promedio aproximadamente de 23 células por microvehículo. El panel B demuestra los resultados de la superconcentración de las células en los microvehículos de aproximadamente 10^7 células/ml o un promedio de aproximadamente 230 células por microvehículo.

55 La Figura 2 es una representación gráfica de los niveles de producción de partículas virales de ACN53 producidas mediante el procedimiento descrito en los Ejemplos 1 a 5 en la presente memoria. El eje vertical representa el número total de partículas virales en el biorreactor. El eje horizontal representa el tiempo posterior a la infección en horas. En este ejemplo 5×10^6 células/ml se infectaron con los virus resultando en la producción de aproximadamente 12.800 partículas virales ACN53 por célula.

60 La Figura 3 es una representación gráfica de la producción del virus ACN-Rb110 sustancialmente tal como se describe en los Ejemplos 1 a 5 de la presente memoria. El eje vertical representa el número total de partículas virales. El eje horizontal representa el tiempo posterior a la infección en horas. Estos datos demuestran la producción de aproximadamente 39.000 partículas virales ACN-Rb110 por célula.

Descripción detallada de la invención

La producción de virus mediante el cultivo de células de mamífero depende de una variedad de factores. Según se describe a continuación, se puede utilizar una variedad de técnicas para mejorar la producción de virus dentro de una célula productora dada, tales como la sincronización de las células productoras, el aumento de la infectividad de las células productoras y la supresión de los efectos de los transgenes durante el cultivo. Aunque es teóricamente factible producir grandes cantidades de partículas virales mediante la expansión de la escala de la instalación de la producción o mediante la repetición de procedimientos de bajo rendimiento, estos factores se combinan para vencer la utilidad comercial de tales enfoques. En consecuencia, la eficacia total del procedimiento en un volumen dado depende, en gran parte, de la concentración de células que se pueden mantener eficazmente en un volumen dado del medio. Si uno puede conseguir una concentración elevada de células productoras viables en un volumen dado, combinada con una producción elevada de virus intracelulares, se mejora la eficacia total del procedimiento para hacer que el procedimiento sea económico.

I. Alcanzar una densidad celular elevada en un reactor basado en un microvehículo:

La presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de una densidad celular superior a 5×10^6 células productoras/ml en un procedimiento de biorreactor basado en un microvehículo para la producción de un virus en una célula productora, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

a) preparar un cultivo de células productoras unidas a microvehículos en los que la proporción de células productoras a microvehículos sea de 10 células/microvehículo.

b) sembrar el biorreactor con una cantidad de microvehículos recubiertos con células productoras preparadas en la etapa (a) hasta una densidad superior a aproximadamente 6 gramos (basado en el peso seco del microvehículo) de los microvehículos recubiertos de células productoras por litro de volumen del medio de biorreactor; y

c) cultivar las células productoras en el biorreactor bajo condiciones de perfusión en un medio que contiene suero hasta una densidad superior a 100 células/microvehículo, en el que el virus producido por el procedimiento es seleccionado de entre baculoviridae, parvoviridae, picornaviridae, herpesviridae, poxviridae, o adenoviridae.

Biorreactor:

El término "biorreactor" se refiere a un dispositivo para el cultivo celular que contiene un recipiente en el que se mantiene el cultivo celular. El diseño del biorreactor debería asegurar la esterilidad y proporcionar confinamiento de la célula productora y del virus construidos genéticamente. Se dispone comercialmente de una variedad de biorreactores para el cultivo de células productoras dependientes del anclaje y de cultivos en suspensión y son bien conocidos por los expertos en la materia y se pueden adaptar fácilmente a la forma de realización de la presente invención. Los biorreactores están provistos preferentemente de un sistema de agitación para mantener el contenido uniformemente mezclado y para facilitar la transferencia de oxígeno. Preferentemente, el biorreactor comprende sensores que permiten la monitorización y manipulación de tantos parámetros de proceso como sea posible (temperatura, pH, oxígeno disuelto) de forma que estos parámetros se puedan mantener dentro de los intervalos óptimos para el crecimiento celular. En una forma de realización preferida de la presente invención un biorreactor contiene un aparato para oxigenar el medio que está separado del lecho del microvehículo. Un biorreactor útil preferido en la forma de realización de la presente invención es el biorreactor CelliGen Plus[®] provisto del rotor Cell-Lift[®] para una cizalladura baja y una oxigenación elevada en los cultivos de microvehículos disponibles comercialmente en New Brunswick Scientific Company, Inc., 44 Talmadge Road, Edison, New Jersey, USA, 08818-4005. Se pueden utilizar ciertas modificaciones, tales como el tubo de sedimentación celular o la columna decantadora, para facilitar la manipulación del cultivo (disponible comercialmente en New Brunswick Scientific).

Virus y vectores virales

Los términos virus y vector(es) se utilizan de forma intercambiable en la presente memoria. Los términos "partículas" o "partículas virales" se refieren a viriones o envueltas en los que se empaqueta el genoma viral. Los virus que se van a producir según la forma de realización de la presente invención incluyen virus de ADN y ARN envueltos o no envueltos modificados recombinantemente, preferentemente seleccionados de entre baculoviridae, parvoviridae, picornaviridae, herpesviridae, poxviridae, adenoviridae o picornaviridae. Los virus pueden ser virus que están presentes en la naturaleza o sus genomas virales se pueden modificar mediante técnicas de ADN recombinantes para incluir la expresión de transgenes exógenos y se pueden construir para ser deficientes en la replicación, replicar condicionalmente o replicar competentemente. Los vectores híbridos que explotan elementos ventajosos de cada una de las propiedades del vector genitor (ver, por ejemplo, Feng, *et al.*, (1997) Nature Biotechnology 15:866-870) se pueden producir asimismo mediante los procedimientos descritos en la presente memoria. Los sistemas de vector mínimo en los que el esqueleto viral contiene solo las secuencias necesarias para el empaquetamiento del

vector viral y pueden incluir opcionalmente un casete de expresión transgénico se pueden producir asimismo según la forma de realización de la presente invención. La presente invención es particularmente útil en la preparación de los virus que se derivan de genomas adenovirales y virales adeno-asociados. En la forma de realización más preferida de la presente invención, los vectores que se van a producir son vectores no competentes en la replicación derivados del genoma de adenovirus humano. En la forma de realización más preferida de la presente invención, los vectores que se van a producir son vectores deficientes en la replicación o adenovirales replicantes condicionalmente. En la forma de realización más preferida de la presente invención según se ejemplifica en la presente memoria, los vectores que se van a producir son vectores adenovirales deficientes en la replicación (E1 defectuoso/suprimido) que codifican un casete de expresión para el gen supresor de tumor exógeno en una célula infectada por el vector.

Los vectores virales replicantes condicionalmente se utilizan para la obtención de una expresión selectiva en tipos de células particulares mientras evitan una infección adversa de amplio espectro. Ejemplos de vectores replicantes condicionalmente se describen en Bischoff, *et al.*, (1996) *Science* 274:373-376; Pennisi, E. (1996) *Science* 274:342-343; Russell, S.J. (1994) *Eur. J. of Cancer* 30A(8):1165-1171. Además, el genoma viral se puede modificar para incluir los promotores inducibles que logran la replicación o expresión del transgen sólo bajo ciertas condiciones. Se conocen en la literatura científica ejemplos de promotores inducibles (ver, por ejemplo, Yoshida y Hamada (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 230:426-430; Iida, *et al.*, (1996) *J. Virol.* 70(9):6054-6059; Hwang, *et al.*, (1997) *J. Virol.* 71(9):7128-7131; Lee, *et al.*, (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17(9):5097-5105; y Dreher, *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272(46):29364-29371. El transgen puede asimismo estar bajo control de una región promotora específica de tejido que permita la expresión del transgen sólo en tipos de células particulares.

