

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 640**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06025694 .8**
96 Fecha de presentación: **20.11.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1760151**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Composiciones de adenovirus que pueden obtenerse mediante un método de producción y purificación mejorado**

30 Prioridad:
20.11.1996 US 31329 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

73 Titular/es:
CRUCCELL HOLLAND B.V.
ARCHIMEDESWEG 4
2333 CN LEIDEN, NL

72 Inventor/es:
Zhang, Shuyuan;
Twin, Capucine;
Wu, Zheng;
Cho, Toohyoon;
Caston, Lucetta y
Wilson, Deborah

74 Agente/Representante:
Serrat Viñas, Sara

ES 2 383 640 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

Composiciones de adenovirus que pueden obtenerse mediante un método de producción y purificación mejorado

5 **Antecedentes de la invención**

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere de manera general a los campos del cultivo celular y la producción de virus. Más particularmente, concierne a métodos mejorados para el cultivo de células de mamífero, la infección de esas células con adenovirus y la producción de partículas de adenovirus infecciosas a partir de las mismas.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 En la actualidad se está evaluando en la práctica clínica vectores adenovirales, que expresan proteínas terapéuticas, para el tratamiento de una variedad de indicaciones del cáncer, incluyendo cánceres de pulmón y cabeza y cuello. A medida que los estudios clínicos progresan, la demanda de vectores adenovirales de calidad clínica está aumentando de manera espectacular. La demanda anual prevista para un estudio clínico de 300 pacientes podría alcanzar, aproximadamente, 6×10^{14} UFP.

20 Tradicionalmente, los adenovirus se producen en matraces de cultivo tisular comercialmente disponibles o "fábricas de células". Las células infectadas por virus se recogen y se congelan-descongelan para liberar los virus de las células en forma de lisado celular bruto. Entonces se purifica el lisado celular bruto (CCL, "crude cell lys ate") producido mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl doble. El rendimiento del virus normalmente notificado de fábricas de células de 100 bandejas individuales es aproximadamente de 6×10^{12} UFP. Claramente, se hace inviable producir la cantidad requerida de virus usando este proceso tradicional. Han de desarrollarse nuevos procesos de purificación y producción escalables y validables para satisfacer la demanda creciente.

30 El rendimiento de purificación de la ultracentrifugación en gradiente de CsCl es tan limitado que no puede satisfacer la demanda de vectores adenovirales para aplicaciones de terapia génica. Por tanto, con el fin de conseguir la producción de vector adenoviral a gran escala, han de desarrollarse métodos de purificación distintos de la ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Los informes sobre la purificación cromatográfica de virus son muy limitados, a pesar de la amplia aplicación de la cromatografía para la purificación de proteínas recombinantes. Se ha evaluado la capacidad de la cromatografía de exclusión por tamaño, intercambio iónico y de afinidad para la purificación del retrovirus, virus de la encefalitis transmitido por garrapata y virus vegetales con niveles de éxito variables (Crooks, *et al.*, 1990; Aboud, *et al.*, 1982; McGrath *et al.*, 1978, Smith y Lee, 1978; O'Neil y Balkovic, 1993). Se ha realizado incluso menos investigación sobre la purificación cromatográfica de adenovirus. Esta falta de actividad de investigación puede atribuirse parcialmente a la existencia del método eficaz, aunque no escalable, de purificación por ultracentrifugación en gradiente de CsCl para los adenovirus.

40 Recientemente, Huyghe *et al.* (1996) y el documento WO96/27677 notificaron la purificación de vector adenoviral usando cromatografía de intercambio iónico junto con cromatografía de afinidad a quelatos metálicos. Se notificó una pureza del virus similar a la de la ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Desafortunadamente, solamente se recuperó el 23% del virus tras el proceso de purificación en columna doble. Los factores de proceso que contribuyen a esta baja recuperación de virus son la etapa de congelación/descongelación utilizada por los autores para lisar las células con el fin de liberar el virus de las células y el procedimiento de purificación de dos columnas.

45 Claramente, existe una demanda de un método escalable y eficaz de producción de vector adenoviral que recuperará un alto rendimiento del producto para satisfacer la demanda siempre creciente de tales productos.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención describe un nuevo proceso para la producción y purificación de adenovirus. Este nuevo proceso de producción no sólo ofrece escalabilidad y capacidad de validación sino también una pureza del virus comparable a la conseguida usando ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

La presente invención se refiere a una composición de adenovirus que puede obtenerse mediante un método tal como se define en las reivindicaciones

60 Por tanto, la presente invención proporciona una composición de adenovirus que puede obtenerse mediante un método para producir un adenovirus que comprende hacer crecer las células huésped en medios a una tasa de perfusión baja, infectar las células huésped con un adenovirus, recoger y lisar las células huésped para producir un lisado celular bruto, concentrar el lisado celular bruto, cambiar el tampón del lisado celular bruto y reducir la concentración de ácidos nucleicos contaminantes en el lisado celular bruto.

65 El método comprende además aislar una partícula adenoviral del lisado usando cromatografía. En determinadas

realizaciones, el aislamiento consiste esencialmente en una única etapa de cromatografía. La cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio aniónico utiliza Toyopearl Super Q 650M.

5 En determinadas realizaciones de la presente invención, la concentración de glucosa en los medios se mantiene entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,7 g/l. En otras realizaciones determinadas, cambiar el tampón implica una etapa de diafiltración.

10 En realizaciones preferidas de la presente invención, el adenovirus comprende un vector adenoviral que codifica para un constructo génico exógeno. En determinadas realizaciones de este tipo, el constructo génico está operativamente unido a un promotor. En realizaciones particulares, el promotor es SV40 IE, RSV LTR, β -actina o CMV IE, tardío principal de adenovirus, F9-1 de polioma o tirosinasa. En realizaciones particulares de la presente invención, el adenovirus es un adenovirus incompetente para la replicación. En otras realizaciones, el adenovirus carece al menos de una parte de la región E1. En determinados aspectos, el adenovirus carece al menos de una parte de la región E1A y/o E1B. En otras realizaciones, las células huésped pueden complementar la replicación. En realizaciones particularmente preferidas, las células huésped son células 293.

15 En una realización preferida de la presente invención, se contempla que el constructo génico exógeno codifique para un gen terapéutico. Por ejemplo, el gen terapéutico puede codificar para *ras* antisentido, *myc* antisentido, *raf* antisentido, *erb* antisentido, *src* antisentido, *fms* antisentido, *jun* antisentido, *trk* antisentido, *ret* antisentido, *gsp* antisentido, *hst* antisentido, *bcl* antisentido, *abl* antisentido, Rb, CFTR, p16, p21, p27, p57, p73, C-CAM, APC, CTS-1, *zac1*, *scfV ras*, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, MMAC1, FCC, MCC, BRCA2, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 IL-12, GM-CSF G-CSF, timidina cinasa o p53.

25 Las células se lisan y se recogen usando Tween-20[®] al 1%. El lisado celular se trata con Benzonase[®].

El método comprende además una etapa de concentración empleando filtración a través de membrana. La filtración es filtración de flujo tangencial. La filtración utiliza un NMWC de 300K.

30 La presente invención también da a conocer un método para la purificación de un adenovirus que comprende hacer crecer células huésped, infectar las células huésped con un adenovirus, recoger y lisar las células huésped poniendo en contacto las células con un detergente para producir un lisado celular bruto, concentrar el lisado celular bruto, cambiar el tampón del lisado celular bruto y reducir la concentración de ácidos nucleicos contaminantes en el lisado celular bruto.

35 El detergente es Tween-20[®]. El detergente está presente en la disolución de lisis a una concentración de aproximadamente el 1% (p/v).

40 Aún en otra realización; la presente invención da a conocer un método para la purificación de un adenovirus que comprende las etapas de hacer crecer células huésped en medios libres de suero; infectar dichas células huésped con un adenovirus; recoger y lisar dichas células huésped para producir un lisado celular bruto; concentrar dicho lisado celular bruto; cambiar el tampón del lisado celular bruto; y reducir la concentración de ácidos nucleicos contaminantes en dicho lisado celular bruto. En realizaciones preferidas, las células pueden hacerse crecer independientemente como un cultivo en suspensión celular o como un cultivo dependiente de anclaje.

45 En realizaciones particulares, las células huésped se adaptan para el crecimiento en medios libres de suero. En realizaciones más preferidas, la adaptación para el crecimiento en medios libres de suero comprende una disminución secuencial del contenido en suero bovino fetal de los medios de crecimiento. Más particularmente, los medios libres de suero comprenden un contenido en suero bovino fetal inferior al 0,03% v/v.

50 También se contempla por la presente invención un adenovirus producido según un proceso que comprende las etapas de hacer crecer las células huésped en medios libres de suero; infectar dichas células huésped con un adenovirus; recoger y lisar dichas células huésped para producir un lisado celular bruto; concentrar dicho lisado celular bruto; cambiar el tampón del lisado celular bruto; y reducir la concentración de los ácidos nucleicos contaminantes en dicho lisado celular bruto.

55 La presente invención describe además una célula huésped 293 adaptada para el crecimiento en medios libres de suero. En determinados aspectos, la adaptación para el crecimiento en medios libres de suero comprende una disminución secuencial del contenido en suero bovino de los medios de crecimiento. En realizaciones particulares, la célula se adapta para el crecimiento en cultivo en suspensión. En realizaciones particulares, las células de la presente invención se denominan células IT293SF. Estas células se depositaron en la colección americana de cultivo tisular (American Tissue Culture Collection (ATCC)) con el fin de cumplir los requisitos del tratado de Budapest sobre reconocimiento internacional de los depósitos de microorganismos para los fines del procedimiento de la patente. Las células se depositaron por el Dr. Shuyuan Zhang en nombre de Introgen Therapeutics, Inc. (Houston, Tx.), el 17 de noviembre de 1997. La línea celular IT293SF se deriva de una adaptación de la línea celular 293 en cultivo en suspensión libre de suero tal como se describe en el presente documento. Las células pueden

cultivarse en medios libres de suero IS 293 (Irvine Scientific. Santa Ana, Ca.) complementados con heparina 100 mg/l y pluronic F-68 al 0,1%, y son permisivas para la infección por adenovirus humano.

5 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se facilitan a modo de ilustración sólo.

Breve descripción de los dibujos

10 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar de manera adicional determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

15 **FIGURA 1A y FIGURA 1B.** Perfiles de HPLC de las disoluciones virales a partir de series de producción usando tasas de perfusión del medio caracterizadas como “alta” (FIGURA 1A) y “baja” (FIGURA 1B).

FIGURA 2. El perfil de HPLC del lisado celular bruto (CCL) a partir de CellCube™ (línea continua A₂₆₀; línea discontinua A₂₈₀).

20 **FIGURA 3A, FIGURA 3B, FIGURA 3C, FIGURA 3D y FIGURA 3E.** Los perfiles de HPLC de las disoluciones de lisis a partir de CellCube™ usando diferentes detergentes. FIGURA 3A Thesit®. FIGURA 3B Triton®X-100. FIGURA 3C. NP-40®. FIGURA 3D. Brij®80. FIGURA 3E. Tween®20. Concentración del detergente: 1% (p/v) temperatura de lisis: temperatura ambiente. (línea continua A₂₆₀; línea discontinua A₂₈₀).

25 **FIGURA 4A y FIGURA 4B.** Los perfiles de HPLC de la disolución de virus antes (FIGURA 4A) y después (FIGURA 4B) del tratamiento con Benzonase. (línea continua A₂₆₀; línea discontinua A₂₈₀).

30 **FIGURA 5.** El perfil de HPLC de la disolución de virus después del tratamiento con Benzonase en presencia de NaCl 1M. (línea continua A₂₆₀; línea discontinua A₂₈₀).

FIGURA 6. Purificación del virus AdCMVp53 en condiciones del tampón A de Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 0,2 M, pH = 7,5.

35 **FIGURA 7.** Purificación del virus AdCMVp53 en condiciones del tampón A de Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 0,2 M, pH = 9,0.

FIGURA 8A, FIGURA 8B y FIGURA 8C. Análisis de HPLC de las fracciones obtenidas durante la purificación. FIGURA 8A fracción 3. FIGURA 8B fracción 4, FIGURA 8C fracción 8. (línea continua A₂₆₀; línea discontinua A₂₈₀).

40 **FIGURA 9.** Purificación del virus AdCMVp53 en condiciones del tampón A de Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 0,3 M, pH = 9.

45 **FIGURA 10A, FIGURA 10B, FIGURA 10C, FIGURA 10D y FIGURA 10E.** Análisis de HPLC de las fracciones de virus bruto obtenidas durante la purificación y virus purificado en gradiente de CsCl. FIGURA 10A disolución de virus bruto. FIGURA 10B Flujo a través. FIGURA 10C. Número de pico 1. FIGURA 10D. Número de pico 2. FIGURA 10E. Virus purificado en CsCl. (línea continua A₂₆₀; línea discontinua A₂₈₀).

50 **FIGURA 11.** Perfil de purificación en HPLC a partir de una columna de 5 cm de di.

FIGURA 12. Las proteínas estructurales de adenovirus principales detectadas en SDS-PAGE.

FIGURA 13. La concentración de BSA en el virus purificado como nivel detectado del ensayo de inmunotransferencia de tipo Western.

55 **FIGURA 14.** El cromatograma para el material del lisado celular bruto generado a partir del CellCube™.

FIGURA 15. El perfil de elución de la disolución de virus tratado purificada usando el método de la presente invención usando resina Toyopearl SuperQ.

60 **FIGURA 16A y FIGURA 16B.** Análisis de HPLC de la fracción de virus a partir del protocolo de purificación. FIGURA 16A perfiles de HPLC de la fracción de virus a partir de la primera etapa de purificación. FIGURA 16B perfiles de HPLC de la fracción de virus a partir de la segunda purificación. (línea continua A₂₆₀; línea discontinua A₂₈₀).

65 **FIGURA 17.** Purificación de la disolución de virus recogida en Tween® al 1% con tasa de perfusión del medio baja.

FIGURA 18. Análisis de HPLC de la fracción de virus producida con tasa de perfusión del medio baja.

FIGURA 19A, FIGURA 19B y FIGURA 19C. Análisis del virus purificado en columna. FIGURA 19A análisis SDS-PAGE. FIGURA 19B inmunotransferencia de tipo Western para BSA. FIGURA 19C inmunotransferencia en líneas de ácidos nucleicos para determinar la concentración de ácido nucleico contaminante.

FIGURA 20A, FIGURA 20B, FIGURA 20C, FIGURA 20D, FIGURA 20E y FIGURA 20F. Estudio de la capacidad de la resina Toyopearl SuperQ 650M. FIGURA 20A Flujo a través a partir de la razón de carga de 1:1. FIGURA 20B. Virus purificado a partir de la razón de carga de 1:1. FIGURA 20C Flujo a través de la razón de carga de 2:1. FIGURA 20D. Virus purificado a partir de la razón de carga de 2:1. FIGURA 20E Flujo a través a partir de la razón de carga de 3:1. FIGURA 20F. Virus purificado a partir de la razón de carga de 3:1. (línea continua A_{260} ; línea discontinua A_{280}).

FIGURA 21. Virus purificado en columna de ultracentrifugación isopícnica en CsCl.

FIGURA 22. Los perfiles de HPLC de los virus intactos presentes en el virus purificado en columna. A. Virus intacto B. Virus defectuoso. (línea continua A_{260} ; línea discontinua A_{280}).

FIGURA 23. Un diagrama de flujo de la producción y purificación para AdCMVp53

Descripción de realizaciones ilustrativas

Se ha demostrado que los vectores adenovirales pueden usarse con éxito en la expresión génica eucariota y en el desarrollo de vacunas. Recientemente, estudios en animales han demostrado que los adenovirus recombinantes podrían usarse para terapia génica. Estudios exitosos de la administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos han probado la eficacia de vectores adenovirales en terapia. Este éxito ha conducido al uso de vectores de este tipo en ensayos clínicos en seres humanos. En la actualidad existe un aumento en la demanda de la producción de vectores adenovirales que van a usarse en diversas terapias. Las técnicas actualmente disponibles son insuficientes para satisfacer una demanda de este tipo. La presente invención proporciona métodos para la producción de grandes cantidades de adenovirus para su uso en tales terapias.