Puede ser valioso en algunos casos utilizar virus que efectúen la expresión del transgen en un tipo de célula particular. Ciertos vectores presentan un tropismo natural para ciertos tipos de tejido. Por ejemplo, los vectores derivados del género herpesviridae han mostrado que poseen una infección preferencial de las células neuronales. Ejemplos de vectores herpesviridae modificados recombinantemente se describen en la patente US nº 5.328.688 publicada el 12 de julio de 1994. La especificidad del tipo celular o la elección del tipo celular se puede conseguir asimismo en vectores derivados de virus que poseen de forma característica infectividades amplias mediante la modificación de las proteínas de envuelta virales. Por ejemplo, la elección celular se ha conseguido con vectores de adenovirus mediante la modificación selectiva de la protuberancia y fibra del genoma viral que codifican las secuencias para la obtención de la expresión de los dominios de protuberancia y fibra modificados que poseen una interacción específica con receptores de superficie celular únicos. Ejemplos de tales modificaciones se describen en Wickham, *et al.*, (1997) *J. Virol.* 71(11):8221-8229 (incorporación de péptidos RGD en proteínas de fibra adenovirales); Arnberg, *et al.*, (1997) *Virology* 227:239-244 (modificación de los genes de fibra adenovirales para la obtención de tropismo en el ojo y en el tracto genital); Harris y Lemoine (1996) *TIG* 12(10):400-405; Stevenson, *et al.*, (1997) *J. Virol.* 71(6):4782-4790; Michael, *et al.*, (1995) *Gene Therapy* 2:660-668 (incorporación de un fragmento de péptido liberador de gastrina en la proteína de la fibra del adenovirus); y Ohno, *et al.*, (1997) *Nature Biotechnology* 15:763-767 (incorporación del dominio de unión de la proteína A-IgG en el virus Sindbis). Se han logrado otros procedimientos de elección específica celular mediante la conjugación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para las proteínas de la envoltura (ver, por ejemplo, Michael, *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.* 268:6866-6869; Watkins, *et al.*, (1997) *Gene Therapy* 4:1004-1012; Douglas, *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14:1574-1578. De forma alternativa, las mitades particulares se pueden conjugar con la superficie viral para la obtención de la elección (ver, por ejemplo, Nilson, *et al.*, (1996) *Gene Therapy* 3:280-286 (conjugación de EGF con proteínas retrovirales). Estos vectores modificados recombinantemente se pueden producir según la forma de realización de la presente invención.

En la forma de realización preferida de la presente invención, el virus que se va a producir se deriva del género adenoviridae. Los virus particularmente preferidos se derivan del adenovirus humano del tipo 2 o del tipo 5. Tales virus son preferentemente deficientes en la replicación mediante modificaciones o supresiones en las regiones codificadoras E1a y/o E1b. Se prefieren otras modificaciones en el genoma viral para la obtención de características de expresión particulares o para permitir la administración repetitiva o disminuir la respuesta inmune. Son más preferidos los adenovirus recombinantes que poseen deleciones completas o parciales de la región codificadora E4, que retienen opcionalmente E4orf6 y E4orf6/7. La secuencia codificadora E3 se puede suprimir pero es preferible retenerla. En particular, se prefiere que la región operadora promotora de E3 se modifique para incrementar la expresión de E3 para la obtención de un perfil inmunológico favorable para los vectores terapéuticos. Más preferidos son los vectores de tipo 5 adenovirales humanos que contienen una secuencia de ADN que codifica p53 bajo el control de la región promotora del citomegalovirus y la secuencia guía tripartita que posee E3 bajo control del promotor CMV y la deleción de las regiones codificadoras E4 mientras retienen E4orf6 y E4orf6/7. En una forma de realización más preferida de la presente invención según se ejemplifica en la presente memoria, el vector es ACN53, según se describe en Wills, *et al.*, (1994) *Human Gene Therapy* 5:1079-1088.

Células productoras:

El término “célula productora” se utiliza en la presente memoria para describir una línea celular de empaquetamiento viral que depende del anclaje. Las células dependientes del anclaje, o cultivos derivados de las mismas, son las que crecerán, sobrevivirán, o mantendrán la función óptimamente cuando se unan a una superficie tal como vidrio o plástico. La utilización de este término no implica que las células sean normales o que sean o no transformadas neoplásicamente. Dependiendo de la naturaleza del virus que se va a propagar, el genoma de la línea celular se puede modificar para complementar delecciones en el genoma viral utilizado como vector. Cuando el vector es competente en la replicación, cualquiera de las líneas celulares que dependen del anclaje comúnmente utilizadas para el cultivo de células de mamífero se pueden utilizar como líneas celulares de empaquetamiento viral. Ejemplos de tales líneas celulares dependientes del anclaje comúnmente utilizadas como líneas celulares de empaquetamiento de vector viral son HeLa o células 293 (Graham y Smiley (1997) J. Gen. Virol. 36:59-72), y células PERC.6 (según se ha descrito en la publicación del documento WO/97/00326, serie de solicitud nº PCT/NL96/00244).

En algunas aplicaciones, particularmente cuando el virus se va a utilizar para aplicaciones de la terapia génica, es preferible que el vector sea deficiente en la replicación (o defectuoso en la replicación) para evitar la proliferación no controlada del virus en el individuo que se va a tratar. En tales circunstancias, se seleccionan las líneas celulares de mamífero que se hayan construido, mediante modificación del genoma de células productoras para codificar funciones virales esenciales o mediante la coinfección de la célula productora con un virus auxiliar, para expresar las proteínas que complementan el efecto de las secuencias suprimidas del genoma viral.

En el caso en que el virus que se va a producir sea un adenovirus recombinante que produce deficiencia en la replicación mediante la supresión de las funciones E1a y/o E1b se prefiere particularmente la línea celular 293 debido a su habilidad para complementar la función E1a y E1b adenoviral. Sin embargo, las células 293 se pueden utilizar asimismo para la expresión de los adenovirus replicantes de forma competente o condicional en la replicación. Ejemplos de otras líneas celulares que se pueden utilizar para la producción de adenovirus defectuosos E1 son las células PERC.6 (disponibles en IntroGene, b.v., P.O. Box 2048, Leiden, Holanda) que codifican E1 en trans y se ha demostrado que poseen una unión excelente a una superficie de microvehículo.

Transgenes:

Los vectores recombinantes que se van a producir mediante los procedimientos de la presente invención pueden contener opcionalmente un casete de expresión de transgen. El término “casete de expresión” se utiliza en la presente memoria para definir una secuencia de nucleótido (ADN o ARN) que contiene elementos reguladores y una secuencia codificadora de transgen de forma que efectúe la expresión del transgen en la célula objetivo. Los elementos reguladores incluyen promotores, potenciadores, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc. El término “transgen” comprende no sólo la secuencia que codifica las proteínas de tipo salvaje y las variaciones alélicas sino también las secuencias de proteínas homólogas de otros organismos, además de cualquier mutación o truncamiento, las mismas que expresan la misma función esencialmente como la secuencia de polinucleótido o proteína de tipo salvaje. Los ejemplos de transgenes que se pueden incluir en tales vectores incluyen genes supresores de tumores, inhibidores de cinasa dependientes de la ciclina, genes citotóxicos, genes citostáticos, genes proapoptóticos, genes activadores de profármaco, antígenos específicos de tumores, o secuencias híbridas. La expresión “genes supresores de tumores (TSG)” se refiere a los genes que cuando se expresan en una célula objetivo, son capaces de suprimir el fenotipo neoplásico. Ejemplos de antígenos específicos de tumores incluyen MART1 y gp100 (Zhai, *et al.*, (1997) J. immunotherapy 20:15-25). Ejemplos de genes supresores de tumores incluyen el gen Rb de retinoblastoma y sus variantes Rb110 y Rb56, el gen MMAC-1, el gen p53, el gen DCC, el gen NF-1, los genes erbA y erbB, p33 y p73. La expresión “inhibidores de cinasa dependiente de ciclina” comprende los genes p27kip, p57kip2, p15ink4b, p18ink4c, p19ink4d, p16ink4a y p21sd1-1. El término “genes citotóxicos” se refiere a los genes que se diseñan para poseer un efecto tóxico en la célula objetivo, solos o en conjunción con los agentes químicos exógenos (por ejemplo, genes activadores de profármaco). Ejemplos de tales genes citotóxicos incluyen secuencias de ADN que codifican los dominios citotóxicos de la ricina, de la difteria, o de la exotoxina pseudomonas además del gen de adenovirus E311.6, adenovirus E1a. Ejemplos de genes activadores de profármaco incluyen los genes de cinasa timidina y citosina desaminasa. Los genes proapoptóticos incluyen los genes p53 y de la ruta p53 (por ejemplo, bax, bid, caspasas, citocromo c, etc) y adenovirus E4orf4. Ejemplos de otros transgenes terapéuticos que se pueden incluir en los vectores que se van a producir mediante la forma de realización de la presente invención incluyen interferones (alfa, beta, gamma y consenso), proteínas de fusión de α 2b E2F-Rb de interferón, interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-10), dopamina, serotonina, GABA, ACTH y NGF.

Microvehículo(s):

La mayoría de células animales utilizadas en la producción de virus dependen del anclaje y requieren la unión a una superficie para un crecimiento óptimo. En 1967 Van Wezel describió la utilización de partículas pequeñas (0,2 mm), microvehículos, para el crecimiento de células que dependían del anclaje. Estos microvehículos se suspenden en el medio de cultivo mediante agitación suave de forma que se obtenga un entorno homogéneo. Puesto que las células se localizan sobre la superficie, están sometidas a tensión mecánica y se deben tomar precauciones para evitar el

cizallamiento de las células de la superficie durante el cultivo. Los gránulos macroporosos en los que las células que dependen del anclaje tienen la posibilidad de utilizar la superficie interior se pueden utilizar asimismo para reducir la posibilidad que las fuerzas de cizalladura puedan romper las células que se van a cultivar. Sin embargo, tales microvehículos limitan el área de superficie disponible para la infección viral de forma que se deberían ajustar los parámetros de infección viral. Los microvehículos se han realizado en materiales sintéticos diferentes que incluyen dextrano. La unión celular a estos microvehículos cargados está mediada por atracciones iónicas. Muchos tipos de células poseen una proteína de superficie celular, fibronectina, que posee una unión bioespecífica con la gelatina facilitando la utilización de los microvehículos recubiertos de gelatina. Una ventaja de la utilización de la gelatina es su susceptibilidad a la degradación con enzimas proteolíticas, lo que permite la liberación de las células desde los microvehículos con casi 100% de viabilidad mediante la disolución de la matriz de gelatina con tripsina.

En la forma de realización preferida de la presente invención, los microvehículos son microvehículos Cytodex® disponibles comercialmente en Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia. Los microvehículos Cytodex® se basan en los gránulos de dextrano reticulados. Los gránulos son transparentes, esféricos e hidratados y se sustituyen con grupos cargados positivamente. Los microvehículos poseen un diámetro medio de aproximadamente 200 µm y una densidad de 1,03 g/cm³. Se ha derivatizado Cytodex® para formar tres tipos; Cytodex® 3 está recubierto con colágeno. En la forma de realización preferida de la presente invención según se muestra a título de ejemplo en la presente memoria, el microvehículo es Cytodex® 1.

Unión de las células a la superficie del microvehículo:

Se produce un cultivo de células productoras unidas a microvehículos cuando los microvehículos se ponen en contacto con las células productoras en un medio que contiene suero y se someten a las condiciones que permiten el crecimiento. Las células crecen en presencia de los microvehículos y producen nuevas células hijas, que se transfieren a la superficie del microvehículo expuesta mediante la agitación del cultivo. Tras la finalización del procedimiento descrito, las células se concentran hasta una densidad elevada superior a 100 células por microvehículo. Esta concentración elevada de células en el microvehículo facilita el nivel elevado de producción del virus.

Se puede utilizar una variedad de procedimientos para la obtención de una densidad celular elevada y facilitar la unión de células hijas a los microvehículos. Las condiciones se deberían diseñar para asegurar la transferencia eficaz de las células hijas a la superficie del microvehículo sin sacar la célula genitora de las superficies del microvehículo. En la situación en la que existe una cantidad inicial baja de células productoras, las células se pueden microtriturar a partir de los microvehículos pasando los microvehículos recubiertos a través de un orificio a una presión baja (aproximadamente 20 psi). Las células separadas se pueden utilizar a continuación para sembrar uniformemente un número superior de microvehículos. De forma alternativa, uno puede sembrar el biorreactor directamente con una gran cantidad de células. Alternativamente, uno puede introducir los microvehículos en un matraz que contiene el medio. Los microvehículos se hundirán hacia el fondo del matraz y las células se introducen en el matraz que se hundirán y se unirán asimismo a la superficie del microvehículo. La agitación ligera facilita el procedimiento de unión. La concentración de las células sobre la superficie de los microvehículos se puede determinar fácilmente mediante microscopía óptica.

A medida que el cultivo celular se expande, es necesario monitorizar y controlar los parámetros de cultivo tales como la concentración de oxígeno disuelto, pH, temperatura y agitación. El pH se debería monitorizar mediante el procedimiento de crecimiento celular para asegurar las condiciones óptimas para la replicación celular. A medida que las células crecen, los metabolitos se liberan en el medio, un procedimiento que puede cambiar el pH del medio. Por lo tanto, el pH del medio se debería monitorizar atentamente y ajustar mediante la adición de una base o de un ácido para mantener un pH relativamente constante. El pH preciso que facilita el crecimiento óptimo variará algo con la línea celular particular, pero generalmente está en el intervalo del pH fisiológico. Se prefiere que para las células 293 el pH para el cultivo celular se mantenga en el intervalo de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, más preferentemente desde aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 8, más preferentemente desde aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 7,5, más preferentemente de aproximadamente pH 7,2.

La temperatura es otro parámetro físico que se va a monitorizar y a controlar. La temperatura en el cultivo celular se debería estabilizar asimismo a la temperatura del crecimiento óptimo de la línea celular para la obtención de una densidad celular elevada. Las células de mamífero poseen una temperatura óptima para el crecimiento. Si crece a una temperatura inferior a la mínima, el crecimiento celular sucede lentamente. Por otro lado, si la temperatura de crecimiento es demasiado elevada, puede producirse la muerte celular. En la forma de realización preferida de la presente invención, cuando la línea celular productora es la línea celular 293, la temperatura se debería mantener aproximadamente por debajo de 40°C, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 38°C, más preferentemente a aproximadamente 37°C.

Siembra:

5 El término "siembra" según se describe en la presente memoria describe la introducción de las células productoras en el volumen de lecho del microvehículo. Los microvehículos recubiertos preparados según el Ejemplo 1, a continuación, se introducen después en el biorreactor. El biorreactor se "siembra" con una cantidad de microvehículos recubiertos de aproximadamente 6 gramos (basado en el peso seco del microvehículo) de microvehículos recubiertos por litro de volumen del biorreactor. Esto es sustancialmente mayor que el volumen recomendado para la siembra de microvehículos en un volumen dado. La convención en la técnica es que los microvehículos recubiertos no deberían ocupar un volumen superior a aproximadamente 5% del recipiente/volumen del medio, es decir, aproximadamente 2 gramos (basado en el peso seco del microvehículo) de microvehículos recubiertos por litro del medio/volumen del recipiente. En la forma de realización de la presente invención, es aproximadamente 10 gramos (basado en el peso seco del microvehículo) el volumen de microvehículos recubiertos depositados lo que comprende aproximadamente 20% del volumen del recipiente. Esta concentración elevada de microvehículos contribuye a una densidad celular elevada en el cultivo final del virus recombinante e incrementa el rendimiento viral. Para la obtención de rendimientos elevados en la forma de realización de la presente invención, la concentración de los microvehículos recubiertos debería ser aproximadamente de 6 a 25 gramos (basado en el peso seco del microvehículo) por litro del volumen de reacción, preferentemente de 6 a 15 gramos, y más preferentemente aproximadamente 10 gramos (basado en el peso seco del microvehículo) por litro de volumen de reacción.

20

Células que crecen en el medio que contiene suero hasta una densidad celular elevada:

25 Las células crecen a continuación en el biorreactor bajo condiciones de perfusión. El cultivo de células de mamífero bajo condiciones de perfusión es bien conocido en la técnica. Sin embargo, se debería indicar que ciertos parámetros se deberían optimizar para la obtención de un crecimiento celular máximo. Por ejemplo, es necesario monitorizar el contenido de oxígeno durante todo el cultivo. A causa de que el oxígeno es soluble en agua de forma moderada (8,4 mg/l a 25°C), se debe suministrar continuamente al cultivo en crecimiento en forma de aire esterilizado o de oxígeno puro. La concentración de oxígeno disuelto se debería mantener en el intervalo de aproximadamente 5% a aproximadamente 200%, preferentemente desde 50% a aproximadamente 120%, más preferentemente a aproximadamente 100%. La concentración de oxígeno disuelto se define según el punto en el que el 100% de oxígeno disuelto representa la concentración de oxígeno disuelto en el medio en equilibrio con el aire. La concentración de oxígeno se puede medir por medios convencionales tales como las sondas de monitorización de oxígeno disuelto disponibles comercialmente en Instech Laboratories, Inc. 5209 Militia Hill Road, Plymouth Meeting PA 19462-1216 o en Lazar Research Laboratories, Los Angeles, CA.