La presente invención implica un proceso que se ha desarrollado para la producción y purificación de un adenovirus recombinante de replicación deficiente. El proceso de producción se basa en el uso de un biorreactor CellCube™ para el crecimiento celular y la producción de virus. Se encontró que una tasa de perfusión dada, usada durante las fases del crecimiento celular y la producción de virus del cultivo, tiene un efecto significativo sobre la purificación posterior del virus. Más específicamente, una tasa de perfusión de baja a media mejora la producción de virus. Además, la disolución de lisis compuesta por detergente tamponado, usada para lisar células en el Cellcube™ al final de la fase de producción de virus, también mejora el proceso. Con estas dos ventajas, la disolución de virus bruto recogida puede purificarse usando una única serie de cromatografía de intercambio iónico, tras la concentración/diafiltración y tratamiento con nucleasa para reducir la concentración de ácido nucleico contaminante en la disolución de virus bruto. El virus purificado en columna tiene una pureza equivalente a la del virus purificado en gradiente de CsCl doble. La recuperación del producto viral en el proceso total es del $70\% \pm 10\%$. Ésta es una mejora significativa con respecto a los resultados notificados por Huyghe *et al.* (1996). Comparada con la ultracentrifugación en gradiente de CsCl doble, la purificación en columna tiene la ventaja de ser más constante, escalable, validable, rápida y menos cara. Este nuevo proceso representa una mejora significativa en la tecnología para la fabricación de vectores adenovirales para terapia génica.

Por tanto, la presente invención está diseñada para aprovecharse de estas mejoras en la purificación y los sistemas de cultivo a gran escala con el fin de producir y purificar vectores adenovirales. A continuación se exponen en detalle los diversos componentes para un sistema de este tipo y los métodos de producción de adenovirus con los mismos.

1. Células huésped

A) Células

En una realización preferida, la generación y propagación de los vectores adenovirales dependen de una única línea celular auxiliar, denominada 293, que se transformó a partir de células de riñón embrionario humano mediante fragmentos de ADN del serotipo 5 del adenovirus (Ad5) y expresa de manera constitutiva proteínas E1 (Graham *et al.*, 1977). Debido a que la región E3 es prescindible en el genoma Ad (Jones y Shenk, 1978), los vectores Ad actuales, con ayuda de las células 293, portan ADN foráneo o bien en la E1, la E3 o bien ambas regiones (Graham y Prevec, 1991; Bett *et al.*, 1994).

Un primer aspecto de la presente invención son las líneas celulares recombinantes que expresan parte del genoma adenoviral. Estas líneas celulares pueden soportar la replicación de vectores recombinantes de adenovirus y virus auxiliares que tienen defectos en determinados genes adenovirales, es decir, son "permissivas" para el crecimiento de estos virus y vectores. La célula recombinante se denomina también célula auxiliar debido a la capacidad para

complementar defectos en, y soportar la replicación de, vectores adenovirales incompetentes para la replicación. El prototipo para una célula auxiliar adenoviral es la línea celular 293, que contiene la región E1 adenoviral. Las células 293 soportan la replicación de vectores adenovirales que carecen de funciones E1 proporcionando *en trans* los elementos activos de E1 necesarios para la replicación.

5 Las células auxiliares según la presente invención se derivan de una célula de mamífero y, preferiblemente, de una célula de primate tal como la célula de riñón embrionario humano. Aunque se prefieren diversas células de primate y las más preferidas son células humanas o incluso de riñón embrionario humano, cualquier tipo de célula que pueda soportar la replicación de los virus sería aceptable en la puesta en práctica de la invención. Otros tipos de células podrían incluir, pero no se limitan a células Vero, células CHO o cualquier célula eucariota para la que se establecen técnicas de cultivo tisular siempre que las células sean permisivas para adenovirus. El término "permisiva para adenovirus" significa que el adenovirus o vector adenoviral puede completar todo el ciclo de vida intracelular del virus dentro del entorno celular.

15 La célula auxiliar puede derivarse a partir de una línea celular existente, por ejemplo, a partir de una línea celular 293, o desarrollarse *de no vo*. Tales células auxiliares expresan los genes adenovirales necesarios para complementar delecciones *en trans* en un genoma adenoviral o que soporta la replicación de un vector adenoviral por lo demás defectuoso, tal como el E1, E2, E4, E5 y funciones tardías. Una parte particular del genoma del adenovirus, la región E1, se ha usado ya para generar líneas celulares de complementación. Ya estén integradas o sean episomales, las partes del genoma del adenovirus que carecen de un origen viral de replicación, cuando se introducen en una línea celular, no se replicarán incluso cuando la célula se superinfecta con adenovirus de tipo natural. Además, debido a que la transcripción de la unidad tardía principal es tras la replicación del ADN viral, las funciones tardías del adenovirus no pueden expresarse suficientemente a partir de una línea celular. Por tanto, las regiones E2, que se solapan con las funciones tardías (L1-5), se proporcionarán por virus auxiliares y no por la línea celular. Normalmente, una línea celular según la presente invención expresará E1 y/o E4.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término célula "recombinante" pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un gen, tal como un gen del genoma adenoviral o de otra célula. Por tanto, las células recombinantes pueden distinguirse de células que se producen de manera natural que no contienen un gen introducido de manera recombinante. Las células recombinantes son por tanto células que tienen un gen o genes introducidos a través de "la mano del hombre".

30 La replicación se determina poniendo en contacto una capa de células no infectadas, o de células infectadas con uno o más virus auxiliares, con partículas de virus, seguido por la incubación de las células. La formación de placas virales, o zonas libres de células en la capa celular, es el resultado de la lisis celular provocada por la expresión de determinados productos virales. La lisis celular es indicativa de la replicación viral.

35 Ejemplos de otras líneas celulares de mamífero útiles que pueden usarse con un virus competente para la replicación o convertirse en células huésped de complementación para su uso con virus de replicación deficiente son células Vero y HeLa y líneas celulares de células de ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, HepG2, 3T3, RIN y MDCK.

B) Crecimiento en medios de selección

45 En determinadas realizaciones, puede ser útil emplear sistemas de selección que impiden el crecimiento de células no deseadas. Esto puede lograrse en virtud de transformar permanentemente una línea celular con un marcador seleccionable o transduciendo o infectando una línea celular con un vector viral que codifica para un marcador seleccionable. En cualquiera de las situaciones, el cultivo de la célula transformada/transducida con un compuesto selectivo o fármaco apropiado dará como resultado la potenciación, en la población celular, de las células que portan el marcador.

50 Ejemplos de marcadores incluyen, pero no se limitan a los genes de timidina cinasa del HSV, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, en células *tk-*, *hgprt-* o *aprt-*, respectivamente. Además, la resistencia al antimetabolito puede usarse como la base de la selección para *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato; *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico; *neo*, que confiere resistencia al aminoglicósido G418; e *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina.

C) Crecimiento en la retirada del suero

60 La adaptación a la retirada del suero de células dependientes de anclaje a cultivos en suspensión libres de suero se ha usado para la producción de proteínas recombinantes (Berg, 1993) y vacunas virales (Perrin, 1995). Hasta hace poco ha habido pocos informes sobre la adaptación de las células 293A a cultivos en suspensión libres de suero. Gilbert informó de la adaptación de las células 293A a cultivos en suspensión libres de suero para la producción de proteína recombinante y adenovirus (Gilbert, 1996). Se ha usado un método de adaptación similar para la adaptación de las células A549 células al cultivo en suspensión libre de suero para la producción de adenovirus (Morris *et al.*, 1996). Los rendimientos del virus específico de la célula en las células en suspensión adaptadas, sin

embargo, son aproximadamente 5-10 veces inferiores a los conseguidos en las células unidas originarias.

Usando el procedimiento de retirada del suero similar, los inventores han adaptado con éxito las células 293A al cultivo en suspensión libre de suero (células 293SF). En este procedimiento, se adaptaron las células 293 a un medio 293 comercialmente disponible disminuyendo de manera secuencial la concentración de FBS en frascos T. Brevemente, la concentración de suero inicial en los medios era aproximadamente como en los medios DMEM con FBS al 10% en un frasco T-75 y se adaptaron las células a los medios libres de suero IS 293 en frascos T disminuyendo la concentración de FBS en los medios de manera secuencial. Tras 6 pases en los frascos T-75 se calculó que el % de FBS era de aproximadamente el 0,019% y las células 293. Las células se subcultivaron dos veces más en los frascos T antes de transferirse a frascos centrifugadores. Los resultados descritos a continuación en el presente documento muestran que las células crecen satisfactoriamente en el medio libre de suero (medio IS293, Irvine Scientific, Santa Ana, CA). El tiempo de duplicación promedio de las células fue de 18-24 h consiguiendo concentraciones celulares estacionarias del orden de $4-10 \times 10^6$ células/ml sin cambio del medio.

D) Adaptación de las células para cultivo en suspensión

Se han usado dos metodologías para adaptar las células 293 a cultivos en suspensión. Graham adaptó células 293A a cultivo en suspensión (células 293N3S) mediante 3 pases en serie en ratones desnudos (Graham, 1987). Se encontró que las células 293N3S en suspensión podían soportar vectores adenovirales E1. Sin embargo, Garnier *et al.* (1994) observaron que las células 293N35 tenían una fase de latencia inicial relativamente larga en suspensión, una tasa de crecimiento baja y una fuerte tendencia a aglutinarse.

El segundo método que se ha usado es una adaptación gradual de las células 293A al crecimiento en suspensión (Cold Spring Harbor Laboratories, células 293S). Garnier *et al.* (1994) informaron del uso de células 293S para la producción de proteínas recombinantes a partir de vectores adenovirales. Los autores encontraron que las células 293S se aglutinaban mucho menos en medios libres de calcio y que un cambio por medio nuevo en el momento de la infección por virus podía aumentar de manera significativa la producción de proteína. Se encontró que la glucosa era el factor restrictivo en el cultivo sin cambio del medio.

En la presente invención, las células 293 adaptadas para el crecimiento en condiciones libres de suero se adaptaron a un cultivo en suspensión. Se transfirieron las células a un cultivo en suspensión centrifugado de 250 ml libre de suero (volumen de trabajo de 100 ml) para el cultivo en suspensión a una densidad celular inicial de entre aproximadamente $1,18E+5$ cv/ml y aproximadamente $5,22E+5$ cv/ml. Los medios pueden complementarse con heparina para evitar la agregación de las células. Este sistema de cultivo celular permite cierto aumento de la densidad celular, mientras que se mantiene la viabilidad celular. Una vez que estas células están creciendo en cultivo, las células se subcultivan en los frascos centrifugadores aproximadamente 7 pases más. Puede observarse que se reduce progresivamente el tiempo de duplicación de las células hasta que al final de los pases sucesivos el tiempo de duplicación es aproximadamente de 1,3 días, es decir, comparable a 1,2 días de las células en medios con FBS al 10% en el cultivo celular unido. En los medios IS 293 libres de suero complementados con heparina casi todas las células existían como células individuales que no formaban agregados de células en el cultivo en suspensión.

2. Sistemas de cultivo celular

La capacidad para producir vectores virales infecciosos es cada vez más importante para la industria farmacéutica, especialmente en el contexto de la terapia génica. Durante la última década, los avances en biotecnología han conducido a la producción de varios vectores virales importantes que tienen posibles usos como terapias, vacunas y máquinas para la producción de proteínas. El uso de vectores virales en cultivos de mamífero tiene ventajas sobre las proteínas producidas en huéspedes bacterianos u otras formas de vida inferior por su capacidad para procesar postraduccionalmente estructuras de proteínas complejas tales como plegamiento dependiente de disulfuro y glicosilación.

El desarrollo del cultivo celular para la producción de vectores de virus se ha visto ayudado enormemente por el desarrollo en biología molecular de técnicas para el diseño y la construcción de sistemas de vectores altamente eficaces en cultivos celulares de mamífero, una serie de marcadores de selección útiles, esquemas de amplificación génica y un entendimiento más exhaustivo de los mecanismos celulares y bioquímicos implicados en la obtención de la molécula biológicamente activa final a partir del vector introducido.

Frecuentemente, los factores que afectan al lado aguas abajo (en este caso, más allá de la lisis celular) del aumento a escala de la fabricación no se consideraron antes de seleccionar la línea celular como el huésped para el sistema de expresión. Además, el desarrollo de sistemas de biorreactor que pueden mantener cultivos de muy alta densidad durante periodos prolongados de tiempo no ha estado a la altura de la creciente demanda de un aumento de la producción a precios más bajos.

La presente invención se aprovechará de la tecnología de biorreactor recientemente disponible. Hacer crecer células según la presente invención en un biorreactor permite la producción a gran escala de células biológicamente activas

de manera completa que pueden infectarse por los vectores adenovirales de la presente invención. Haciendo funcionar el sistema a una tasa de perfusión baja y aplicando un esquema diferente para la purificación de las partículas infectantes, la invención proporciona una estrategia de purificación que es fácilmente escalable para producir grandes cantidades de producto altamente purificado.

Los biorreactores se han usado ampliamente para la producción de productos biológicos a partir de tanto cultivos celulares animales dependientes de anclaje como en suspensión. Las células productoras usadas más ampliamente para la producción de vector adenoviral son células de riñón embrionario humano dependientes de anclaje (células 293). Los biorreactores que han de desarrollarse para la producción de vector adenoviral deben tener la característica de elevada área superficial de cultivo específico de volumen con el fin de conseguir una alta densidad de células productoras y alto rendimiento de virus. El cultivo celular sobre microsoporte en un biorreactor de tanque agitado proporciona una muy elevada área superficial de cultivo específico de volumen y se ha usado para la producción de vacunas virales (Griffiths, 1986). Además, los biorreactores de tanque agitado han demostrado industrialmente ser escalables. El sistema de cultivo celular CellCube™ de multiplaca fabricado por Coming-Costar ofrece también una muy elevada área superficial de cultivo específico de volumen. Las células crecen sobre ambas caras de las placas de cultivo selladas herméticamente entre sí en forma de un cubo compacto. A diferencia de los biorreactores de tanque agitado, la unidad de cultivo Cellcube™ es desechable. Esto es muy deseable en la producción en la etapa temprana del producto clínico debido a los reducidos gastos de capital, costes de garantía de calidad y control de calidad asociados a los sistemas desechables. En consideración a las ventajas ofrecidas por los diferentes sistemas, se evaluaron tanto el biorreactor de tanque agitado como el sistema Cellcube™ para la producción de adenovirus.

A) Cultivos dependientes de anclaje frente a no dependientes de anclaje.

Las células humanas y animales pueden propagarse *in vitro* de dos modos: como células no dependientes de anclaje que crecen libremente en suspensión por todo el volumen del cultivo; o como células dependientes de anclaje que requieren unión a un sustrato sólido para su propagación (es decir, un tipo de crecimiento celular de monocapa).

Cultivos en suspensión o no dependientes de anclaje a partir de líneas celulares establecidas continuas son los medios más ampliamente utilizados de producción a gran escala de células y productos celulares. El cultivo en suspensión a gran escala basado en tecnología de fermentación microbiana (bacteriana y de levadura) tiene claras ventajas para la fabricación de productos de células de mamíferos. Los procesos son relativamente simples de realizar y sencillos de aumentar a escala. Pueden proporcionarse condiciones homogéneas en el reactor, lo que permite la monitorización precisa y el control de la temperatura, oxígeno disuelto y pH, y garantiza que puedan tomarse muestras representativas del cultivo.

Sin embargo, las células cultivadas en suspensión no siempre pueden usarse en la producción de agentes biológicos. Aún se considera que los cultivos en suspensión tienen potencial tumorigeno y por tanto su uso como sustratos para la producción pone límites al uso de los productos resultantes en aplicaciones en seres humanos y en veterinaria (Pettricciani, 1985; Larsson, 1987). Los virus propagados en cultivos en suspensión, en contraposición a los cultivos dependientes de anclaje, pueden algunas veces provocar cambios rápidos en los marcadores virales, conduciendo a una inmunogenicidad reducida (Bahnmann, 1980). Finalmente, algunas veces, incluso líneas celulares recombinantes pueden secretar cantidades considerablemente mayores de productos cuando se propagan como cultivos dependientes de anclaje, comparado con la misma línea celular en suspensión (Nilsson y Mosbach, 1987). Por estos motivos se usan mucho diferentes tipos de células dependientes de anclaje en la producción de diferentes productos biológicos.