35

40 La agitación adecuada del cultivo del biorreactor es esencial para asegurar un suministro adecuado de nutrientes y para prevenir la acumulación de metabolitos tóxicos dentro del biorreactor. La agitación del medio afecta asimismo a la velocidad de transferencia del oxígeno. La agitación excesiva puede causar daño mecánico a las células de mamífero. Se debería evitar la espuma ya que el burbujeo asociado con el proceso de la espuma puede generar suficientes fuerzas de cizalladura dentro del cultivo para resultar en el desplazamiento de las células de la superficie del microvehículo o lisis de las células. Por lo tanto, se debe mantener un equilibrio entre la necesidad de proporcionar un buen mezclado y la necesidad de evitar el daño celular. En la forma de realización preferida de la presente invención, según se muestra a título de ejemplo en la presente memoria, se mantiene una agitación aproximadamente de 70 rpm utilizando un biorreactor CelliGen Plus de 5 litros. Para minimizar el espumado, el medio se separa de las células y se oxigena antes de la reintroducción a las células mediante la utilización de un dispositivo de burbujeo en el biorreactor.

45

II. Producción de partículas virales en la línea celular de empaquetamiento:

El procedimiento de la presente invención proporciona además un procedimiento para la producción de una población de células productoras que contienen una concentración elevada de partículas virales en un biorreactor basado en un microvehículo en un medio libre de suero, comprendiendo dicho procedimiento el proceso descrito anteriormente y que comprende además las etapas siguientes:

d) eliminar el medio que contiene el suero;

e) sincronizar las células productoras en la fase G1;

f) infectar las células productoras con un virus;

g) cultivar las células bajo condiciones que permitan la replicación viral hasta que se consiga un punto máximo.

Para preparar el biorreactor para la introducción de medio libre de suero, en primer lugar se permite que cese la agitación en el biorreactor. Los gránulos del microvehículo a continuación precipitarán en la suspensión y sedimentarán en el fondo del volumen del reactor, lo que permite que se drene el medio que contiene el suero. A continuación se lavan los gránulos con medio libre de suero para minimizar el porcentaje del medio que contiene el suero. El lavado se lleva a cabo mediante la restitución de la suspensión del microvehículo a su volumen original con medio libre de suero y logrando la suspensión completa de los microvehículos mediante la agitación suficiente. Este medio se drena a continuación según se ha descrito anteriormente. Esta etapa de lavado se puede repetir para la obtención de la eliminación máxima del medio que contiene el suero.

Se añade a las células el medio libre de suero en una cantidad suficiente para sustentar el cultivo celular durante la infección. El medio libre de suero se define como el medio de crecimiento para el cultivo celular animal sustancialmente libre de suero derivado de animal. El medio libre de suero se conoce bien en la técnica (ver, por ejemplo, Freshney, R.I. Culture of Mammalian Cells, 1983, págs. 76-77. Alan R. Liss Company, Nueva York). El medio libre de suero simple se puede complementar con factores adicionales suficientes para posibilitar el crecimiento de las células. De forma alternativa, el medio libre de suero completo suficiente para sustentar el crecimiento de las células de mamífero está disponible comercialmente a partir de una variedad de suministradores comerciales. Ejemplos de medio libre de suero preferidos incluyen medio libre de suero JRH Ex-Cell 525 (número de catálogo 61129-79P), medio libre de suero CellGro (disponible comercialmente en Gibco-BRL Life Sciences, Gaithersburg Maryland, USA), medio libre de suero HyClone (#A-1111-L) disponible comercialmente en HyClone.

Aditivos del medio:

El medio libre de suero se complementa frecuentemente con una o más hormonas tales como la insulina, la transferrina, el factor de crecimiento epidérmico, la hidrocortisona, etc. El medio libre de suero se puede potenciar asimismo con agentes adicionales para facilitar el crecimiento de las células y puede depender de la línea celular utilizada en el virus que se va a producir. Por ejemplo, el medio se puede potenciar con TGF-beta o agentes que sobrerregulen el factor de crecimiento de transformación endógeno (TGF)-beta en la célula. Alternativamente, se pueden añadir al cultivo agentes que sobrerregulan o estabilizan los receptores de unión virales, tales como las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$, para mejorar la eficacia de la infección. En la forma de realización más preferida de la presente invención según se muestra a título de ejemplo en la presente memoria, el medio libre de suero es el medio Eagle modificado de Dulbecco Biowhittaker #12-604-F (DMEM) que contiene 1% de CMF-1 (Applied Nutrient Sciences, Sorrento Valley, CA).

Supresión de los transgenes perjudiciales:

En el caso en que el virus recombinante utilice un promotor muy fuerte (por ejemplo CMV) para la expresión del transgen, la producción de proteína recombinante empezará a competir con las fuentes necesarias para la replicación viral óptima. En consecuencia, puede ser ventajoso añadir elementos al medio libre de suero que infrarregulen o inhiban el promotor transgénico. Por ejemplo, cuando el promotor transgénico es el promotor temprano de citomegalovirus (CMV), se pueden añadir elementos tales como la neuramidasa o la tunicamicina para suprimir el promotor CMV durante el cultivo.

En segundo lugar, se conoce que los transgenes terapéuticos particulares pueden poseer un efecto negativo sobre la célula productora. Por ejemplo, los genes supresores de tumores tales como p53 se sabe que inducen la apoptosis en células normales con dosificación celular suficiente. En consecuencia, los virus que expresan tales transgenes son particularmente difíciles de cultivar en una densidad elevada. Por ejemplo, una comparación de los rendimientos a partir de la forma de realización de la presente invención representada en las figuras 2 y 3 demuestra el rendimiento viral significativamente inferior como resultado de la expresión del gen supresor del tumor p53. La presente invención proporciona un procedimiento para minimizar el efecto negativo de un transgen tóxico a la célula productora mediante la adición de un agente al medio de cultivo en una concentración suficiente para inhibir el

promotor que impulsa el transgen. El agente que se va añadir dependerá del promotor utilizado para impulsar la expresión de transgen pero no debería interferir materialmente con la expresión de genes virales esenciales para la replicación viral. Por ejemplo, el promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus es un promotor utilizado comúnmente para impulsar la expresión del transgen. Este promotor contiene sitios de unión para el factor de transcripción NF- κ B y requiere la forma activada de NF- κ B para su actividad. Ver, por ejemplo, Bellas, et al., (1995) J. Clinical Investigations 96: 2521-27 y Loser, et al., (1998) J. Virology 72:180-190. En presencia de compuestos que inhiben la activación de NF- κ B, tales como N-acetil-L-cisteína o pentoxifilina, la actividad del promotor CMV se puede reprimir a niveles de fondo (Bellas, et al. *supra*). De este modo la represión transitoria del promotor CMV mediante la adición de tales agentes a los cultivos durante la fase de producción de los virus recombinantes, que codifican los transgenes citotóxicos/citostáticos que impulsan el promotor CMV, mejorará el rendimiento de tales virus. Las concentraciones eficaces de N-acetil-L-cisteína y pentoxifilina son aproximadamente de 10 a 30 mM y de 0,5 a 3,0 mM, respectivamente. De forma similar, los inhibidores de la actividad de NF- κ B son útiles para evitar la expresión de transgen en situaciones en las que el VIH-1-LTR se utiliza para impulsar la expresión del transgen (Mhashikar, et al., J. Virology 71:6486-6494). Se conocen en la técnica ejemplos de agentes capaces de suprimir la acción de otros promotores y sus intervalos de concentración eficaces y se pueden sustituir en la forma de realización de la presente invención.

En el caso en que el transgen citotóxico/citostático esté bajo el control de un promotor activo en sólo (o principalmente) un tipo de célula particular, se prefiere que se utilice una línea celular productora en la que esté inactivo el promotor específico de la célula (o del tejido). Por ejemplo, cuando el promotor es activo sólo en células de hígado (ver, por ejemplo, promotor α -fetoproteína (Huber et al., PNAS 88:8039-8043)) la línea celular productora preferentemente no se deriva de una línea celular de hígado. Además, en el caso de los promotores inducibles según se han descrito anteriormente, se prefiere que se mantengan las condiciones de cultivo (composición química, temperatura, etc) de forma que se evite la expresión del transgen a partir del promotor inducible.