B) Reactores y procesos para la suspensión.

Se acometió el cultivo en suspensión a gran escala de cultivos de mamífero en tanques agitados. Se adaptaron los instrumentos y los controles para los biorreactores, junto con el diseño de los fermentadores, a partir de aplicaciones microbianas relacionadas. Sin embargo, reconociendo el aumento de la demanda de control de la contaminación en los cultivos de mamífero de crecimiento más lento, se ejecutaron rápidamente diseños asépticos mejorados, mejorando la fiabilidad de estos reactores. Los instrumentos y los controles son básicamente los mismos que se encontraron en otros fermentadores, e incluyen controles de agitación, temperatura, oxígeno disuelto y pH. Están disponibles autoanalizadores y sondas más avanzadas para mediciones en línea y fuera de línea de la turbidez (una función de las partículas presentes), capacitancia (una función de las células viables presentes), glucosa/lactato, carbonato/bicarbonato y dióxido de carbono. Las densidades celulares máximas obtenibles en cultivos en suspensión son relativamente bajas a aproximadamente $2-4 \times 10^6$ células/ml de medio (que es inferior a 1 mg de peso celular seco por ml), bastante por debajo de los valores conseguidos en fermentación microbiana.

Dos diseños de reactor de cultivo en suspensión son los más ampliamente utilizados en la industria debido a su simplicidad y robustez de funcionamiento (el reactor con agitación y el reactor de agitación por inyección de aire). El diseño del reactor con agitación se ha utilizado con éxito en una escala de capacidad de 8000 litros para la producción de interferón (Phillips *et al.*, 1985; Mizrahi, 1983). Se hacen crecer las células en un tanque de acero

inoxidable con una razón de la altura con respecto al diámetro de 1:1 a 3:1. Normalmente se mezcla el cultivo con uno o más agitadores, basados en discos de paletas o modelos de hélice marina. Se han descrito sistemas agitadores que ofrecen menos fuerzas de corte que las paletas. La agitación puede impulsarse o bien directamente o bien indirectamente mediante impulsos acoplados magnéticamente. Los impulsos indirectos reducen el riesgo de contaminación microbiana a través de sellos sobre los ejes del agitador.

El reactor de agitación por inyección de aire, descrito también inicialmente para la fermentación microbiana y adaptado posteriormente para el cultivo de mamífero, se basa en una corriente de gas tanto para mezclar como para oxigenar el cultivo. La corriente de gas entra en una sección ascendente del reactor e impulsa la circulación. El gas se desprende en la superficie del cultivo, provocando que el líquido más denso libre de burbujas de gas se desplace hacia abajo en la sección del tubo vertical de bajada del reactor. La ventaja principal de este diseño es la simplicidad y la falta de necesidad de mezclado mecánico. Normalmente, la razón de la altura con respecto al diámetro es 10:1. El reactor de agitación por inyección de aire se aumenta a escala de manera relativamente fácil, tiene buena transferencia de masa de gases y genera fuerzas de corte relativamente bajas.

La mayoría de los cultivos en suspensión a gran escala funcionan como procesos discontinuos o de alimentación discontinua ya que son los más sencillos de realizar y aumentar a escala. Sin embargo, están disponibles procesos continuos basados en principios de perfusión o quimiostato.

Un proceso discontinuo es un sistema cerrado en el que se observa un perfil de crecimiento típico. Una fase de latencia va seguida de fases exponencial, estacionaria y de disminución. En un sistema de este tipo, el entorno está cambiando continuamente a medida que los nutrientes se agotan y los metabolitos se acumulan. Esto hace que un análisis de los factores que influyen en la productividad y crecimiento celular, y por tanto en la optimización del proceso, sea una tarea compleja. La productividad de un proceso discontinuo puede aumentarse mediante la alimentación controlada de nutrientes esenciales para prolongar el ciclo de crecimiento. Un proceso de alimentación discontinua de este tipo es aún un sistema cerrado, ya que no se eliminan las células, productos y productos de desecho.

En lo que aún es un sistema cerrado, puede conseguirse la perfusión del medio nuevo a través del cultivo reteniendo las células con una variedad de dispositivos (por ejemplo filtro de centrifugación (spin filter) de malla fina, filtros de membrana de placa plana o fibra hueca, tubos de sedimentación). Los cultivos en filtro de centrifugación pueden producir densidades celulares de aproximadamente 5×10^7 células/ml. Un verdadero sistema abierto y el proceso de perfusión más simple es el quimiostato en el que hay un flujo de entrada de medio y un flujo de salida de células y productos. El medio de cultivo se alimenta al reactor a una tasa constante y predeterminada que mantiene la tasa de dilución del cultivo a un valor inferior a la tasa máxima de crecimiento específico de las células (para evitar el arrastre de la masa celular del reactor). El fluido del cultivo, que contiene células y productos celulares y subproductos, se elimina a la misma tasa.

C) Sistemas de unión no perfundidos.

Tradicionalmente, los cultivos celulares dependientes de anclaje se propagan sobre el fondo de vasos de plástico o vidrio pequeños. La reducida razón de la superficie con respecto al volumen ofrecida por técnicas tradicionales y clásicas, adecuadas para la escala de laboratorio, ha creado un embotellamiento en la producción de células y productos celulares a gran escala. En un intento por proporcionar sistemas que ofrezcan grandes superficies accesibles para el crecimiento celular en un volumen de cultivo pequeño, se han propuesto varias técnicas: el sistema en frascos rotativos, el propagador de placas apiladas, botellas de películas espiral, el sistema de fibras huecas, el lecho fijo, el sistema intercambiador de placas y carrete de tubos de membrana. Debido a que estos sistemas no son de naturaleza homogénea, y se basan algunas veces en procesos múltiples, sufren los siguientes defectos, potencial limitado para aumentarse a escala, dificultades para la toma de muestras celulares, potencial limitado para medir y controlar parámetros del proceso esenciales y dificultad para mantener homogéneas las condiciones del medio en todo el cultivo.

A pesar de estas desventajas, un proceso usado comúnmente para la producción celular dependiente de anclaje a gran escala es el frasco rotativo. Siendo poco más que un frasco T grande, de diferente forma, la simplicidad del sistema lo hace muy fiable y, por tanto, atractivo. Están disponibles robots automatizados totalmente que pueden manejar miles de frascos rotativos al día, eliminando por tanto el riesgo de contaminación e inconsistencia asociado al manejo humano intenso requerido de otro modo. Con cambios frecuentes de los medios, los cultivos en frascos rotativos pueden conseguir densidades celulares próximas a $0,5 \times 10^6$ células/cm² (correspondiente a aproximadamente 10^9 células/frasco o casi 10^7 células/ml de medios de cultivo).

D) Cultivos sobre microsoportes

En un esfuerzo por vencer los defectos de los procesos de cultivo tradicionales dependientes de anclaje, van Wezel (1967) desarrolló el concepto de los sistemas de cultivo sobre microsoporte. En este sistema, las células se propagan sobre la superficie de partículas sólidas pequeñas suspendidas en el medio de crecimiento mediante agitación lenta. Las células se unen a los microsoportes y crecen gradualmente hasta la confluencia sobre la

superficie del microsoporte. De hecho, este sistema de cultivo a gran escala mejora el cultivo dependiente de unión desde un proceso de disco único hasta un proceso unitario en el que se han reunido tanto el cultivo en suspensión como en monocapa. Por tanto, la combinación de la superficie necesaria para que una célula crezca con las ventajas del cultivo en suspensión homogénea aumenta la producción.

Las ventajas de cultivos sobre microsoporte sobre la mayoría de los otros métodos de cultivo a gran escala, dependientes de anclaje, son varios aspectos. En primer lugar, los cultivos sobre microsoporte ofrecen una alta razón de la superficie con respecto al volumen (variable cambiando la concentración del soporte) que conduce a altos rendimientos de densidad celular y un potencial para obtener productos celulares altamente concentrados. Los rendimientos celulares son de hasta $1-2 \times 10^7$ células/ml cuando los cultivos se propagan en un modo de reactor perfundido. En segundo lugar, las células pueden propagarse en un vaso de proceso unitario, en lugar de usar muchos vasos pequeños de baja productividad (es decir, frascos o platos). Esto da como resultado una utilización mucho mejor del nutriente y un ahorro considerable de medio de cultivo. Además, la propagación en un único reactor conduce a la reducción de la necesidad de espacio de las instalaciones y en el número de etapas de tratamiento requeridas por célula, reduciendo así el coste del laboratorio y el riesgo de contaminación. En tercer lugar, el cultivo en suspensión sobre microsoporte homogéneo y bien mezclado hace posible monitorizar y controlar las condiciones ambientales de control (por ejemplo, pH, pO_2 , y concentración de los componentes de medio), conduciendo así a una recuperación de producto y propagación celular más reproducible. En cuarto lugar, es posible tomar una muestra representativa para observación microscópica, pruebas químicas o enumeración. En quinto lugar, debido a que los microsoportes sedimentan en suspensión rápidamente, puede hacerse uso de un proceso alimentado discontinua o recogida de las células de una manera relativamente fácil. En sexto lugar, el modo de la propagación del cultivo dependiente de anclaje sobre los microsoportes hace posible usar este sistema para otras manipulaciones celulares, tales como transferencia celular sin el uso de enzimas proteolíticas, cocultivo de células, trasplante en animales y perfusión del cultivo usando decantadores, columnas, lechos fluidificados o fibras huecas para la retención del microsoporte. En séptimo lugar, los cultivos sobre microsoporte se aumentan a escala de manera relativamente fácil usando equipamiento convencional usado para el cultivo de células animales y microbianas en suspensión.

E) Microencapsulación de células de mamífero

Un método que ha demostrado ser particularmente útil para cultivar células de mamífero es la microencapsulación. Las células de mamífero se retienen dentro de una membrana de hidrogel semipermeable. Se forma una membrana porosa alrededor de las células, permitiendo el intercambio de nutrientes, gases y productos metabólicos con el medio en masa que rodea la cápsula. Se han desarrollado varios métodos que son suaves, rápidos y no tóxicos y en los que la membrana resultante es suficientemente porosa y fuerte para sostener la masa celular creciente en todo el periodo de cultivo. Todos estos métodos se basan en alginato soluble gelificado mediante contacto de la gota con una disolución que contiene calcio. Lim (1982, patente de los EE.UU. 4.352.883) describe células concentradas en una disolución de alginato de sodio aproximadamente al 1% que se fuerzan a través de un orificio pequeño, formando gotas, y liberándose en una disolución de cloruro de calcio aproximadamente al 1%. Luego se cuejan las gotas en una capa de poliaminoácido que se une iónicamente al alginato de la superficie. Finalmente vuelve a licuarse el alginato tratando la gota en un agente quelante para eliminar los iones calcio. Otros métodos usan células en una disolución de calcio para echarlas gota a gota en una disolución de alginato, creando así una esfera de alginato hueca. Un enfoque similar implica células en una disolución de quitosano echada gota a gota en el alginato, creando también esferas huecas.

Las células microencapsuladas se propagan fácilmente en reactores de tanque agitado y, con tamaños de perlas en el intervalo de 150-1500 μm de diámetro, se retienen fácilmente en un reactor perfundido usando una criba de malla fina. La razón del volumen de la cápsula con respecto al volumen total de los medios puede mantenerse tan denso como desde 1:2 hasta 1:10. Con densidades celulares intracapsulares de hasta 10^8 , la densidad celular eficaz en el cultivo es de $1-5 \times 10^7$.

Las ventajas de la microencapsulación sobre otros procesos incluyen la protección de los efectos perjudiciales de los esfuerzos de corte que se producen a partir de la inyección de vapor y agitación, la capacidad de retener fácilmente las perlas para el fin de usar sistemas perfundidos, aumentar a escala es relativamente sencillo y la capacidad de usar las perlas para implantación.

La presente invención describe células que son dependientes de anclaje por naturaleza. Las células 293, por ejemplo, son dependientes de anclaje, y cuando se hacen crecer en suspensión, las células se unirán entre sí y crecerán en grupos, asfixiando finalmente las células en el núcleo interno de cada grupo cuando alcanzan un tamaño que deja inestables las células del núcleo en las condiciones de cultivo. Por tanto, se necesita un medio eficaz de cultivo a gran escala de células dependientes de anclaje con el fin de emplear de manera eficaz estas células para generar grandes cantidades de adenovirus.

F) Sistemas de unión perfundidos

Los sistemas de unión perfundidos son una forma preferida de la presente invención. Perfusión se refiere al flujo

continuo a una tasa constante, a través o sobre una población de células (de una disolución de nutrientes fisiológica). Esto implica la retención de las células dentro de la unidad de cultivo en contraposición al cultivo de flujo continuo que arrastra las células con los medios retirados (por ejemplo, quimiostato). La idea de la perfusión se ha conocido desde el comienzo del siglo, y se ha aplicado para mantener pequeñas piezas de tejido viables para la observación microscópica extendida. La técnica se inició para imitar el medio de las células *in vivo* en el que las células se abastecen continuamente de sangre, plasma u otros fluidos corporales. Sin perfusión, las células en cultivo pasan por fases alternantes de alimentación e inanición, limitando así su crecimiento y potencial metabólico.

El uso actual del cultivo perfundido es en respuesta al reto de hacer crecer células a altas densidades (es decir, $0,1-5 \times 10^8$ células/ml). Con el fin de aumentar las densidades por encima de $2-4 \times 10^6$ células/ml, ha de sustituirse constantemente el medio con un suministro nuevo con el fin de compensar las deficiencias nutricionales y eliminar los productos tóxicos. La perfusión permite un control mucho mejor del entorno de cultivo (pH, pO_2 , niveles de nutriente, etc.) y es un medio para aumentar de manera significativa la utilización del área superficial en un cultivo para la unión celular.

El desarrollo de un reactor de lecho fijo perfundido usando una matriz de lecho de un material textil no tejido ha proporcionado un medio para mantener un cultivo de perfusión a densidades que exceden las 10^8 células/ml del volumen del lecho (CelliGen™, New Brunswick Scientific, Edison, NJ; Wang *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). Descrito brevemente, este reactor comprende un reactor mejorado para el cultivo de células tanto dependientes de anclaje como no dependientes de anclaje. El reactor está diseñado como un lecho fijo con un medio para proporcionar la recirculación interna. Preferiblemente, se coloca un soporte de matriz de fibra en una cesta dentro del vaso del reactor. Una parte superior e inferior de la cesta tiene orificios, permitiendo que el medio fluya a través de la cesta. Un rotor especialmente diseñado proporciona la recirculación del medio a través del espacio ocupado por la matriz de fibra para garantizar un suministro uniforme del nutriente y la eliminación de desechos. Esto garantiza simultáneamente que una cantidad insignificante de la masa celular total esté suspendida en el medio. La combinación de la cesta y la recirculación proporciona también un flujo libre de burbujas del medio oxigenado a través de la matriz de fibra. La matriz de fibra es un material textil no tejido que tiene un diámetro de "poro" de desde $10 \mu\text{m}$ hasta $100 \mu\text{m}$, proporcionando un alto volumen interno con volúmenes de poro correspondientes a de 1 a 20 veces los volúmenes de las células individuales.

En comparación con otros sistemas de cultivo, este enfoque ofrece varias ventajas significativas. Con un soporte de matriz de fibra, las fibras están protegidas frente al esfuerzo mecánico de la agitación y espumación. El flujo de medio libre que fluye a través de la cesta proporciona a las células niveles regulados óptimos de oxígeno, pH y nutrientes. Los productos pueden eliminarse de manera continua del cultivo y los productos recogidos están libres de células y pueden producirse en medio bajo en proteínas, lo que facilita las posteriores etapas de purificación. Además, el diseño único de este sistema de reactor ofrece un modo más sencillo de aumentar a escala el reactor. Actualmente, están disponibles tamaños de hasta 30 litros. Versiones de cien litros y 300 litros están en desarrollo y los cálculos teóricos soportan reactores de hasta 1000 litros. Esta tecnología se explica en detalle en el documento WO 94/17178 (4 de agosto de 1994, Freedman *et al.*), que se incorpora por el presente documento como referencia en su totalidad.