Será evidente para los expertos en la materia que el procedimiento anterior para suprimir el efecto del transgen se pueda aplicar a cualquier procedimiento para el cultivo de célula eucariótica incluyendo pero no limitándose al cultivo basado en microvehículo, cultivo en suspensión, cultivo giratorio, y el denominado cultivo de células en "botella en rotación".

Sincronización:

Para la obtención de un rendimiento máximo, se prefiere que las células se sincronicen en la fase G1 con el virus recombinante antes de la infección. Manteniendo las células en la fase G1, se preparan óptimamente para ser empujadas a la fase S, en la que en primer lugar ocurre la síntesis de ácido nucleico. Sincronizando las células, uno consigue el pico de la producción viral intracelular. En ausencia de la sincronización, la subpoblación de células productoras avanzadas en el ciclo celular experimentará la lisis celular viral antes del punto de cosecha óptimo. Estos viriones, que se arrojan al sobrenadante del biorreactor, se perderán tras el cultivo celular. De forma similar, las células que se quedan atrás en la fase G1 no alcanzarán las concentraciones virales óptimas en el tiempo de la cosecha.

De forma alternativa, otro mecanismo para mejorar la producción de virus mediante la sincronización de las células productoras es la estabilidad del virus o la infección posterior de ADN viral no encapsidada. Se ha mostrado, por ejemplo, que los retrovirus poseen una vida media de 4 a 6 horas posteriores a la infección y que las velocidades de infección más elevadas se observan cuando las células se sincronizan. Andreadis, et al., (1997) J. Virol. 71:7541-8; Andreadis, et al., (1998) Biotechnology and Bioengineering 58:272-281; Andreadis, et al., (1996) J. Theor. Biol. 182:1-20.

Se pueden utilizar una variedad de medios para sincronizar las células en la fase G1. Mantener las células productoras en el medio libre de suero sincronizará las células en la fase G0/G1. Óptimamente, uno mantiene las células en el medio libre de suero durante aproximadamente un tercio del ciclo celular (aproximadamente 6 a 8 horas) para sincronizar completamente las células. De forma alternativa, se pueden añadir agentes que sincronicen las células. Ejemplos de tales agentes incluyen la TGF-beta que produce la detención del ciclo celular en la interfase G1/S. De forma similar, los inhibidores de la fosfatidilinositol 3-cinasa (por ejemplo, la wortmanina y la LY294002 (Eli Lilly and Company)) bloquearán las células en la fase G1. Bacqueville, et al., (1998) Biochem. Biophys. Res. Comm. 244:630-636. Además, los inhibidores de proteosoma tales como la lactacistina y/o la N-carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-norvalinal han demostrado que inducen la detención del ciclo celular en las fases G1 y G2 del ciclo celular. Mutomba, et al., (1997) Mol. Biochem. Parasitol. 90:491-504. Ejemplos de otros compuestos que se pueden añadir para sincronizar las células incluyen mimosina y afidicolina (Oncogene (1997) 15(22)2749-2753), quercetina (Shen y Webber (1997) Oncol. Res. 9:597-602), epirrubicina (Hedenfalk, et al., (1997) Cytometry 29(4):321-327) y lovastatina (Molecular and Cellular Biology (1985) 6(9):1197-1213).

Será evidente para los expertos en la materia que el procedimiento anterior para incrementar el rendimiento mediante la sincronización de las células se puede aplicar a cualquier procedimiento para el cultivo celular eucariótico pero no se limita al cultivo basado en microvehículo, cultivo en suspensión, cultivo giratorio, y el denominado cultivo de células en "botella en rotación".

Infección de la línea celular productora con el virus:

En las células que se han infectado mediante copias múltiples de un virus determinado, las actividades necesarias para la replicación viral y el empaquetamiento de virión son cooperativas. De este modo, se prefiere que las condiciones se ajusten tal que exista una probabilidad significativa de que las células productoras se infecten de forma multiplicada con el virus. Un ejemplo de una condición que aumenta la producción del virus en las células productoras es una concentración incrementada de virus en la fase de infección. Sin embargo, es posible que el número total de infecciones virales por célula productora se pueda exagerar, resultando en efectos tóxicos para las células. En consecuencia, se debería procurar mantener las infecciones en la concentración de virus del intervalo de 10^6 a 10^{10} , preferentemente 10^9 , viriones por ml.

Los agentes químicos se pueden utilizar asimismo para aumentar la infectividad de la línea celular productora. Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la infectividad de las líneas celulares productoras para la infectividad viral mediante la inclusión de un inhibidor de calpaína. Ejemplos de inhibidores de calpaína útiles en la forma de realización de la presente invención incluyen el inhibidor de calpaína 1 (conocido asimismo como N-acetil-leucil-leucil-norleucinal, disponible comercialmente en Boehringer Mannheim). Se observó que el inhibidor de calpaína 1 incrementaba la infectividad de las líneas celulares productoras al adenovirus recombinante.

III. Cultivo, cosecha, lisis y purificación:

Durante la fase en la que se procede a la replicación viral, el biorreactor se alimenta continuamente con medio complementado libre de suero. La concentración de oxígeno se debería mantener a un nivel de aproximadamente 50% a aproximadamente 120% de oxígeno disuelto, preferentemente aproximadamente 100% de oxígeno disuelto. Para maximizar la concentración intracelular de partículas virales, se debería monitorizar la acumulación de partículas de virus dentro de las células. En el procedimiento preferido, se determina la concentración viral mediante HPLC utilizando una columna Resource Q[®] según se describe en el Ejemplo 7 de la presente memoria. Cuando el nivel de partículas virales empieza a estancarse, se detiene el biorreactor y se cosechan las células.

La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción de partículas virales intactas que comprende las etapas (a) a (g) anteriores y comprende además las etapas siguientes:

- h) cosechar las células;
- i) lisar las células productoras;
- j) aislar las partículas virales;
- k) purificar las partículas virales intactas.

Cuando se optimiza la concentración de partículas virales según se ha determinado anteriormente, los contenidos enteros del biorreactor se eliminan y se regulan para mantener un pH de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente 8,5. En este punto las células se pueden congelar para su almacenamiento a -70°C.

Lisis y purificación:

Cuando se desea aislar las partículas virales a partir de las células productoras, se lisan las células, utilizando una variedad de medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células de mamífero se pueden lisar bajo condiciones de presión baja (100 a 200 psi de presión diferencial) o procedimientos de congelación-deshielo convencionales. Se elimina el ADN/ARN libre exógeno mediante la degradación con ADNasa/ARNasa. Las partículas virales se purifican a continuación por medios conocidos en la técnica. Se pueden utilizar los procedimientos cromatográficos o de centrifugación de gradiente de densidad diferencial. En la forma de realización preferida de la presente invención, el virus se purifica mediante cromatografía de columna sustancialmente según el procedimiento de Huyghe *et al.*, (1995) *Human Gene Therapy* 6:1403-1416 según se ha descrito en la solicitud de patente US n° 08/400.793 en trámite, presentada el 7 de marzo de 1995.

Ejemplos**Ejemplo 1: preparación de microvehículos:**

Los gránulos de microvehículo Cytodex 1 se prepararon mediante hinchamiento e hidratación en PBS. El PBS para este procedimiento se preparó mediante una dilución 1:10 de salino regulado con fosfato 10x (PBS) en agua Milli-Q (pH 7,5). Se añadieron 10 gramos de gránulos de microvehículo de Cytodex 1 a una botella de 500 ml limpia. Se añadieron aproximadamente 300 a 400 mililitros de PBS a la botella y los contenidos se agitaron hasta que los microvehículos se hidrataron y se suspendieron completamente (aproximadamente 3 minutos). Se dejaron sedimentar los microvehículos durante aproximadamente 10 minutos. Se eliminó el PBS mediante aspiración. El

procedimiento de lavado se repitió dos veces.

Se resuspendieron los microvehículos en un volumen final de 300 ml de PBS. Los microvehículos se esterilizaron en un autoclave durante 30 minutos a 250°F. La botella que contenía los microvehículos estériles se transfirió a una campana de laboratorio de flujo laminar. Se eliminó el PBS mediante aspiración y se lavaron los gránulos una vez como se había hecho anteriormente con PBS estéril. Los microvehículos se lavaron a continuación una vez más en DMEM estéril que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS). Se resuspendieron los microvehículos a un volumen final de 300 ml con DMEM estéril que contenía 10% de FBS.