El módulo Cellcube™ (Coming-Costar) proporciona una gran área superficial estirénica para la inmovilización y el crecimiento de células unidas a sustrato. Es un dispositivo estéril de un sólo uso integralmente encapsulado que tiene una serie de placas de cultivo paralelas unidas para crear espacios de flujo laminar sellados finos entre placas adyacentes.

El módulo Cellcube™ tiene puertos de entrada y de salida que son diagonalmente opuestos entre sí y ayudan a regular el flujo de los medios. Durante los primeros pocos días de crecimiento, el cultivo se satisface generalmente por los medios contenidos en el sistema tras la siembra inicial. El tiempo entre la siembra inicial y el principio de la perfusión de los medios depende de la densidad de células en el inóculo de la siembra y la tasa de crecimiento celular. La medición de la concentración de nutriente en los medios en circulación es un buen indicador del estado del cultivo. Cuando se establece un procedimiento puede ser necesario monitorizar la composición de los nutrientes a varias tasas de perfusión diferentes para determinar los parámetros de funcionamiento más productivos y económicos.

Las células dentro del sistema alcanzan una densidad de disolución mayor (células/ml) que en sistemas de cultivo tradicionales. Muchos medios basales usados normalmente están diseñados para soportar $1-2 \times 10^6$ células/ml/día. Un Cellcube™ típico, que se hace funcionar con una superficie de 85.000 cm^2 , contiene aproximadamente 6 l de medio en el módulo. La densidad celular excede a menudo 10^7 células/ml en el vaso de cultivo. En confluencia, se requieren, por día, 2-4 volúmenes de medio de reactor.

Los parámetros y el control del tiempo de la fase de producción de los cultivos dependen del tipo y del uso de una línea celular en particular. Muchos cultivos requieren un medio diferente para la producción al que se requiere para la fase de crecimiento del cultivo. La transición desde una fase hasta la otra requerirá probablemente múltiples etapas de lavado en los cultivos tradicionales. Sin embargo, el sistema Cellcube™ emplea un sistema de perfusión. Uno de los beneficios de un sistema de este tipo es la capacidad de proporcionar una transición suave entre

diversas fases de funcionamiento. El sistema de perfusión invalida la necesidad de etapas de lavado tradicionales que tratan de eliminar los componentes séricos en un medio de crecimiento.

En una realización a modo de ejemplo de la presente invención, se usa el sistema CellCube™ para hacer crecer células transfectadas con AdCMVp53. Se inocularon las células 293 en el Cellcube™ según recomendación del fabricante. Las densidades celulares de inoculación estaban en el intervalo de $1-1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$. Se dejaron crecer las células durante 7 días a 37°C en condiciones de cultivo de pH = 7,20, saturación del aire OD = 60%. Se reguló la tasa de perfusión del medio según la concentración de glucosa en el Cellcube™. Un día antes de la infección viral, se cambió el medio para la perfusión desde un tampón que comprende FBS al 10% hasta un tampón que comprende FBS al 2%. En el día 8, se infectaron las células con virus a una multiplicidad de infección (MDI) de 5. Se detuvo la perfusión del medio durante 1 h inmediatamente después de la infección que se reanudó entonces durante el periodo restante de la fase de producción de virus. Se recogió el cultivo de 45-48 h tras la infección. Por supuesto, estas condiciones de cultivo son a modo de ejemplo y pueden variarse según las necesidades nutricionales y los requisitos de crecimiento de una línea celular en particular. Tal variación puede realizarse sin demasiada experimentación y se conoce bien por el experto habitual en la técnica.

G) Cultivo en suspensión libre de suero

En realizaciones particulares, se producen vectores adenovirales para terapia génica a partir del cultivo dependiente de anclaje de células 293 (células 293A) tal como se describió anteriormente. El aumento a escala de la producción del vector adenoviral está limitado por la dependencia de anclaje de las células 293A. Para facilitar el aumento a escala y satisfacer la demanda futura de vectores adenovirales, se han dedicado esfuerzos significativos al desarrollo de procesos de producción alternativos que pueden aumentarse a escala. Los métodos incluyen hacer crecer células 293A en cultivos sobre microsoporte y la adaptación de células 293A productoras en cultivos en suspensión. Anteriormente se han descrito técnicas de cultivo sobre microsoporte. Esta técnica se basa en la unión de las células productoras sobre las superficies de los microsoportes que están suspendidos en medios de cultivo mediante agitación mecánica. El requisito de unión celular puede presentar ciertas limitaciones para la escalabilidad de los cultivos sobre microsoporte.

Hasta la presente solicitud, no ha habido ningún informe del uso de células 293 en suspensión para la producción de vectores adenovirales para terapia génica. Además, las células 293 en suspensión notificadas requieren la presencia de FBS al 5-10% en los medios de cultivo para la producción de virus y el crecimiento celular óptimo. Históricamente, la presencia de proteínas de origen bovino en medios de cultivo celular ha dado lugar a problemas legislativos, en especial, recientemente debido al brote de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en algunos países. Ha de desarrollarse un proceso de purificación aguas abajo riguroso y complejo para eliminar del producto final las proteínas contaminantes y cualquier virus adventicio. Se considera que el desarrollo del cultivo en suspensión de 293 libre de suero es una mejora del proceso principal para la producción del vector adenoviral para terapia génica.

Los resultados de la producción de virus en frascos centrifugadores y en un biorreactor de tanque agitado de 3 l indican que la productividad del virus específica de las células 293SF era aproximadamente de $2,5 \times 10^4$ pv/célula, que es aproximadamente el 60-90% de la de las células 293A. Sin embargo, debido a la mayor concentración celular estacionaria, la productividad del virus volumétrica del cultivo de 293SF es esencialmente equivalente a la del cultivo de células 293A. Los inventores han observado también que la producción de virus aumentaba significativamente llevando a cabo un cambio por medio nuevo en el momento de la infección por virus. Los inventores van a evaluar los factores restrictivos en el medio.

Estos hallazgos permiten un proceso que puede validarse fácilmente, eficaz y escalable para la producción de vector adenoviral. Este método de adaptación no se limita solamente a células 293A y será igualmente útil cuando se aplique a otras células productoras de vectores adenovirales.

3. Métodos de lisis y recogida de las células.

La infección adenoviral da como resultado la lisis de las células que se infectan. Las características líticas de la infección por adenovirus permiten dos modos diferentes de producción de virus. Uno es recoger las células infectadas antes de la lisis celular. El otro modo es recoger el sobrenadante de virus tras la lisis celular completa por el virus producido. Para el último modo, se requieren tiempos de incubación más largos con el fin de conseguir la lisis celular completa. Este tiempo de incubación prolongado tras la infección por virus crea una seria preocupación sobre el aumento de la posibilidad de generación de adenovirus competente para la replicación (ACR), particularmente para los actuales vectores adenovirales de primera generación (vector con delección de E1). Por tanto, se eligió la recogida de las células infectadas antes de la lisis celular como el modo de producción de elección. La tabla 1 enumera los métodos más comunes que se han usado para lisar células tras la recogida de las células.

TABLA 1. Métodos usados para la lisis celular

Métodos Proc	edimientos	Observaciones
Congelación/descongelación	Ciclos entre hielo seco y baño de agua a 37°C	Fácil de llevar a cabo a escala de laboratorio. Alta eficacia de la lisis celular No escalable No recomendada para la fabricación a gran escala
Corte en sólido	Prensa francesa prensa de Hughes	Inversión en bienes de equipo Problemas de contención del virus Falta de experiencia
Lisis con detergente	Disoluciones de detergente no iónico tales como Tween, Triton, NP-40, etc.	Fácil de llevar a cabo tanto a escala de laboratorio como de fabricación Amplia variedad de elección de detergente Problemas de detergente residual en el producto acabado
Lisis de disolución hipotónica	Agua, tampón cítrico	Baja eficacia de la lisis
Corte en líquido	Microfluidizador chorro incidente homogeneizador	Inversión en bienes de equipo Problemas de contención del virus Problemas de escalabilidad
Sonicación	ultrasonidos	Inversión en bienes de equipo Problemas de contención del virus Contaminación acústica Problemas de escalabilidad

A) Detergentes

5 Las células están rodeadas por membranas. Con el fin de liberar componentes de la célula, es necesario abrir las células forzándolas. La manera más ventajosa en que esto puede conseguirse, según la presente invención, es solubilizar las membranas con el uso de detergentes. Los detergentes son moléculas anfipáticas con un extremo apolar de naturaleza aromática o alifática y un extremo polar que puede estar cargado o no cargado. Los
10 detergentes son más hidrófilos que los lípidos y por tanto tienen mayor solubilidad en agua que los lípidos. Éstos permiten la dispersión de compuestos insolubles en agua en medios acuosos y se usan para aislar y purificar proteínas en una forma nativa.

15 Los detergentes pueden ser desnaturizantes o no desnaturizantes. El primero puede ser aniónico, tal como dodecilsulfato de sodio o catiónico tal como bromuro de etiltrimetilamonio. Estos detergentes deterioran totalmente las membranas y desnaturizan la proteína rompiendo las interacciones proteína-proteína. Los detergentes no
20 desnaturizantes pueden dividirse en detergentes no aniónicos tales como Triton[®]X-100, sales biliares tales como colatos y detergentes zwitteriónicos tales como CHAPS. Los zwitteriónicos contienen grupos tanto catiónicos como aniónicos en la misma molécula, la carga eléctrica positiva se neutraliza por la carga negativa sobre la molécula adyacente o la misma.

25 Los agentes desnaturizantes tales como SDS se unen a las proteínas como monómeros y la reacción se impulsa por el equilibrio hasta que se satura. Por tanto, la concentración libre de monómeros determina la concentración de detergente necesaria. La unión de SDS es cooperativa, es decir, la unión de una molécula de SDS aumenta la probabilidad de unión de otra molécula a esa proteína, y transforma las proteínas en bastones cuya longitud es proporcional a su peso molecular.

30 Los agentes no desnaturizantes tales como Triton[®]X-100 ni se unen a conformaciones nativas ni tienen un mecanismo de unión cooperativo. Estos detergentes tienen restos apolares voluminosos y rígidos que no penetran en proteínas solubles en agua. Se unen a las partes hidrófobas de las proteínas. Triton[®]X100 y otros detergentes no aniónicos de polioxietileno son ineficaces para romper la interacción proteína-proteína y pueden provocar agregaciones de artefacto de proteínas. Estos detergentes, sin embargo, deterioran las interacciones proteína-lípido pero son mucho más suaves y pueden mantener la forma nativa y las capacidades funcionales de las proteínas.

35 La eliminación del detergente puede intentarse de varias maneras. La diálisis funciona bien con detergentes que existen como monómeros. La diálisis es un tanto ineficaz con detergentes que se agregan fácilmente para formar micelas ya que las micelas son demasiado grandes para pasar a través de la diálisis. La cromatografía de intercambio iónico puede utilizarse para sortear este problema. Se aplica la disolución de proteína deteriorada a una columna de cromatografía de intercambio iónico y luego se lava la columna con tampón menos detergente. El
40 detergente se eliminará como resultado del equilibrio del tampón con la disolución de detergente. Alternativamente,

la disolución de proteína puede pasarse a través de un gradiente de densidad. Según la proteína sedimenta a través de los gradientes, el detergente se soltará debido al potencial químico.

A menudo, un único detergente no es lo suficiente versátil para la solubilización y el análisis del medio de proteínas encontradas en una célula. Las proteínas pueden solubilizarse en un detergente y luego colocarse en otro detergente adecuado para el análisis de la proteína. Las micelas de detergente-proteína formadas en la primera etapa deben separarse de las micelas de detergente puro. Cuando éstas se añaden a un exceso del detergente para análisis, la proteína se encuentra en micelas con ambos detergentes. La separación de micelas de detergente-proteína puede lograrse con cromatografía de filtración en gel o de intercambio iónico, separaciones de tipo de densidad de flotación o diálisis.

Detergentes Tween®: Los detergentes Tween® son detergentes no iónicos, no desnaturizantes. Son ésteres de polioxietilensorbitano de ácidos grasos. Los detergentes Tween® 20 y Tween® 80 se usan como agentes bloqueantes en aplicaciones bioquímicas y se añaden normalmente a disoluciones de proteínas para evitar la unión no específica a materiales hidrófobos tales como plásticos o nitrocelulosa. Se han usado como agentes bloqueantes en ELISA y aplicaciones de inmunotransferencia. De manera general, estos detergentes se usan a concentraciones del 0,01-1,0% para evitar la unión no específica a materiales hidrófobos.

Tween® 20 y otros detergentes no iónicos han demostrado eliminar algunas proteínas de la superficie de la nitrocelulosa. Tween® 80 se ha usado para solubilizar proteínas de membrana, presentar la unión no específica de proteínas a placas de cultivo tisular de plástico de múltiples pocillos y para reducir la unión no específica mediante proteínas séricas y proteína A biotinilada a placas de poliestireno en ELISA.

La diferencia entre estos detergentes es la longitud de la cadena de ácido graso. Tween® 80 se deriva del ácido oleico con una cadena C₁₈ mientras que Tween® 20 se deriva del ácido láurico con una cadena C₁₂. La cadena de ácido graso más larga hace al detergente Tween® 80 menos hidrófilo que el detergente Tween® 20. Ambos detergentes son muy solubles en agua.

Los detergentes Tween® son difíciles de eliminar de la disolución mediante diálisis, pero Tween® 20 puede eliminarse mediante geles eliminadores de detergente. La cadena de polioxietileno encontrada en estos detergentes los hace susceptibles de oxidación (formación de peróxido) tal como sucede con los detergentes de las series Triton® X y Brij®.

4. Métodos de concentración y filtración

La presente invención emplea métodos de purificación del bruto de adenovirus a partir del lisado celular. Estos métodos incluyen clarificación, concentración y diafiltración. La etapa inicial de este proceso de purificación es la clarificación del lisado celular para eliminar la materia particulada grande, particularmente componentes celulares a partir del lisado celular. La clarificación del lisado puede conseguirse usando un filtro profundo o mediante filtración de flujo tangencial. En una realización preferida de la presente invención, se hace pasar el lisado celular a través de un filtro profundo, que consiste en una columna compacta de material relativamente no adsorbente (por ejemplo resinas de poliéster, arena, tierra diatomácea, coloides, geles y similares). En la filtración de flujo tangencial (TFF, tangencial flow filtration), la disolución de lisado fluye a través de una superficie de la membrana que facilita la retrodifusión de soluto desde la superficie de la membrana a la disolución en masa. Generalmente se disponen las membranas en diversos tipos de aparatos de filtro, que incluyen estructura y placa de canal abierto, fibras huecas y túbulos.

Tras la clarificación y prefiltración del lisado celular, en primer lugar se concentra el sobrenadante de virus resultante y luego se cambia el tampón mediante diafiltración. Se concentra el sobrenadante de virus mediante filtración de flujo tangencial a través de una membrana de ultrafiltración de límite de peso molecular nominal de 100-300K. La ultrafiltración es un proceso convectivo modificado por la presión que usa membranas semipermeables para separar especies por su tamaño molecular, forma y/o carga. Separa los disolventes de los solutos de diversos tamaños, independientemente del tamaño molecular del soluto. La ultrafiltración es suave, eficaz y puede usarse simultáneamente para concentrar y desalar disoluciones. Las membranas de ultrafiltración tienen generalmente dos capas distintas: una capa densa, fina (0,1-1,5 µm), con un diámetro de poro de 10-400 angstroms y una subestructura abierta de huecos progresivamente mayores que se abren ampliamente hacia la cara de permeado del filtro de ultrafiltración. Por tanto, cualquier especie que pueda pasar a través de los poros de la capa puede pasar libremente a través de la membrana. Para la retención máxima de soluto, se selecciona una membrana que tiene un límite de peso molecular nominal bastante por debajo del de las especies que se retienen. En la concentración macromolecular, la membrana enriquece el contenido de las especies biológicas deseadas y proporciona el filtrado aclarado de sustancias retenidas. Se eliminan de manera convectiva los microsolutos con el disolvente. Según aumenta la concentración de soluto retenido, la tasa de ultrafiltración disminuye.