10 **Ejemplo 2. preparación de las células 293 gt:**

Se colocaron 10 ml de DMEM estéril que contenía 10% de FBS en un tubo cónico de 15 ml. Se obtuvo un vial de células 293 GT que contenía aproximadamente 5×10^6 células a partir del almacenamiento en nitrógeno líquido y se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Se lavó el exterior del vial en isopropanol al 70% y se abrió en una campana de laboratorio de flujo laminar. Los contenidos del vial se transfirieron al tubo que contenía el medio. El tubo se centrifugó a continuación a 1.000 rpm en una centrífuga Beckman TJ6 durante aproximadamente 5 minutos. El sobrenadante se eliminó a continuación mediante aspiración y se resuspendió el sedimento en 10 ml de medio. A continuación se transfirió la suspensión a un matraz T-225 y se incubó a 37°C durante aproximadamente 50 horas. Las células se dejaron crecer hasta aproximadamente un 50 a 90% de confluencia según se determinó mediante microscopía óptica.

Tras alcanzar la confluencia suficiente, se eliminó el medio de los matraces y se pipetearon suavemente 10 a 30 ml de PBS junto con la parte superior de los matraces. A continuación los matraces se dejaron tumbados, recubriendo las células con PBS. Se eliminó el PBS de los matraces y se añadieron 10 ml de solución de tripsina al 0,05% (tripsina 0,05%, EDTA 0,53 mM disponible comercialmente en GibcoBRL según nº de catálogo 25300-054). El matraz se balanceó suavemente para asegurar que la solución de tripsina cubría la monocapa. Después de aproximadamente 45 segundos, cada matraz se sacudió fuertemente hasta que las células se separaron completamente del matraz. Inmediatamente, se añadieron 20 ml de medio completo a cada matraz. Los contenidos del matraz se agruparon vía centrifugación (1.000 rpm en una centrífuga Beckman TJ6 durante aproximadamente 5 minutos). El sobrenadante se decantó a partir del tubo de centrífuga, se trituró y las células se agruparon utilizando el medio completo. El conteo celular se determinó utilizando un hemocitómetro Reichert Bright-Line (Buffalo, NY).

El cultivo se dividió en cuatro matraces T-225 (aproximadamente 5×10^6 células por matraz). Se pipetearon 10 ml de suspensión en cada uno de los matraces que se iban a sembrar. Se añadió el medio completo a cada uno de los matraces hasta un volumen de 50 ml. Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera de dióxido de carbono humidificada al 7%. A continuación las células se expandieron utilizando el procedimiento anterior en 20 matraces T-225. Este procedimiento se repitió hasta que se preparó una cantidad de células suficiente para sembrar los microvehículos, aproximadamente $6,5 \times 10^8$ células.

40 **Ejemplo 3. Siembra de los microvehículos**

Se suspendieron aproximadamente $6,5 \times 10^8$ células 293 humanas, preparadas sustancialmente tal como se describe en el Ejemplo 2 anteriormente, en 5 litros de medio Eagle modificado de Dulbecco Biowhitakker # 12-604-F (DMEM), medio que contiene suero (disponible comercialmente en Biowhitakker, Inc., Walkersville, MD) y en 50 gramos de microvehículos preparados sustancialmente tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior. La mezcla anterior se agitó bien por turbulencia durante un periodo de aproximadamente 2 minutos. A continuación la mezcla entera se sifoneó en un recipiente de cultivo limpio esterilizado de un biorreactor de 5 litros CelliGen Plus® provisto de un rotor Cell-Lift (obtenido de New Brunswick Scientific Company, Inc., 44, Talmadge Road, Edison, New Jersey, USA, 08818-4005).

Las células se cultivaron a continuación a una temperatura de 37°C, manteniendo una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente 100%. Se monitorizó la concentración de oxígeno disuelto y se mantuvo mediante la utilización de una sonda de oxígeno disuelto unida a un controlador (parte del biorreactor CelliGen Plus) de forma que el oxígeno disuelto se mantuvo a aproximadamente 100% mediante burbujeo con aire, CO₂, O₂ o N₂ según fuera lo apropiado. El cultivo se mantuvo bajo presión atmosférica y a un pH de aproximadamente 7,2. El recipiente se agita a una velocidad que depende del volumen del recipiente del biorreactor y puede estar en el intervalo de aproximadamente 15 a 200 rpm. Para el biorreactor de 5 litros utilizado en la presente memoria, la velocidad de agitación se mantuvo aproximadamente a 70 rpm. Las células se cultivaron hasta que la densidad celular alcanzó el nivel deseado (8 a 10×10^6 células por mililitro o aproximadamente 230 células por microvehículo). Se puede determinar asimismo la densidad celular mediante la velocidad de consumo de oxígeno, que es proporcional a la concentración celular. Después de aproximadamente 3 días de incubación, el recipiente de reacción se alimentó continuamente con el medio a la velocidad de aproximadamente 0,5 litros por día por 1×10^6 células. El medio gastado se eliminó vía una columna de decantación. Las células se dejaron cultivar durante un periodo de aproximadamente 14 días.

Para determinar el número de células por mililitro, se incrementó la agitación a 100 rpm y se extrajo rápidamente una muestra de 5 ml utilizando una jeringa estéril. Los contenidos de la jeringa se transfirieron a continuación a un tubo cónico de 15 ml. Cuando sedimentaron los microvehículos, se eliminó el sobrenadante mediante aspiración y se sustituyó con un volumen idéntico de solución de tripsina al 0,25 % (0,25% de tripsina, EDTA 1 mM, disponible comercialmente en GibcoBRL según nº de catálogo 25200-056). El tubo se tapó y se incubó en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 5 minutos (o hasta que las células consiguieron un aspecto erizado sobre los microvehículos). A continuación el tubo se sometió a turbulencia durante 20 segundos y tan pronto como los microvehículos empezaron a sedimentar (aproximadamente 1 minuto) se extrajo una muestra de la capa de microvehículo anterior para el conteo mediante el hemocitómetro.

Ejemplo 4. Intercambio de medio

Una vez que las células consiguieron la densidad deseada, se desconectaron el controlador de temperatura, el agitador y la perfusión y se dejaron sedimentar los microvehículos. Una vez que los microvehículos sedimentaron, se eliminó el medio mediante sifón. El reactor se llenó con 5 litros de DMEM (sin suero o aditivos, Biowhitakker). La agitación se conectó de forma suficiente para romper la torta microvehículo/célula (aproximadamente 150 rpm) durante aproximadamente 3 minutos. Se paró la agitación y se dejaron sedimentar los microvehículos recubiertos. Este procedimiento se repitió dos veces. A continuación se llenó el reactor con 5 litros de DMEM que contenía 1% de CMF-1 (Applied Nutrient Sciences, Sorrento Valley, CA). La agitación se restituyó para romper la torta de células y a continuación se fijó a 70 rpm para mantener la suspensión de los microvehículos recubiertos. El controlador de temperatura se conectó para mantener una temperatura de 37°C.

Ejemplo 5. Infección de la línea celular de empaquetamiento 293 con adenovirus recombinante (ACN53).

Se añadieron 5×10^{12} partículas de adenovirus recombinante (ACN53 descrito en Wills, *et al.*, (1994) Human Gene Therapy) al recipiente de cultivo preparado en el Ejemplo 4 anterior. Se restituyó la perfusión según el Ejemplo 3 anterior. Después de aproximadamente 20 horas de incubación, se muestreó el recipiente de reacción para la concentración de virus. Esto se consiguió aumentando la agitación a 100 rpm y extrayendo rápidamente una muestra de 5 ml utilizando una jeringa estéril. Los contenidos de la jeringa se transfirieron a continuación a un tubo cónico de 15 ml. Se añadieron 0,5 ml de un regulador HSM (Hepes 50 mM, sacarosa 3%, MgCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM y beta-ciclodextrina 5%, pH 7,5). El tubo se congeló a continuación en nitrógeno líquido y se descongeló rápidamente en un baño de agua a 10°C. Este procedimiento de congelación-deshielo se repitió dos veces. Los tubos se centrifugaron a 3.000 rpm en una centrífuga Beckman TJ6 durante aproximadamente 5 minutos. Se extrajo una muestra de sobrenadante y se determinó mediante el ensayo de Resource Q[®] según se ha descrito por Shabram, *et al.*, (1996-7) Human Gene Therapy. Este procedimiento se repitió periódicamente (aproximadamente cada 2 horas) hasta que se determinó que la concentración viral empezaba a caer (es decir, se consiguió la concentración viral óptima). Los resultados se presentan en datos que se presentan en la Tabla 1 a continuación y se proporciona una representación gráfica de los datos en la Figura 2 de los dibujos anexos.

Tabla 1. Producción de ACN53 en células 293 GT		
Horas posteriores a la infección	PN/ml	PN total
24	$1,12 \times 10^{10}$	$5,58 \times 10^{13}$
32	$2,67 \times 10^{10}$	$1,33 \times 10^{14}$
38	$4,61 \times 10^{10}$	$2,30 \times 10^{14}$
46	$4,34 \times 10^{10}$	$2,17 \times 10^{14}$
47	$4,36 \times 10^{10}$	$2,18 \times 10^{14}$
48,5	$4,62 \times 10^{10}$	$2,31 \times 10^{14}$
49,5	$6,38 \times 10^{10}$	$3,19 \times 10^{14}$
50,5	$5,23 \times 10^{10}$	$2,61 \times 10^{14}$
51,5	$5,02 \times 10^{10}$	$2,51 \times 10^{14}$
52,75	$5,77 \times 10^{10}$	$2,89 \times 10^{14}$
53,75	$5,74 \times 10^{10}$	$2,87 \times 10^{14}$
54,75	$5,15 \times 10^{10}$	$2,57 \times 10^{14}$

Según se puede ver en los datos presentados anteriormente, la concentración viral óptima para ACN53 se consigue aproximadamente 50 horas después de la infección, aunque esto variará con las construcciones individuales. Los contenidos del recipiente se trasladaron a recipientes de congelación seguros y se mezclaron con 10 a 20% de regulador HSM y se congelaron.

Ejemplo 6. Cosecha y lisis de las células infectadas:

Se lisaron los contenidos completos que contenían las células mediante un procedimiento repetido de congelación/deshielo. Se congelaron los contenidos en un congelador a -80°C y se descongelaron en un baño de

agua a temperatura ambiente. El virus se purificó sustancialmente según el procedimiento de Huyghe *et al.*, (1995) *Human Gene Therapy* 6: 1043-1416.

Ejemplo 7. Producción de ACN-Rb110

5 Se repitió el procedimiento descrito en los Ejemplos 1 a 5 excepto por el hecho de que se utilizó un adenovirus recombinante que expresa la proteína de retinoblastoma p110 (ACNRb110) para infectar las células 293. La construcción del adenovirus ACNRB110 se describe en Smith, *et al.*, (1997) *Circulation* 96:1899-1905. La densidad celular en el tiempo de la infección fue $1,0 \times 10^7$ células/ml. Los resultados del cultivo infectado se presentan en la
10 Figura 3 de los dibujos anexos. En este ejemplo, se consiguió una concentración viral de aproximadamente 39.000 partículas virales por célula.

Ejemplo 8. Mejora de la concentración viral de ACN-p53 viral utilizando N-acetil-L-cisteína

15 Se prepara un cultivo de células productoras 293 sustancialmente según lo descrito en los ejemplos 1 a 4 anteriores. Las células se infectan con adenovirus ACN53 según se describe en el Ejemplo 5. Sin embargo, el procedimiento del Ejemplo 5 se modifica mediante la adición de N-acetil-L-cisteína a una concentración final de aproximadamente 10 a 30 mM en el medio de cultivo para inhibir el promotor CMV. Las células se cultivan y se cosechan sustancialmente según lo descrito en los Ejemplos 5 y 6. La concentración intracelular mejorada de las partículas
20 virales resulta de la inhibición de la expresión del transgen p53.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de una densidad celular superior a 5×10^6 células productoras/ml en un procedimiento de biorreactor basado en un microvehículo de dextrano reticulado para la producción de un virus en una célula productora, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
- a) preparar un cultivo de células productoras unidas a los microvehículos de dextrano reticulados, en el que la proporción de células productoras con respecto a los microvehículos es de 10 células/microvehículo,
- b) sembrar el biorreactor con una cantidad de microvehículos recubiertos de células productoras preparados en la etapa (a) hasta una densidad superior a aproximadamente 6 gramos (basada en el peso seco del microvehículo) de microvehículos recubiertos de células productoras por litro de volumen del medio del biorreactor; y
- c) cultivar las células productoras en el biorreactor bajo condiciones de perfusión en un medio que contiene suero hasta una densidad superior a 100 células/microvehículo, en el que el virus producido por el procedimiento es seleccionado de entre baculoviridae, parvoviridae, picornaviridae, herpesviridae, poxviridae, o adenoviridae.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la célula productora es una célula 293.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el virus es un adenovirus.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el virus es un adenovirus defectuoso en la replicación derivado del genoma de adenovirus de tipo 5.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el adenovirus defectuoso en la replicación además comprende un casete de expresión para un transgen exógeno.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el transgen exógeno es seleccionado de entre el grupo constituido por genes supresores de tumores, genes citotóxicos, genes citostáticos, genes proapoptóticos o genes activadores de profármaco.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el transgen exógeno es un gen supresor de tumor.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el gen supresor de tumor es p53.
9. Procedimiento para la producción de una población de células productoras, que contienen un título elevado de partículas virales en un biorreactor basado en un microvehículo en un medio libre de suero, comprendiendo dicho procedimiento el procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende las etapas siguientes:
- d) eliminar el medio que contiene suero,
- e) sincronizar las células productoras en la fase G1;
- f) infectar las células productoras con un virus;
- g) cultivar las células bajo condiciones que permitan la replicación viral hasta que se alcance un punto máximo.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la célula productora es una célula 293.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la sincronización celular se consigue manteniendo las células en un medio sin suero durante más de aproximadamente un tercio de un ciclo celular.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el virus es un adenovirus.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el virus es un adenovirus defectuoso en la replicación derivado del genoma de adenovirus de tipo 5.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el adenovirus defectuoso en la replicación además comprende un casete de expresión para un transgen exógeno.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el transgen exógeno es seleccionado de entre el grupo constituido por genes supresores de tumores, genes citotóxicos, genes citostáticos, genes proapoptóticos, o genes activadores de profármaco.

16. Procedimiento para la producción de virus según el procedimiento de la reivindicación 9, que además comprende las etapas siguientes:

- 5 h) cosechar las células;
- i) lisar las células productoras;
- 10 j) aislar las partículas virales de la célula lisada; y
- k) purificar las partículas virales intactas.