La diafiltración o el cambio de tampón usando ultrafiltros, es una manera ideal de eliminación y cambio de la separación de sales, azúcares y disolventes no acuosos de especies libres a unidas, eliminación de material de bajo peso molecular, o cambio rápido de entornos de pH e iónicos. Los microsolutos se eliminan lo más eficazmente

añadiendo disolvente a la disolución que se somete a ultrafiltración a una tasa igual a la tasa de ultrafiltración. Esto lava las especies de la disolución en un volumen constante, purificando las especies retenidas. La presente invención utiliza una etapa de diafiltración para cambiar el tampón del sobrenadante de virus antes del tratamiento con Benzonase®.

5

5. Infección viral

La presente invención emplea, en un ejemplo, la infección adenoviral de células con el fin de generar vectores terapéuticamente significativos. Normalmente, se expondrá el virus simplemente a la célula huésped apropiada en condiciones fisiológicas, permitiendo la captación del virus, tal como se menciona a continuación.

10

Adenovirus

El adenovirus es particularmente adecuado para su uso como vector de transferencia génica debido a su genoma de ADN de tamaño medio, facilidad de manipulación, título alto, amplio intervalo de célula diana y alta infectividad. El genoma viral de aproximadamente 36 kB está limitado por repeticiones terminales invertidas (RTI) de 100-200 pares de bases (pb), en las que están contenidos los elementos que actúan en *cis* necesarios para el empaquetamiento y la replicación de ADN viral. Las regiones temprana (E, "early") y tardía (L, "late") del genoma que contienen unidades de transcripción diferentes se dividen por el inicio de la replicación de ADN viral.

15

La región E1 (E1A y E1B) codifica para proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral y algunos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las proteínas para la replicación de ADN viral. Estas proteínas están implicadas en la replicación de ADN, expresión génica tardía, y corte de la célula huésped (Renan, 1990). Los productos de los genes tardíos (L1, L2, L3, L4 y L5), que incluyen la mayoría de las proteínas de la cápsida viral, se expresan solamente tras el procesamiento significativo de un solo transcrito primario emitido por el promotor tardío principal (PTP). El PTP (situado en 16,8 unidades de mapeo) es particularmente eficaz durante la fase tardía de infección, y todo el ARNm emitido a partir de este promotor presenta una secuencia líder tripartita 5' (LT) que los hace ser los ARNm preferidos para la traducción.

20

Con el fin de optimizar los adenovirus para la terapia génica, es necesario maximizar la capacidad de carga de modo que puedan incluirse grandes segmentos de ADN. También es muy deseable reducir la toxicidad y reacción inmunológica asociada con determinados productos adenovirales. La eliminación de grandes partes del genoma adenoviral, y proporcionar los productos génicos con deleciones en *trans*, mediante virus auxiliar y/o células auxiliares, permite la inserción de grandes partes de ADN heterólogo en el vector. Esta estrategia dará también como resultado toxicidad reducida e inmunogenicidad de los productos génicos de adenovirus.

25

El gran desplazamiento de ADN es posible ya que todos los elementos en *cis* requeridos para la replicación del ADN viral se localizan en las repeticiones terminales invertidas (RTI) (100-200 pb) en cualquier extremo del genoma viral lineal. Los plásmidos que contienen RTI pueden replicarse en presencia de un adenovirus no defectuoso (Hay *et al.*, 1984). Por tanto, la inclusión de estos elementos en un vector adenoviral debe permitir la replicación.

30

Además, la señal de empaquetamiento para la encapsidación viral se localiza entre 194-385 pb (0,5-1,1 unidades de mapeo) en el extremo izquierdo del genoma viral (Hearing *et al.*, 1987). Esta señal imita el sitio de reconocimiento de proteínas en ADN de bacteriófago λ , en el que una secuencia específica próxima al extremo izquierdo, pero fuera de la secuencia del extremo cohesivo, media la unión a proteínas que se requieren para la inserción del ADN en la estructura primaria. Los vectores de sustitución E1 de Ad han demostrado que un fragmento de 450 pb (0-1,25 unidades de mapeo) en el extremo izquierdo del genoma viral podía dirigir el empaquetamiento en células 293 (Levrero *et al.*, 1991).

35

Anteriormente se ha demostrado que determinadas regiones del genoma adenoviral pueden incorporarse en el genoma de células de mamífero y los genes codificados así expresados. Estas líneas celulares pueden soportar la replicación de un vector adenoviral que es deficiente en la función adenoviral codificada por la línea celular. También ha habido informes de la complementación de vectores adenovirales deficientes en replicación mediante vectores "cooperantes", por ejemplo, virus de tipo natural o mutantes condicionalmente defectuosos.

40

Los vectores adenovirales deficientes en replicación pueden complementarse, en *trans*, mediante virus auxiliares. Esta observación sola no permite el aislamiento de los vectores deficientes en replicación, sin embargo, ya que la presencia de virus auxiliar, necesaria para proporcionar funciones de replicación, contaminaría cualquier preparación. Por tanto, se necesitó un elemento adicional que añadiría especificidad a la replicación y/o al empaquetamiento del vector deficiente en replicación. Ese elemento, tal como se proporciona en la presente invención, proviene de la función de empaquetamiento de adenovirus.

45

Se ha demostrado que existe una señal de empaquetamiento para adenovirus en el extremo izquierdo del mapa de adenovirus convencional (Tibbetts, 1977). Estudios posteriores demostraron que un mutante con una deleción en la región E1A (194-358 pb) del genoma crecía poco incluso en una línea celular que complementaba la función temprana (E1A) (Hearing y Shenk, 1983). Cuando se recombinó un ADN adenoviral de compensación (0-353 pb) en

50

55

60

65

el extremo derecho del mutante, el virus se empaquetó normalmente. Análisis mutacionales adicionales identificaron un elemento dependiente de la posición, repetido, corto, en el extremo izquierdo del genoma del Ad5. Se encontró que una copia de la secuencia de repetición era suficiente para el empaquetamiento eficaz si estuviera presente en cualquier extremo del genoma, pero no cuando se movía hacia el interior de la molécula de ADN del Ad5 (Hearing *et al.*, 1987).

Usando versiones mutadas de la señal de empaquetamiento, es posible crear virus auxiliares que se empaquetan con eficacias variables. Normalmente, las mutaciones son deleciones o mutaciones puntuales. Cuando los virus auxiliares con baja eficacia de empaquetamiento se hacen crecer en células auxiliares, el virus se empaqueta, aunque a tasas reducidas en comparación con virus de tipo natural, permitiendo así la propagación del auxiliar. Cuando se hacen crecer estos virus auxiliares en células junto con virus que contiene señales de empaquetamiento del tipo natural, sin embargo, se reconocen preferentemente las señales de empaquetamiento de tipo natural sobre las versiones con mutaciones. Dada una cantidad limitante de factor de empaquetamiento, el virus que contiene las señales de tipo natural se empaquetan de manera selectiva si se compara con los auxiliares. Si la preferencia es lo suficientemente grande, deben conseguirse disoluciones madre casi homogéneas.

6. Ingeniería de vectores virales

En determinadas realizaciones, la presente invención implica además la manipulación de vectores virales. Los métodos de este tipo implican el uso de un constructo de vector que contiene, por ejemplo, un ADN heterólogo que codifica para un gen de interés y un medio para su expresión, la replica del vector en una célula auxiliar apropiada, la obtención de partículas virales producidas del mismo, y la infección de las células con las partículas del virus recombinante. El gen podría codificar simplemente para una proteína para la que se desean grandes cantidades de la proteína, es decir, métodos de producción *in vitro* a gran escala. Alternativamente, el gen podría ser un gen terapéutico, por ejemplo para tratar células cancerosas, para expresar genes inmunomoduladores para combatir infecciones virales o para sustituir una función génica como resultado de un defecto genético. En el contexto del vector de terapia génica, el gen será un ADN heterólogo, que incluirá ADN derivado de un origen distinto al genoma viral que proporciona la estructura principal del vector. Finalmente, el virus puede actuar como una vacuna viral viva y expresar un antígeno de interés para la producción de anticuerpos contra el mismo. El gen puede derivarse de una fuente procariota o eucariota tal como una bacteria, un virus, una levadura, un parásito, un vegetal, o incluso un animal. El ADN heterólogo puede también derivarse de más de una fuente, es decir, un constructo multigénico o una proteína de fusión. El ADN heterólogo puede también incluir una secuencia reguladora que puede derivarse de una fuente, y el gen de una fuente diferente.

A) Genes terapéuticos

El p53 está reconocido en la actualidad como un gen supresor de tumores (Montenarh, 1992).

Se han encontrado altos niveles de p53 mutante en muchas células transformadas mediante carcinogénesis química, radiación ultravioleta y varios virus, incluyendo el SV40. El gen p53 es una diana frecuente de inactivación mutacional en una amplia variedad de tumores humanos y se ha documentado ya que es el gen más frecuentemente mutado en cánceres humanos comunes (Mercer, 1992). Está mutado en más del 50% de NSCLC humano (Hollestein *et al.*, 1991) y en un amplio espectro de otros tumores.

El gen p53 codifica para una fosfoproteína de 393 aminoácidos que puede formar complejos con las proteínas huéspedes tales como el antígeno T grande y E1B. La proteína se encuentra en células y tejidos normales, pero a concentraciones que son generalmente insignificantes en comparación con tejido tumoral o células transformadas. De manera interesante, el p53 de tipo natural parece ser importante en la regulación de la división y el crecimiento celular. Se ha demostrado que en algunos casos, el p53 de tipo natural es antiproliferativo en líneas celulares tumorales humanas. Por tanto, p53 puede actuar como un regulador negativo del crecimiento celular (Weinberg, 1991) y puede suprimir directamente el crecimiento celular incontrolado o activar directa o indirectamente genes que suprimen este crecimiento. Por tanto, la ausencia o inactivación del p53 de tipo natural puede contribuir a la transformación. Sin embargo, algunos estudios indican que la presencia del p53 mutante puede ser necesaria para la expresión completa del potencial de transformación del gen.

El p53 de tipo natural está reconocido como un importante regulador del crecimiento en muchos tipos celulares. Las mutaciones con cambio de sentido son comunes en el gen p53 y se sabe que aparecen en al menos 30 codones distintos, creando a menudo alelos dominantes que producen cambios en el fenotipo celular sin una reducción hasta la homocigosis. Adicionalmente, muchos de estos alelos negativos dominantes parecen tolerarse en el organismo y pasar a la línea germinal. Diversos alelos mutantes parecen oscilar desde alelos negativos dominantes disfuncionales en grado mínimo hasta fuertemente penetrantes (Weinberg, 1991).

Casey y colegas han informado que la transfección de ADN que codifica para el p53 de tipo natural en dos líneas celulares de cáncer de mama humano, restablece el control de la supresión del crecimiento en tales células (Casey *et al.*, 1991). Se ha demostrado también un efecto similar en la transfección del p53 tipo natural, pero no mutante, en líneas celulares de cáncer de pulmón humano (Takahasi *et al.*, 1992). El p53 aparece como dominante sobre el gen

mutante y seleccionará en contra de la proliferación cuando se transfecte en células con el gen mutante. La expresión normal del p53 transfectado no es perjudicial para las células normales con el p53 de tipo natural endógeno. Por tanto, los constructos de este tipo pueden tomarse por células normales sin efectos adversos. Por tanto, se propone que el tratamiento de cánceres asociados al p53 con constructos de expresión del p53 de tipo natural reducirá el número de células malignas o de su tasa de crecimiento. Además, estudios recientes proponen que algunos tumores de tipo natural del p53 son también sensibles a los efectos de la expresión del p53 exógeno.

Las transiciones principales del ciclo celular eucariota se desencadenan mediante cinasas dependientes de ciclina, o CDK. Una CDK, la cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), regula la progresión a través de la fase G₁. La actividad de esta enzima puede ser fosforilar Rb en la G₁ tardía. La actividad de la CDK4 se controla por una subunidad activante, la ciclina de tipo D y por una subunidad inhibidora, por ejemplo el p16^{INK4}, que se ha caracterizado bioquímicamente como una proteína que se une específicamente a, y que inhibe la CDK4, y por tanto puede regular la fosforilación de la Rb (Serrano *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1995). Debido a que la proteína p16^{INK4} es un inhibidor de CDK4 (Serrano, 1993), la delección de este gen puede aumentar la actividad de la CDK4, dando como resultado la hiperfosforilación de la proteína Rb. Se sabe también que el p16 regula la función de la CDK6.

El p16^{INK4} pertenece a una clase descrita recientemente de proteínas inhibidoras de las CDK, que incluye también al p16^B, al p21^{WAF1, CIP1, SDH1}, y al p27^{KIP1}. El gen p16^{INK4} se encuentra en 9p21, una región cromosómica que frecuentemente presenta delecciones en muchos tipos de tumores. Las delecciones y mutaciones homocigotas del gen p16^{INK4} son frecuentes en líneas celulares tumorales humanas. Este indicio sugiere que el gen p16^{INK4} es un gen supresor de tumores. Se ha cuestionado esta interpretación, sin embargo, por la observación de que la frecuencia de las alteraciones del gen p16^{INK4} es muy inferior en tumores no cultivados primarios que en líneas celulares cultivadas (Caldas *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Hussussian *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994a; Kamb *et al.*, 1994b; Mori *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1995; Orlow *et al.*, 1994; Arap *et al.*, 1995). La restauración de la función del p16^{INK4} de tipo natural mediante la transfección con un vector de expresión plasmídico redujo la formación de colonias en algunas líneas celulares cancerígenas humanas. (Okamoto, 1994; Arap, 1995).

El C-CAM se expresa en casi todas las células epiteliales (Odin y Obrink, 1987). El C-CAM, con un peso molecular aparente de 105 kD, se aisló originariamente a partir de la membrana plasmática del hepatocito de rata mediante su reacción con anticuerpos específicos que neutralizan la agregación celular (Obrink, 1991). Estudios recientes indican que, estructuralmente, el C-CAM pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y su secuencia es altamente homóloga al antígeno carcinoembrionario (CEA) (Lin y Guidotti, 1989). Usando un sistema de expresión de baculovirus, Cheung *et al.* (1993a; 1993b y 1993c) demostraron que el primer dominio de Ig del C-CAM es crítico para la actividad de adhesión celular.

Se sabe que las moléculas de adhesión celular, o CAM, están implicadas en una red compleja de interacciones moleculares que regulan el desarrollo de órganos y la diferenciación celular (Edelman, 1985). Datos recientes indican que la expresión aberrante de los CAM puede estar implicada en la oncogenia de varios neoplasmas; por ejemplo, la expresión disminuida de la E-cadherina, que se expresa en su mayoría en células epiteliales, está asociada a la progresión de varias clases de neoplasmas (Edelman y Crossin, 1991; Frixen *et al.*, 1991; Bussemakers *et al.*, 1992; Matsura *et al.*, 1992; Umbas *et al.*, 1992). Además, Giancotti y Ruoslahti (1990) demostraron que la expresión creciente de la integrina $\alpha_5\beta_1$ mediante transferencia génica puede reducir la tumorigenicidad de células de ovario de hámster chino *in vivo*. Se ha demostrado que C-CAM suprime el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*.

Otros supresores tumorales que pueden emplearse según la presente invención incluyen RB, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, BRCA1, VHL, FCC, MMAC1, MCC, p16, p21, p57, C-CAM, p27 y BRCA2. Inductores de apoptosis, tales como las proteasas Bax, Bak, Bcl-X_s, Bik, Bid, Harakiri, Ad E1B, Bad y ICE-CED3, podrían encontrar utilidad, de manera similar, según la presente invención.

Diversos genes de enzimas son de interés según la presente invención. Tales enzimas incluyen la citosina desaminasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, fenilalanina hidroxilasa, glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, α -L-iduronidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, timidina cinasa del HSV y timidina cinasa humana.