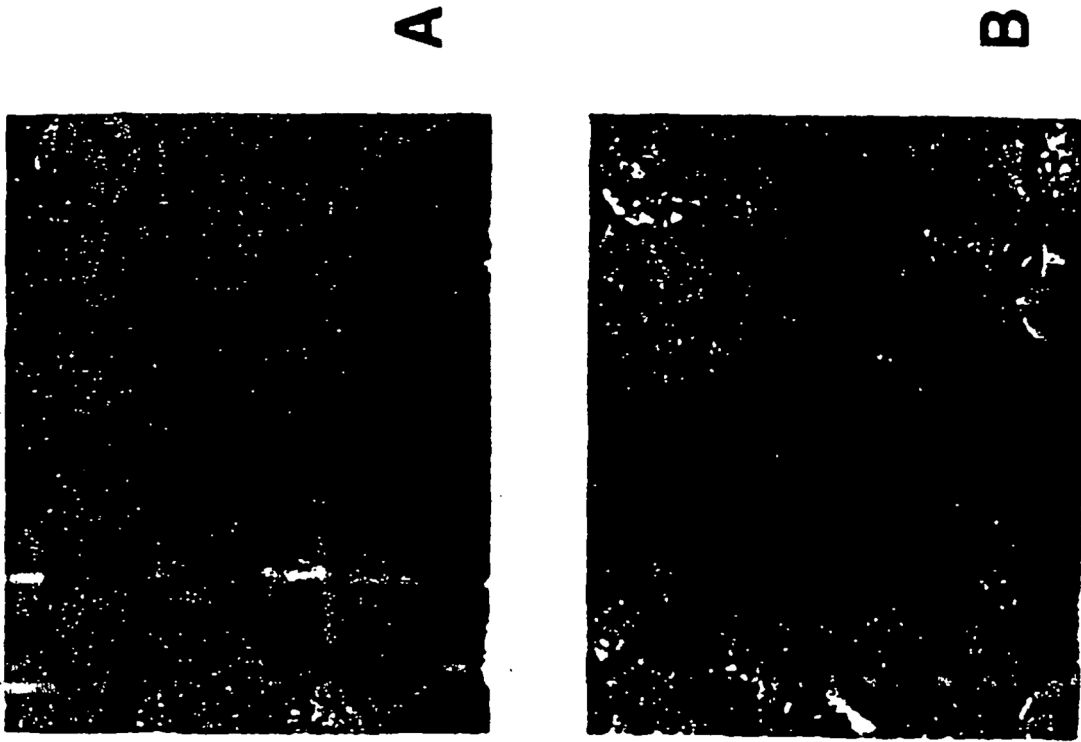


Figura 1

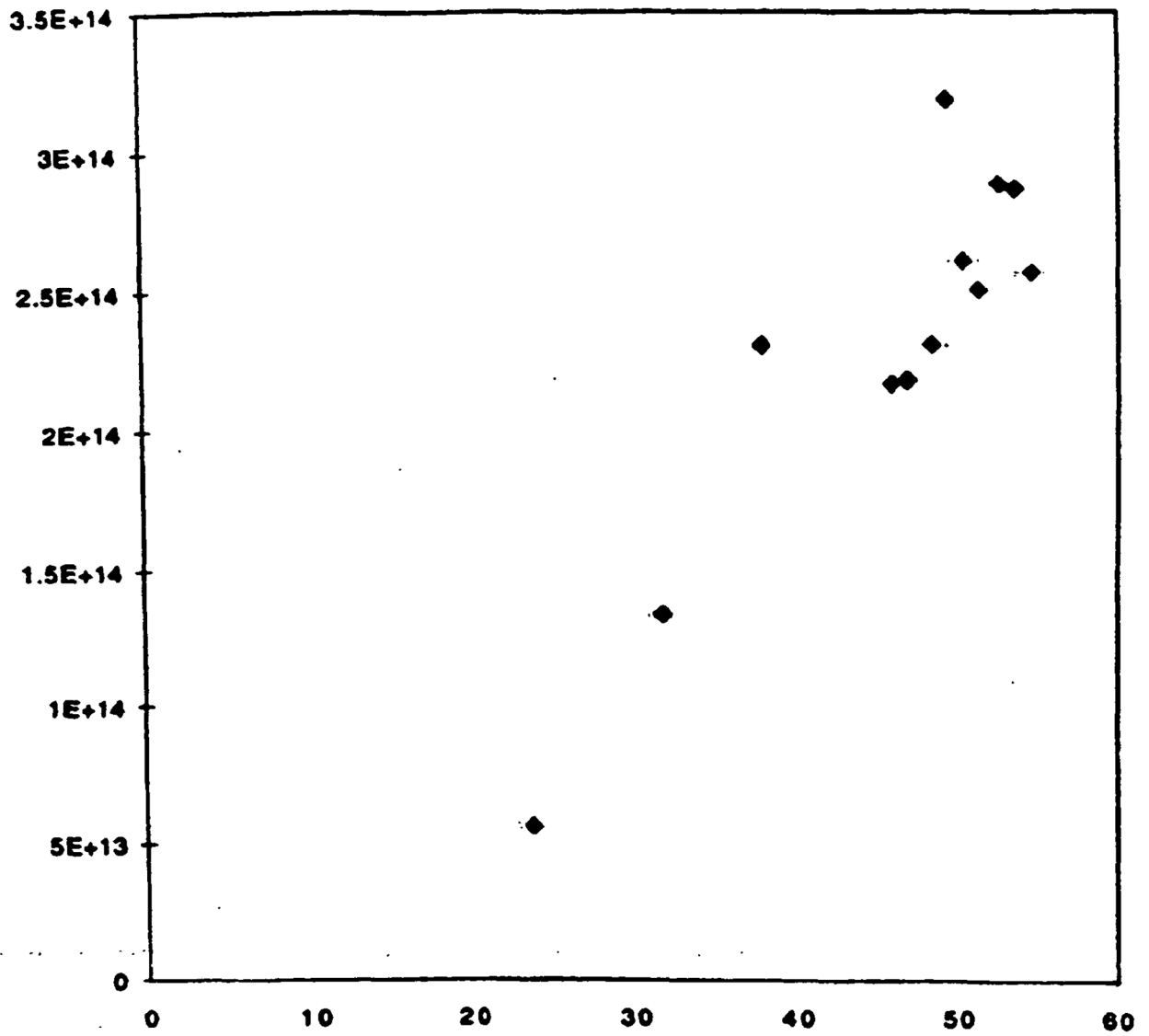


FIGURA 2

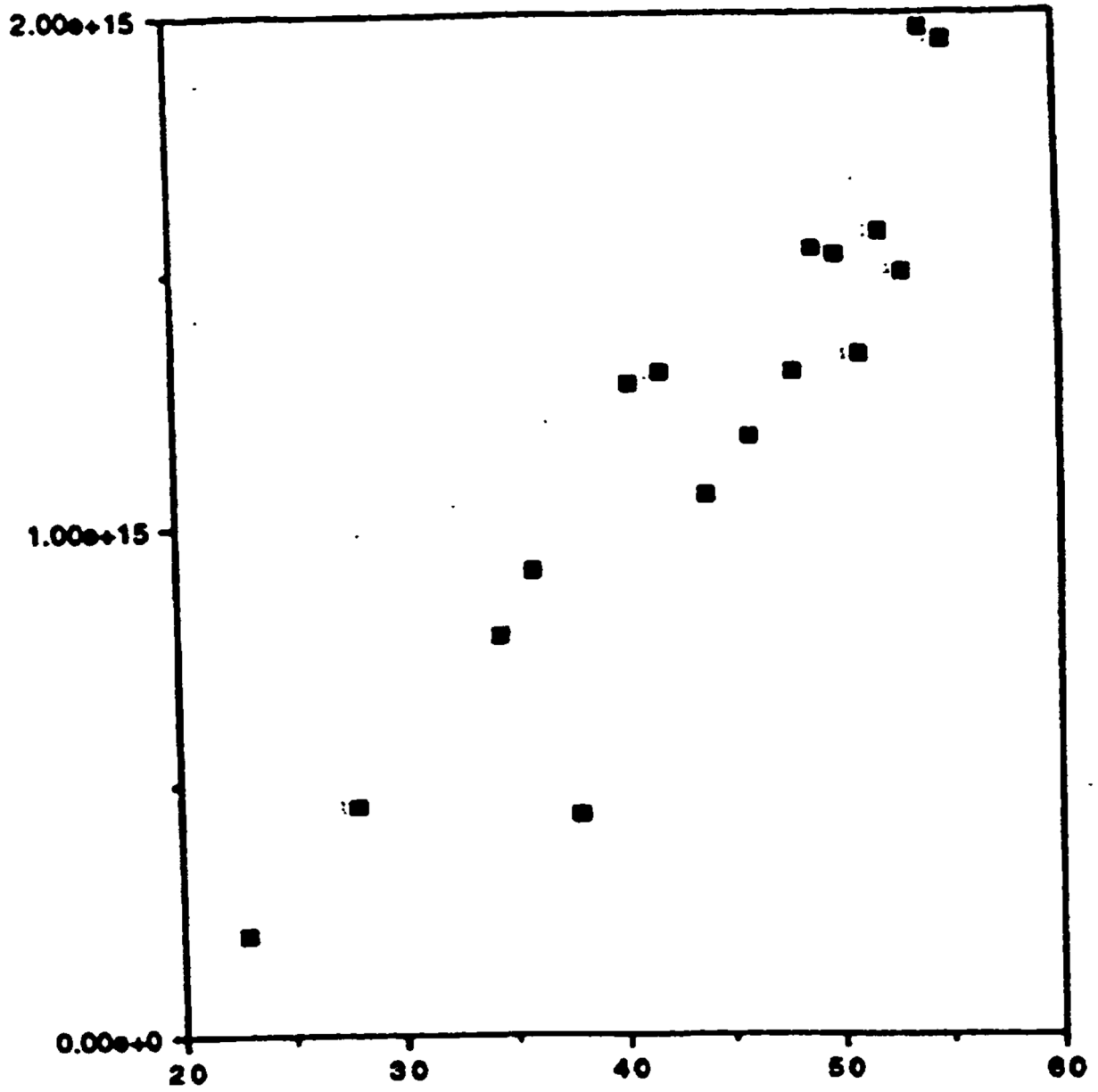


FIGURA 3