Las hormonas son otro grupo de genes que pueden usarse en los vectores descritos en el presente documento. Se incluyen las hormonas del crecimiento, prolactina, coriomamotropina, lutropina, folitropina, gonadotropina coriónica, tirotropina, leptina, corticotropina (ACTH), angiotensina I y II, β -endorfina, β -melanotropina (β -MSH), colecistocinina, endotelina I, galanina, péptido inhibidor gástrico (GIP), glucagón, insulina, lipotropinas, neurofisinas, somatostatina, calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), péptido relacionado con el gen de la β -calcitonina, hipercalcemia del factor de tumor maligno (1-40), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (107-139) (PTH-rP), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (107-111) (PTH-rP), péptido de tipo glucagón (GLP-1), pancreastatina, péptido pancreático, péptido YY, PHM, secretina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), oxitocina, vasopresina (AVP), vasotocina, encefalinamida, metorfinamida, alfa-melanotropina (alfa-MSH), factor natriurético auricular (5-28) (ANF), amilina, componente P amiloide (SAP-1), corticoliberina (CRH), factor de liberación de la hormona del crecimiento (GHRH), luliberina (LHRH), neuropéptido Y, sustancia K (neurocinina A), sustancia P y

tiroliberina (TRH).

Otras clases de genes que se consideran para insertarse en los vectores de la presente invención incluyen interleucinas y citocinas. Interleucina I (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 IL-12, GM-CSF y G-CSF.

Ejemplos de enfermedades para las que el presente vector viral sería útil incluyen, pero no se limitan a, deficiencia de adenosina desaminasa, deficiencia del factor IX de coagulación sanguíneo humano en hemofilia B y fibrosis quística, que implicarían la sustitución del gen receptor transmembrana de la fibrosis quística. Los vectores realizados en la presente invención podrían usarse también para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como artritis reumatoide o reestenosis mediante la transferencia de genes que codifican para inhibidores de la angiogénesis o inhibidores del ciclo celular. La transferencia de activadores de profármaco tales como el gen HSV-TK puede usarse también en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos, incluyendo el cáncer.

B) Constructos antisentido

Oncogenes tales como *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fms*, *jun*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *bcl* y *abl* son también dianas adecuadas. Sin embargo, para fines terapéuticos, estos oncogenes se expresarían como un ácido nucleico antisentido, de modo que se inhibe la expresión del oncogén. El término "ácido nucleico antisentido" se refiere a los oligonucleótidos que complementan las secuencias de bases de ARN y ADN que codifican para oncogén. Los oligonucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, se unen específicamente a su ácido nucleico diana y afectan a la transcripción, procesado de ARN, transporte y/o traducción. La selección como diana del ADN de cadena doble (ds) con oligonucleótidos conduce a la formación de triple hélice; la selección como diana del ARN conducirá a la formación de la doble hélice.

Los constructos antisentido pueden diseñarse para unirse al promotor y otras regiones de control, exones, intrones o incluso límites exón-intrón de un gen. Pueden emplearse constructos de ARN antisentido, o ADN que codifica para tales ARN antisentido, para inhibir la traducción o transcripción génica o ambas, en una célula huésped, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, tal como en un animal huésped, incluyendo un sujeto humano. Las secuencias de ácido nucleico que comprenden "nucleótidos complementarios" son las que pueden realizar el apareamiento de bases según el modelo complementario de Watson-Crick habitual. Es decir, que las purinas más grandes aparearán las bases con las pirimidinas más pequeñas para formar solamente combinaciones de guanina apareada con citosina (G:C) y o bien adenina apareada con timina (A:T), en el caso del ADN, o bien adenina apareada con uracilo (A:U) en el caso del ARN.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "complementario" o "secuencias antisentido" significan secuencias de ácido nucleico que son complementarios de manera sustancial a lo largo de toda su longitud y tienen muy pocos apareamientos erróneos. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos de quince bases de longitud pueden denominarse complementarias cuando tienen un nucleótido complementario en las posiciones trece o catorce con solamente apareamientos erróneos sencillos o dobles. Naturalmente, las secuencias de ácidos nucleicos que son "completamente complementarias" serán secuencias de ácidos nucleicos que son totalmente complementarias a lo largo de toda su longitud y no tienen apareamientos de bases erróneos.

Mientras que puede emplearse toda o parte de la secuencia génica en el contexto de la construcción antisentido, estadísticamente, cualquier secuencia de 17 bases de longitud debe aparecer solamente una vez en el genoma humano y, por tanto, bastar para especificar una secuencia diana única. Aunque oligómeros más cortos son más fáciles de producir y aumentan la accesibilidad *in vivo*, gran número de otros factores están implicados en la determinación de la especificidad de hibridación. Tanto la afinidad de unión como la especificidad de la secuencia de un oligonucleótido por su diana complementaria aumentan con la longitud creciente. Se contempla que se usarán oligonucleótidos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más pares de bases. Puede determinarse fácilmente si un ácido nucleico antisentido dado es eficaz en la selección como objetivo del gen de la célula huésped correspondiente, simplemente sometiendo a prueba a los constructos *in vitro* para determinar si se ve afectada la función del gen endógeno o si se ve afectada la expresión de los genes relacionados que tienen secuencias complementarias.

En determinadas realizaciones, puede desearse emplear constructos antisentido que incluyen otros elementos, por ejemplo, los que incluyen propinopirimidinas C-5. Se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen análogos de propino C-5 de uridina y citidina se unen al ARN con gran afinidad y que son inhibidores antisentido potentes de la expresión génica (Wagner *et al.*, 1993).

Como alternativa al suministro antisentido dirigido, pueden usarse ribozimas dirigidas. El término "ribozima" se refiere a una enzima basada en ARN que puede seleccionar como diana y escindir secuencias de bases particulares en ARN y ADN oncogénico. Las ribozimas pueden o bien dirigirse directamente a las células, en forma de oligonucleótidos de ARN que incorporan secuencias de ribozima, o bien introducirse en la célula como un constructo de expresión que codifica para el ARN de ribozima deseado. Las ribozimas pueden usarse y aplicarse casi del mismo modo que se describió para los ácidos nucleicos antisentido.

C) Antígenos para vacunas

Otros genes terapéuticos pueden incluir genes que codifican para antígenos tales como antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos o antígenos parasitarios. Los virus incluyen picornavirus, virus corona, togavirus, flavivirus, rabdovirus, paramixovirus, ortomixovirus, bunyavirus, arenavirus, reovirus, retrovirus, papovavirus, parvovirus, herpesvirus, poxvirus, hepadnavirus y virus espongiiforme. Las dianas virales preferidas incluyen gripe, virus de herpes simple 1 y 2, sarampión, viruela, poliomielitis o VIH. Los patógenos incluyen tripanosomas, céstodos, nemátodos, helmintos. Además, pueden seleccionarse como objetivo de este modo marcadores tumorales, tales como antígeno fetal o antígeno específico de la próstata. Los ejemplos preferidos incluyen proteínas env de VIH y antígeno de superficie de hepatitis B. La administración de un vector según la presente invención para fines de vacunación requeriría que los antígenos asociados a vector fueran suficientemente no inmunógenos para permitir la expresión a largo plazo del transgén, para lo que se desearía una fuerte respuesta inmune. Preferiblemente, la vacunación de un individuo solamente se requeriría con poca frecuencia, tal como anual o bienalmente, y proporcionaría protección inmunológica a largo plazo frente al agente infeccioso.

D) Regiones de control

Con el fin de que el vector viral efectúe la expresión de un transcrito que codifica para un gen terapéutico, el polinucleótido que codifica para el gen terapéutico estará bajo control transcripcional de un promotor y una señal de poliadenilación. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula huésped, o maquinaria sintética introducida, que se requiere para iniciar la transcripción específica de un gen. Una señal de poliadenilación se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula huésped, o maquinaria sintética introducida que se requiere para dirigir la adición de una serie de nucleótidos sobre el extremo del transcrito de ARNm para el tráfico y el procesado apropiado del transcrito fuera del núcleo hacia el citoplasma para la traducción. La frase "bajo control transcripcional" significa que el promotor está en la posición correcta en relación al polinucleótido para controlar la expresión y la iniciación, mediante la ARN polimerasa, del polinucleótido.

El término promotor se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que están agrupados alrededor del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II. Muchas de las reflexiones sobre cómo están organizados los promotores derivan de análisis de varios promotores virales, incluyendo las unidades de transcripción temprana del SV40 y la timidina cinasa (tk) del HSV. Estos estudios, que han aumentado por estudios más recientes, han demostrado que los promotores están compuestos por módulos funcionales diferenciados, que consisten cada uno en aproximadamente 7-20 pb de ADN, y que contienen uno o más sitios de reconocimiento para proteínas represoras o activadoras transcripcionales.

Al menos un modulo en cada promotor funciona para situar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo de esto mejor conocido es la secuencia TATA, pero en algunos promotores que carecen de una secuencia TATA, tales como el promotor para el gen de la desoxinucleotidiltransferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos del SV40, un elemento diferenciado que recubre el propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de la iniciación.

Los elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, éstos se localizan en la región a 30-110 pb en el sentido de 5' del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores contienen también elementos funcionales en el sentido de 3' del sitio de inicio. La separación entre los elementos promotores es frecuentemente flexible, de modo que se conserva la función promotora cuando se invierten los elementos o se mueven uno en relación a otro. En el promotor de tk la separación entre los elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb de separación antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar o bien cooperativamente o bien independientemente para activar la transcripción.

No se cree que sea crítico el promotor particular que se emplea para controlar la expresión de un gen terapéutico, siempre que pueda expresar el polinucleótido en la célula diana. Por tanto, si se selecciona como objetivo una célula humana, es preferible situar la región que codifica al polinucleótido adyacente a y bajo el control de un promotor que puede expresarse en una célula humana. De manera general, un promotor de este tipo puede incluir un promotor o bien viral o bien humano. En la tabla 2 se proporciona una lista de promotores.

TABLA 2

PROMOTOR
Cadena pesada de inmunoglobulina
Cadena ligera de inmunoglobulina
Receptor de células T
HLA DQ α y DQ β
β -interferón

Interleucina-2
Receptor de interleucina-2
MHC clase II 5
MHC clase II HLA-DR α
β -actina
Creatina cinasa muscular
Prealbúmina (transtiretina)
Elastasa I
Metalotioneína
Colagenasa
Gen de albúmina
α -fetoproteína
τ -globina
β -globina
c-fos
c-HA-ras
Insulina
Molécula de adhesión celular neural (NCAM)
α 1-antitripsina
Histona H2B (TH2B)
Colágeno de tipo I o de ratón
Proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78)
Hormona del crecimiento de rata
Amiloide A de suero humano (SAA)
Troponina I (TN I)
Factor del crecimiento derivado de plaquetas
Distrofia muscular de Duchenne
SV40
Polioma
Retrovirus
Virus del papiloma
Virus de la hepatitis B
Virus de la inmunodeficiencia humana
Citomegalovirus
Virus de la leucemia del mono gibón

El promotor puede caracterizarse además como un promotor inducible. Un promotor inducible es un promotor que es inactivo o que muestra baja actividad excepto en presencia de una sustancia inductora. Algunos ejemplos de promotores que pueden incluirse como parte de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, MT II, MMTV, colagenasa, estromelisina, SV40, gen MX murino, α -2-macroglobulina, gen h-2kb del MHC de clase I, HSP70, proliferina, factor de necrosis tumoral o gen de la hormona α estimulante del tiroides. En la tabla 3 se muestran los inductores asociados. Se entiende que puede usarse cualquier promotor inducible en la puesta en práctica de la presente invención y que todos los promotores de este tipo entrarían dentro del espíritu y del alcance de la invención reivindicada.

5

10

TABLA 3

Elemento Induc	tor
MT II	Ester de forbol (TPA) Metales pesados
MMTV (virus de tumor mamario de ratón)	Glucocorticoides
β -interferón	Poli(r)X Poli(rc)
E2 de adenovirus 5	Ela
c-jun	Éster de forbol (TPA), H ₂ O ₂
Colagenasa	Éster de forbol (TPA)
Estromelisina	Éster de forbol (TPA), IL-1
SV40	Éster de forbol (TPA)
Gen MX murino	Interferón, virus de la enfermedad de Newcastle
Gen GRP78	A23187
α -2-macroglobulina	IL-6
Vimentina	Suero
gen h-2kb del MHC de clase I	Interferón

HSP70	Ela, antígeno T grande del SV40
Proliferina	Éster de forbol (TPA)
Factor de necrosis tumoral	FMA
Gen de la hormona α estimulante del tiroides	Hormona tiroidea

5 En diversas realizaciones, el promotor de genes tempranos inmediatos del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano del SV40 y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous pueden usarse para obtener alto nivel de expresión del polinucleótido de interés. También se contempla el uso de otros promotores de fago bacteriano o de células de mamíferos o virales que se conocen bien en la técnica para conseguir la expresión de polinucleótidos, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para producir un efecto inhibidor del crecimiento.

10 Empleando un promotor de propiedades muy conocidas, pueden optimizarse el nivel y el patrón de expresión de un polinucleótido tras las transfección. Por ejemplo, la selección de un promotor que es activo en células específicas, tal como tirosinasa (melanoma), alfa-fetoproteína y albúmina (tumores hepáticos), CC10 (tumor pulmonar) y antígeno específico de la próstata permitirá la expresión específica de tejido del gen terapéutico.

15 Los potenciadores se detectaron originalmente como elementos genéticos que aumentaban la transcripción a partir de un promotor localizado en una posición distante sobre la misma molécula de ADN. Esta capacidad de actuar en una larga distancia tiene muy pocos precedentes en los estudios clásicos de regulación transcripcional procarionta. El trabajo posterior demostró que las regiones de ADN con actividad potenciadora están organizadas casi como los promotores. Es decir, están compuestas de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se une a uno o más proteínas transcripcionales.

20 La distinción básica entre potenciadores y promotores es de funcionamiento. Una región potenciadora como un todo debe poder estimular la transcripción desde una distancia; esta necesidad no ha de ser cierta para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirigen la iniciación de la síntesis de ARN en un sitio en particular y en una orientación en particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores están normalmente unos sobre otros y contiguos, pareciendo a menudo que tienen una organización modular muy similar.

25 Adicionalmente, cualquier combinación promotor/potenciador (tal como por la base de datos de promotores eucariotas (Eukaryotic Promotor Data Base (EPDB)) podría usarse también para conducir la expresión de un constructo en particular. El uso de un sistema de expresión citoplasmática de T3, T7 o SP6 es otra realización posible. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de determinados promotores de bacteriófagos si se proporciona la polimerasa del bacteriófago apropiada, o bien como parte del complejo de suministro o bien como un vector de expresión genética adicional.

35 Cuando se emplea un inserto de ADNc, normalmente se deseará incluir una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada del transcrito del gen. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la puesta en práctica de éxito de la invención, y puede emplearse cualquier secuencia de este tipo. Se ha encontrado que tales señales de poliadenilación, como las del gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple, hormona del crecimiento bovina y SV40 funcionan bien en varias células diana.

40 7. Métodos de transferencia génica

45 Con el fin de crear las líneas celulares cooperadoras de la presente invención, y de crear vectores de adenovirus recombinantes para su uso con las mismas, deben suministrarse diversos constructos genéticos (es decir ADN) a una célula. Un modo de conseguirlo es por medio de transducciones virales usando partículas virales infecciosas, por ejemplo, mediante la transformación con un vector de adenovirus de la presente invención. Alternativamente, pueden emplearse virus del papiloma bovino o retroviral, permitiendo los dos la transformación permanente de una célula huésped con un / unos gen(es) de interés. En otras situaciones, el ácido nucleico que va a transferirse no es infeccioso, es decir, contenido en una partícula de virus infecciosa. Este material genético debe basarse en métodos no virales para su transferencia.

55 En la presente invención se contemplan también varios métodos no virales para la transferencia de constructos de expresión en células de mamífero cultivadas. Éstos incluyen precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990) DEAE-dextrano (Gopal, 1985), electroporación (Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, 1985), liposomas con carga de ADN (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979), sonicación celular (Fechheimer *et al.*, 1987), bombardeo de genes usando microproyectiles de alta velocidad (Yang *et al.*, 1990) y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988).

60 Una vez que se ha suministrado el constructo en la célula, el ácido nucleico que codifica para el gen terapéutico puede situarse y expresarse en diferentes sitios. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica para

- el gen terapéutico puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula. Esta integración puede estar en la orientación y posición afin por medio de recombinación homóloga (sustitución génica) o puede estar integrada en una posición no específica, aleatoria (aumento génico). Todavía en realizaciones adicionales, el ácido nucleico puede mantenerse de manera estable en la célula como un segmento episomal de ADN separado. Tales segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican para secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente de, o en sincronización con, el ciclo de la célula huésped. Cómo se suministra el constructo de expresión a una célula y dónde, en la célula, permanece el ácido nucleico depende del tipo de constructo de expresión empleado.
- En una realización de la invención, el constructo de expresión puede consistir simplemente en plásmidos o ADN recombinante desnudo. La transferencia del constructo puede realizarse mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que permeabilizan química o físicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable para la transferencia *in vitro*, sin embargo, puede aplicarse también para su uso *in vivo*. Dubensky *et al.* (1984) inyectaron con éxito DNA del virus del polio en forma de precipitados de CaPO₄ en el hígado y bazo de ratones recién nacidos y adultos demostrando replicación viral activa e infección aguda. Benvenisty y Neshif (1986) demostraron también que la inyección intraperitoneal de plásmidos precipitados con CaPO₄ da como resultado la expresión de los genes transfectados. Se prevé que el ADN que codifica para CAM puede también transferirse de manera *in vivo* y expresar CAM.
- Otra realización de la invención para transferir un constructo de expresión de ADN desnudo en células puede implicar el bombardeo de partículas. Este método depende de la capacidad de acelerar los microproyectiles recubiertos de ADN a una velocidad alta permitiéndoles perforar las membranas celulares y entrar en las células sin matarlas (Klein *et al.*, 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Un dispositivo de este tipo se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que, a su vez, proporciona la fuerza motriz (Yang *et al.*, 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como tungsteno o perlas de oro.
- En una realización adicional de la invención, el constructo de expresión puede estar atrapado en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas mediante medio acuoso. Éstos se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos están suspendidos en un exceso de disolución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan ellos mismos antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991).
- La expresión y el suministro de ácido nucleico mediado por liposoma y expresión del ADN foráneo *in vitro* ha sido de mucho éxito. Usando el gen de la β-lactamasa, Wong *et al.* (1980) demostraron la viabilidad de la expresión y el suministro mediado por liposoma de ADN foráneo en células de hematoma, HeLa, y de embrión de pollo cultivadas. Nicolau *et al.* (1987) completaron con éxito la transferencia génica mediada por liposoma en ratas tras inyección intravenosa. También se incluyen diversos enfoques comerciales que implican tecnología de "lipofección".
- En determinadas realizaciones de la invención, el liposoma puede complejarse con un virus hemaglutinante (HVJ). Esto ha demostrado facilitar la fusión con la membrana celular y promover la entrada a la célula del ADN encapsulado en el liposoma (Kaneda *et al.*, 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede complejarse o emplearse en conjunción con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). Todavía en realizaciones adicionales, el liposoma puede complejarse o emplearse en conjunción con tanto HVJ como HMG-1. Puesto que tales constructos de expresión se han empleado con éxito en la transferencia y expresión de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo*, éstos son aplicables a la presente invención.
- Otros constructos de expresión que pueden emplearse para suministrar un ácido nucleico que codifica para un gen terapéutico en células son vehículos de suministro mediado por receptor. Éstos se aprovechan de la captación selectiva de macromoléculas mediante endocitosis mediada por receptor en casi todas las células eucariotas. Debido a la distribución específica de tipo celular de diversos receptores, el suministro puede ser altamente específico (Wu y Wu, 1993).
- Los vehículos que seleccionan como objetivo genes, mediados por receptor, consisten generalmente en dos componentes: un ligando específico del receptor celular y un agente de unión a ADN. Se han usado varios ligandos para la transferencia génica mediada por receptor. Los ligandos caracterizados de manera más extensiva son asialoorosomucoide (ASOR) (Wu y Wu, 1987) y de transferencia (Wagner *et al.*, 1990). Recientemente, se ha usado también una neoglicoproteína sintética, que reconoce el mismo receptor que ASOR, como un vehículo de suministro de genes (Ferkol *et al.*, 1993; Perales *et al.*, 1994) y factor de crecimiento epidérmico (FCE), para suministrar genes a células de carcinoma escamoso (Myers, documento EPO 0273085).
- En otras realizaciones, el vehículo de suministro puede comprender un ligando y un liposoma. Por ejemplo, Nicolau *et al.* (1987) emplearon lactosilceramida, un asialogangliósido de galactosa terminal, incorporada en los liposomas y observaron un aumento en la captación del gen de la insulina por los hepatocitos. Por tanto, es viable que un ácido nucleico que codifica para un gen terapéutico puede también suministrarse a un tipo celular tal como células

tumorales, epiteliales o prostáticas por un número indeterminado de sistemas de receptor-ligando con o sin liposomas. Por ejemplo, puede usarse el antígeno específico de la próstata humano (Watt *et al.*, 1986) como receptor del suministro mediado de un ácido nucleico en el tejido prostático.

5 8. Eliminación de contaminantes de ácido nucleico

La presente invención emplea Benzonase® para eliminar ácidos nucleicos contaminantes.

10 Las enzimas tales como Benzonase® degradan al ácido nucleico y no tienen actividad proteolítica. La capacidad de Benzonase® para hidrolizar rápidamente los ácidos nucleicos hace a la enzima ideal para reducir la viscosidad del lisado celular. Se sabe bien que los ácidos nucleicos pueden adherirse a partículas derivadas de células tales como virus. La adhesión puede afectar a la separación debido a la aglomeración, cambio de tamaño de la partícula o cambio de carga de la partícula, dando como resultado poco, si es que algo, de producto que se recupera con un esquema de purificación dado. Benzonase® es muy conveniente para reducir la carga en ácido nucleico durante la purificación, eliminando así la interferencia y mejorando el rendimiento.

15 Como con todas las endonucleasas, Benzonase® hidroliza los enlaces fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos. Tras la digestión completa, todos los ácidos nucleicos libres presentes en disolución se reducen a oligonucleótidos de 2 a 4 bases de longitud.

20 9. Técnicas de purificación

La presente invención emplea varias técnicas de purificación diferentes para purificar vectores adenovirales de la presente invención. Tales técnicas incluyen las basadas en sedimentación y cromatografía y se describen en más detalle a continuación en el presente documento.

25 *Cromatografía de intercambio iónico.* El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que la afinidad de una sustancia por el intercambiador depende tanto de las propiedades eléctricas del material como de la afinidad relativa de las otras sustancias cargadas en el disolvente. Por eso, el material unido puede eluirse cambiando el pH, alterando así la carga del material, o añadiendo materiales competidores, de los cuales, las sales son sólo un ejemplo. Puesto que sustancias diferentes tienen propiedades eléctricas diferentes, las condiciones para liberar varían con cada especie molecular unida. En general, para obtener una buena separación, los métodos de elección son o bien elución en gradiente de fuerza iónica continuo o elución progresiva. (A menudo no se usa un gradiente de pH solo, ya que es difícil establecer un gradiente de pH sin aumentar simultáneamente la fuerza iónica). Para un intercambiador aniónico, se aumenta gradualmente o bien el pH y la fuerza iónica o bien se aumenta la fuerza iónica sola. Para un intercambiador catiónico se aumentan tanto el pH como la fuerza iónica. La elección real del procedimiento de elución es normalmente un resultado de la prueba y error y de las consideraciones de estabilidad. Por ejemplo, para materiales inestables, lo mejor es mantener el pH bastante constante.

40 Un intercambiador iónico es un sólido que tiene grupos cargados unidos químicamente a los que los iones se unen electrostáticamente; éste puede intercambiar estos iones por iones en disolución acuosa. Los intercambiadores iónicos pueden usarse en cromatografía en columna para separar las moléculas según su carga; realmente, otras características de la molécula son normalmente importantes de manera que el comportamiento cromatográfico es sensible a la densidad de carga, distribución de la carga y el tamaño de la molécula.

45 El principio de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas se adsorben a los intercambiadores iónicos de manera reversible de manera que las moléculas pueden unirse o eluirse cambiando el entorno iónico. La separación en intercambiadores iónicos se consigue normalmente en dos fases: primera, se unen las sustancias que han de separarse al intercambiador, usando condiciones que proporcionan una unión fuerte y estable; luego se eluye la columna con tampones de composición, fuerza iónica o pH diferentes y los componentes del tampón compiten por los sitios de unión con el material unido.

50 Un intercambiador iónico es normalmente una red tridimensional o una matriz que contiene grupos cargados unidos covalentemente. Si un grupo está cargado negativamente, intercambiará iones positivos y es un intercambiador catiónico. Un grupo típico usado en intercambiadores catiónicos es el grupo sulfónico, SO_3^- . Si un H^+ está unido al grupo, se dice que el intercambiador está en la forma ácida; éste puede, por ejemplo, intercambiar un H^+ por un Na^+ o dos H^+ por un Ca^{2+} . El grupo ácido sulfónico se denomina un intercambiador catiónico fuertemente ácido. Otros grupos usados comúnmente son carboxilo e hidroxilo fenólico, ambos intercambiadores catiónicos débilmente ácidos. Si el grupo cargado es positivo (por ejemplo, un grupo amino cuaternario) es un intercambiador aniónico fuertemente básico. Los intercambiadores aniónicos débilmente básicos más comunes son los grupos amino alifáticos o aromáticos.

60 La matriz puede estar hecha de diversos materiales. Materiales comúnmente usados son dextrano, celulosa, agarosa y copolímeros de estireno y vinilbenceno en los que el divinilbenceno tanto entrecruza las cadenas de poliestireno como contiene los grupos cargados. La tabla 4 proporciona la composición de muchos intercambiadores iónicos.

La capacidad total de un intercambiador iónico mide su aptitud para tomar grupos intercambiables por miligramo de peso en seco. Este número se distribuye por el fabricante, y es importante porque, si se excede la capacidad, los iones pasarán a través de la columna sin unirse.

5

TABLA 4

Matriz Intercambiada	or	Grupo funcional	Nombre comercial
Dextrano	Catiónico fuerte	Sulfopropilo	SP-Sephadex
	Catiónico débil	Carboximetilo	CM-Sephadex
	Aniónico fuerte	Dietil-(2-hidroxiopropil)-aminoetilo	QAE-Sephadex
	Aniónico débil	dietilaminoetilo	DEAE-Sephadex
Celulosa	Catiónico	Carboximetilo	CM-Celulose
	Catiónico	Fosfo	P-cel
	Aniónico	Dietilaminoetilo	DEAE-cellulose
	Aniónico	Polietilenimina	PEI-cellulose
	Aniónico	Dietilaminoetil, bezoilado-naftoilado	DEAE(BND)-cellulose
	Aniónico	p-aminobencilo	PAB-cellulose
Estirenodivinilbenceno	Catiónico fuerte	Ácido sulfónico	AG 50
	Aniónico fuerte		AG 1
	Catiónico fuerte + aniónico fuerte	Ácido sulfónico + tetrametilamonio	AG 501
Acrílica	Catiónico débil	carboxílico	Bio-Rex 70
Fenólica	Catiónico fuerte	Ácido sulfónico	Bio-Rex 40
Epoxiamina	Aniónico débil	Amino terciario	AG-3

La capacidad disponible es la capacidad en condiciones experimentales particulares (es decir, pH, fuerza iónica). Por ejemplo, la magnitud a la que está cargado el intercambiador iónico depende del pH (el efecto del pH es menor con intercambiadores iónicos fuertes). Otro factor es la fuerza iónica, ya que los iones pequeños próximos a los grupos cargados compiten con la molécula de muestra por estos grupos. Esta competición es bastante eficaz si la muestra es una macromolécula, ya que el coeficiente de difusión más alto del ion pequeño significa un mayor número de encuentros. Claramente, cuando aumenta la concentración del tampón, la competición se hace más refida.

15

La porosidad de la matriz es una característica importante porque los grupos cargados están tanto dentro como fuera de la matriz, y porque la matriz actúa también como un tamiz molecular. Es posible que las moléculas grandes no puedan penetrar los poros; de modo que la capacidad morirá con el aumento de las dimensiones moleculares. La porosidad de las resinas basadas en poliestireno se determina por la cantidad de entrecruzamiento por el divinilbenceno (la porosidad disminuye con el aumento de las cantidades de divinilbenceno). Con las series AG y Dower, el porcentaje de divinilbenceno se indica mediante un número tras una X, por tanto, Dowex 50-X8 es divinilbenceno al 8%.

20

Los intercambiadores iónicos se presentan en una variedad de tamaños de partícula, denominados tamaño de malla. Malla más fina significa un aumento de la razón superficie con respecto al volumen y por tanto un aumento de la capacidad y una disminución del tiempo para que se produzca el intercambio para un volumen dado del intercambiador. Por otro lado, malla fina significa una tasa de flujo lenta, que puede aumentar el diseminado difusional. El uso de partículas muy finas, de aproximadamente 10 μm de diámetro y alta presión para mantener un flujo adecuado se denomina *cromatografía líquida de alta resolución o alta presión* o simplemente HPLC.

30

Una colección de intercambiadores de este tipo que tienen tales propiedades diferentes (carga, capacidad, porosidad, malla) hace difícil la selección del apropiado para lograr una separación particular. En los siguientes ejemplos se describe cómo decidir el tipo de material de la columna y las condiciones para la unión y la elución.

35

Pueden realizarse varias elecciones cuando se emplea cromatografía de intercambio iónico como técnica. La primera elección que ha de hacerse es si el intercambiador ha de ser aniónico o catiónico. Si los materiales que han de unirse a la columna tienen una sola carga (es decir, o bien positiva o bien negativa), la elección está clara. Sin embargo, muchas sustancias (por ejemplo, proteínas, virus), portan cargas tanto negativas como positivas, y la carga neta depende del pH. En tales casos, el factor primario es la estabilidad de la sustancia a diversos valores de pH. La mayoría de las proteínas tienen un intervalo de estabilidad de pH (es decir, en el que no se desnaturalizan) en el que éstas están cargadas positiva o negativamente. Por eso, si una proteína es estable a valores de pH por encima del punto isoelectrico, debe usarse un intercambiador aniónico; si es estable a valores por debajo del punto isoelectrico, se requiere un intercambiador catiónico.

40

La elección entre intercambiadores fuertes y débiles se basa también en el efecto del pH sobre la carga y la estabilidad. Por ejemplo, si se somete a cromatografía una sustancia débilmente ionizada que requiere un pH muy

45

bajo o alto para la ionización, es necesario un intercambiador iónico fuerte ya que éste funciona en todo el intervalo de pH. Si la sustancia es lábil, son preferibles intercambiadores iónicos débiles, ya que los intercambiadores fuertes pueden a menudo deformar una molécula tanto que la molécula se desnaturaliza. El pH al que la sustancia es estable debe, por supuesto, ser del mismo nivel que el estrecho intervalo de pH en el que se carga un intercambiador débil en particular. Los intercambiadores iónicos débiles son también excelentes para la separación de moléculas con una carga alta de los de carga pequeña, ya que los iones débilmente cargados no se unen. Los intercambiadores débiles muestran también mayor resolución de sustancias si las diferencias de carga son muy pequeñas. Si una macromolécula tiene una carga muy fuerte, puede ser imposible eluirlo de un intercambiador fuerte y de nuevo puede ser preferible un intercambiador débil. En general, los intercambiadores débiles son más útiles que los intercambiadores fuertes.

Los intercambiadores Sephadex y Bio-gel ofrecen una ventaja particular para las macromoléculas que son inestables en fuerza iónica baja. Ya que los entrecruzamientos en estos materiales mantiene la insolubilidad de la matriz incluso si la matriz es altamente polar, la densidad de los grupos ionizables puede hacerse varias veces mayor de lo que es posible con intercambiadores iónicos de celulosa. El aumento en la densidad de carga significa un aumento en la afinidad, de modo que puede llevarse a cabo la adsorción a fuerzas iónicas más altas. Por otro lado, estos intercambiadores retienen algunas de sus propiedades de tamizado molecular de modo que, algunas veces, las diferencias en el peso molecular anulan la distribución producida por las diferencias de carga; el efecto de tamizado molecular puede también mejorar la separación.

Las moléculas pequeñas son las que mejor se separan sobre matrices con tamaño de poro pequeño (alto grado de entrecruzamiento) ya que la capacidad disponible es grande, mientras que las macromoléculas necesitan tamaño de poro grande. Sin embargo, excepto para el tipo Sephadex, la mayoría de los intercambiadores iónicos no ofrecen la oportunidad de hacer corresponder la porosidad con el peso molecular.

Los intercambiadores iónicos de celulosa han demostrado ser los mejores para purificar moléculas grandes tales como proteínas y polinucleótidos. Esto es debido a que la matriz es fibrosa, y por tanto, todos los grupos funcionales están sobre la superficie y disponibles para, incluso, las moléculas más grandes. En muchos casos, sin embargo, formas de perla, tales como DEAE-Sephacel y DEAE-Biogel P son más útiles debido a que hay una tasa de flujo mejor y el efecto de tamizado molecular ayuda a la separación.

La selección del tamaño de malla es siempre difícil. El tamaño de malla pequeño mejora la resolución pero disminuye la tasa de flujo, que aumenta la zona de diseminado y disminuye la resolución. Por tanto, el tamaño de malla apropiado se determina normalmente de manera empírica.

Debido a que los propios tampones consisten en iones, pueden también intercambiarse, y el equilibrio de pH puede verse afectado. Para evitar estos problemas, se adopta la regla de los tampones: uso de tampones catiónicos con intercambiadores aniónicos y tampones aniónicos con intercambiadores catiónicos. Debido a que la fuerza iónica es un factor en la unión, debe elegirse un tampón que tenga una capacidad de tamponamiento alta, de modo que su fuerza iónica no sea demasiado alta. Además, para la mejor resolución, se ha encontrado de manera general, que las condiciones iónicas usadas para aplicar la muestra a la columna (las denominadas condiciones de partida) deben estar próximas a las usadas para eluir la columna.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se caracteriza por una separación muy rápida con una resolución extraordinaria de los picos. Esto se consigue mediante el uso de partículas muy finas y alta presión para mantener una tasa de flujo adecuada. La separación puede lograrse en cuestión de minutos, o como máximo una hora. Además, sólo se necesita un volumen de muestra muy pequeño ya que las partículas son tan pequeñas y compactas que el volumen inicial es una fracción muy pequeña del volumen del lecho. Además, la concentración de la muestra no necesita ser muy grande, ya que las bandas son tan estrechas que hay muy poca dilución de la muestra.

10. Formulaciones y composiciones farmacéuticas

Cuando las partículas virales de la presente invención purificadas según los métodos expuestos anteriormente se administren, se prevé, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por tanto, será deseable preparar el complejo como una composición farmacéutica apropiada para la aplicación deseada. Generalmente, esto conllevará preparar una composición farmacéutica que esté esencialmente libre de pirógenos, así como de cualquier otra impureza que pueda ser perjudicial para seres humanos o animales. Generalmente se deseará emplear tampones y sales apropiadas para hacer estable al complejo y permitir la captación del complejo por las células diana.

Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de constructo de expresión y ácido nucleico, disuelta o dispersa en un medio acuoso o vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden denominarse también inóculos. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a composiciones y entidades moleculares que no producen una reacción perjudicial, alérgica o adversa cuando se administran a un animal, o a un ser humano, de modo apropiado. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de

dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes de retraso de la absorción e isotónicos y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el principio activo, se prevé su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también principios activos complementarios a las composiciones.

Las disoluciones de los principios activos como sales farmacológicamente aceptables o bases libres pueden prepararse en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las partículas virales de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas para su uso en regímenes terapéuticos, incluyendo su administración a seres humanos. La administración de composiciones terapéuticas puede ser por medio de cualquier vía común, siempre que el tejido diana esté disponible por medio de esa vía. Esto incluye oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Alternativamente, la administración será inyección ortotópica, subcutánea intradérmica, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Tales composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen otros excipientes, tampones o vehículos fisiológicamente aceptables. Para su aplicación contra tumores, se prevé la inyección intratumoral directa, inyección de un lecho tumoral extirpado, administración general o regional (es decir, linfática). Puede desearse también realizar la perfusión continua durante horas o días por medio de un catéter en el sitio enfermo, un tumor o sitio del tumor.

Las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse de manera ventajosa en forma de composiciones inyectables o bien como disoluciones líquidas o bien suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en líquido antes de la inyección. Estas preparaciones pueden también emulsionarse. Una composición típica para fines de este tipo comprende un soporte farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede contener aproximadamente 100 mg de albúmina sérica humana por mililitro de solución salina tamponada con fosfato. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares pueden usarse. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, disoluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de nutrientes y fluidos. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según parámetros bien conocidos.

Formulaciones adicionales que son adecuadas para administración oral. Las formulaciones orales incluyen excipientes típicos tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos o formulaciones de liberación sostenida. Cuando la vía es tópica, la forma puede ser una crema, ungüento, pomada o aereosol.

Una cantidad eficaz del agente terapéutico se determina basándose en el objetivo deseado, por ejemplo (i) inhibición de la proliferación de células tumorales, (ii) eliminación o muerte de las células tumorales, (iii) vacunación, o (iv) transferencia génica para la expresión a largo plazo de un gen terapéutico. El término "dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para su uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición terapéutica calculada para producir las respuestas deseadas discutidas anteriormente, en asociación con su administración, es decir, el régimen de tratamiento y la vía apropiada. La cantidad que ha de administrarse, tanto según el número de tratamientos como la dosis unitaria, depende del sujeto que ha de tratarse, el estado del sujeto y el resultado deseado. Se esperan regímenes terapéuticos génicos múltiples, especialmente para adenovirus.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se usará un vector adenoviral que codifica para un gen supresor de tumores para tratar pacientes de cáncer. Las cantidades típicas de vector de adenovirus usados en la terapia génica del cáncer es de 10^3 - 10^{15} UFP/dosis, (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15}) en la que la dosis puede dividirse en varias inyecciones en diferentes sitios dentro de un tumor sólido. El régimen de tratamiento también puede implicar varios ciclos de administración del gen de transferencia génica durante un periodo de 3-10 semanas. La administración del vector durante periodos de tiempo más largos, desde meses hasta años, puede ser necesaria para el beneficio terapéutico continuo.

Un vector adenoviral que codifica para un gen terapéutico puede usarse para vacunar seres humanos u otros mamíferos. Normalmente, se administraría una cantidad de virus eficaz para producir el efecto deseado, en este caso vacunación, a un ser humano o mamífero de modo que se consiga la expresión a largo plazo del transgén y se desarrolle una fuerte respuesta inmune del huésped. Se prevé que será suficiente una serie de inyecciones, por ejemplo, una inyección primaria seguida de dos inyecciones de refuerzo, para inducir una respuesta inmune a largo

plazo. Una dosis típica será de desde 10^6 hasta 10^{15} UFP/inyección dependiendo del resultado deseado. Dosis bajas de antígeno inducen generalmente una fuerte respuesta mediada por la célula, mientras que dosis altas de antígeno inducen generalmente una respuesta inmune mediada por el anticuerpo. Las cantidades precisas de la composición terapéutica dependen también del juicio del profesional y son exclusivas a cada individuo.

11. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Debería apreciarse por aquellos expertos en la técnica que las técnicas dadas a conocer en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben apreciar, en vista de la presente descripción, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer

EJEMPLO 1

Materiales y Métodos

A) Células

Se usaron para los estudios células 293 (células epiteliales de riñón embrionario humano) del banco celular maestro ("Master Cell Bank").

B) Medios

Se usó para la fase de crecimiento celular el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 4,5g/l de glucosa) + el 10% de suero bovino fetal (FBS). Para la fase de producción de virus, la concentración de FBS en el DMEM se bajó al 2%.

C) Virus

El AdCMVp53 es un adenovirus humano de tipo 5, alterado por ingeniería genética, incapaz de replicación, que expresa la proteína natural p53 humana bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV).

D) Biorreactor Celligen

Se utilizó un biorreactor Celligen (New Brunswick Scientific, Co. Inc.) con 5 l de volumen total (3,5 l de volumen de funcionamiento), para producir sobrenadante de virus usando el cultivo de microsoporte. Se usó 13 g/l de microsoporte recubierto de vidrio (SoloHill) para hacer crecer las células en el biorreactor.

E) Producción de sobrenadante de virus en el biorreactor Celligen

Las células 293 del banco celular maestro (MCB) se descongelaron y se expandieron en fábricas de células (Nunc). Las células se separaron generalmente a una confluencia de aproximadamente un 85-90%. Se inocularon las células en el biorreactor a una concentración de inoculación de 1×10^5 células/ml. Se dejó que las células se adhirieran a los microsoportes mediante agitación intermitente. Se inició la agitación continua a una velocidad de 30 rpm, de 6 a 8 h después de la inoculación de las células. Se cultivaron las células durante 7 días con los parámetros del proceso fijados a pH = 7,20, oxígeno disuelto (OD)= 60% de saturación de aire, temperatura = 37°C. En el día 8, se infectaron las células con AdCMVp53 a una MDI de 5. Después de cincuenta horas de infección con el virus, se aumentó la velocidad de agitación desde 30 rpm hasta 150 rpm para facilitar la lisis de las células y la liberación del virus en el sobrenadante. Se recogió el sobrenadante de virus después de 74 h de infección. Luego se filtró el sobrenadante de virus para concentración/diafiltración adicional.

F) Sistema biorreactor Cellcube™

También se usó un sistema biorreactor Cellcube™ (Coming-Costar) para la producción del virus AdCMVp53. Está compuesto por un módulo de cultivo celular desechable, una oxigenador, una bomba de recirculación del medio y una bomba de medio para la perfusión. El módulo de cultivo celular utilizado tiene un área superficial de cultivo de 21.550 cm² (1 mer).

G) Producción de virus en el Cellcube™

Las células 293 del banco celular maestro (MCB) se descongelaron y expandieron en fábricas de células (Nunc). Las células se separaron generalmente a una confluencia de aproximadamente un 85-90%. Se inocularon las células en el Cellcube™ según las recomendaciones del fabricante. Las densidades de inoculación de células estuvieron en el intervalo de $1-1,5 \times 10^4/cm^2$. Se dejó que las células crecieran durante 7 días a 37°C en condiciones

de cultivo de pH = 7,20, OD = 60% de saturación de aire. La tasa de perfusión del medio se reguló según la concentración de glucosa en el Cellcube™. Un día antes de la infección viral, se cambió el medio para la perfusión de DMEM + 10% FBS a DMEM + 2% FBS. En el día 8, se infectaron las células con el virus AdCMVp53 a una multiplicidad de infección (MDI) de 5. Se detuvo el medio de perfusión durante 1 h inmediatamente después de la infección y luego se reanudó durante el periodo restante de la fase de producción de virus. Se recogió el cultivo después de 45-48 h de infección.

H) Disolución de lisis

Se utilizó Tween-20 (Fisher Chemicals) a una concentración de un 1% (v/v) en tampón Tris 20 mM + NaCl 0,25 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 7,50 para lisar las células al final de la fase de producción de virus en el Cellcube™.

I) Clarificación y filtración

Primero se clarificaron el sobrenadante de virus del biorreactor Celligen y la disolución de virus del Cellcube™ usando un filtro de profundidad (Prewflow, Gelman Sciences), luego se filtró a través de un filtro de 0,8/0,22 μm (SuporCap 100, Gelman Sciences).

J) Concentración / diafiltración

Se utilizó la filtración de flujo tangencial (TFF) para concentrar y cambiar el tampón del sobrenadante de virus del biorreactor Celligen y de la disolución de virus del Cellcube™. Se utilizó un mini casete Pellicon II (Millipore) de 300K de límite de peso molecular nominal (NMWC) para la concentración y diafiltración. Primero se concentró la disolución de virus 10 veces. A esto le siguió un cambio de 4 volúmenes de muestra de tampón con respecto al tampón Tris 20 mM + NaCl 1,0 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 9,00 utilizando el método de diafiltración a volumen constante.

Se llevó a cabo una concentración/diafiltración similar para el virus purificado en columna. Se utilizó una mini casete Pellicon II de 100 K de NMWC en lugar del casete de 300K de NMWC. Se realizó la diafiltración con respecto al tampón Tris 20 mM + NaCl 0,25 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 9,0 o solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS).

K) Tratamiento con Benzonase

Se trató la disolución de virus concentrada/diafiltrada con Benzonase™ (American International Chemicals) a una concentración de 100 u/ml, a temperatura ambiente durante toda la noche para reducir la concentración de ácido nucleico contaminante en la disolución de virus.

L) Ultracentrifugación en gradiente de CsCl

Se purificó la disolución bruta de virus usando ultracentrifugación en gradiente de CsCl doble usando un rotor SW40 en una ultracentrífuga Beckman (XL-90). Primero, se colocaron 7 ml de la disolución bruta de virus encima de un gradiente de CsCl escalonado hecho de una disolución de igual volumen de 2,5 ml de disolución de CsCl 1,25 g/ml y 1,40 g/ml, respectivamente. Se centrifugó el gradiente de CsCl a 35.000 rpm durante 1 h a temperatura ambiente. Se recuperó la banda de virus en la superficie de separación del gradiente. El virus recuperado se purificó entonces adicionalmente a través de un gradiente de CsCl isopícnico. Esto se realizó mezclando la disolución de virus con al menos 1,5 veces el volumen de la disolución de CsCl 1,33 g/ml. Se centrifugó la disolución de CsCl a 35.000 rpm durante al menos 18 h a temperatura ambiente. Se recuperó la banda inferior como el virus intacto. Se sometió a diálisis el virus inmediatamente con respecto al tampón Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM, pH = 7,50 para extraer el CsCl. Se almacenó el virus dializado a -70°C para su uso futuro.

M) Purificación por cromatografía de intercambio iónico (CII)

Se purificó la disolución de virus tratada con Benzonase usando CII. Se utilizó una resina aniónica fuerte Toyopearl SuperQ 650M (Tosohaas) para la purificación. Se utilizaron un sistema de FPLC (Pharmacia) con una columna XK16 (Pharmacia) para el desarrollo del método inicial. Se llevaron a cabo estudios adicionales ampliados usando un sistema BioPilot (Pharmacia) con una columna XK 50 (Pharmacia). En resumen, se empaquetó la resina en las columnas y se lavó con NaOH 1 N, después se cargó con tampón B a lo que siguió el acondicionamiento con tampón A. Los tampones A y B estaban compuestos por Tris 20 mM + NaCl 0,25 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 9,00 y Tris 20 mM + NaCl 2 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 9,00, respectivamente. Se cargó la muestra de disolución viral en la columna acondicionada, seguido de un lavado de la columna con el tampón A hasta que la absorción UV alcanzó la referencia. Se eluyó el virus purificado de la columna mediante el uso de un volumen de 10 columnas de gradiente lineal de NaCl.

N) Análisis por HPLC

Se desarrolló un procedimiento de análisis por HPLC para evaluar la eficacia de la producción y purificación de virus. Se obtuvo el tris(hidroximetil)aminometano (tris) de FisherBiotech (número de catálogo BP154-1; Fair Lawn, Nueva Jersey, EE.UU.); se obtuvo el cloruro de sodio (NaCl) de Sigma (número de catálogo S-7653, St. Louis, MO, EE.UU.). Ambos se usaron directamente sin purificación adicional. Se realizaron los análisis por HPLC en un sistema de gradiente analítico (Analytical Gradient System) de Beckman, con el software Gold Workstation (bomba binaria 126 y detector de diodos en serie 168) equipado con una columna de intercambio aniónico de TosoHaas (7,5 cm x 7,5 mm DI, 10 µm de tamaño de partícula, número de catálogo 18257). Se utilizó una columna de intercambio aniónico Resource Q (Pharmacia) de 1 ml para evaluar el método desarrollado por Huyghe *et al.* usando su sistema de tampón HEPES. Este método sólo se probó para el sistema de biorreactor.

Los tampones usados en el presente sistema de HPLC fueron: Tampón A: tampón tris 10 mM, pH 9,0, Tampón B: NaCl 1,5 M en tampón A, pH 9,0. Se filtraron los tampones a través de un filtro de cabeza de botella de 0,22 µm de Corning (número de catálogo 25970-33). Antes de la inyección se filtraron todas las muestras a través de un Acrodisc PF de 0,8/0,22 µm de Gelman Sciences (número de catálogo 4187).

Se inyecta la muestra en la columna de HPLC en un volumen de 60-100 µl. Después de la inyección, se lava la columna (TosoHaas) con el 20% de B durante 3 min a una velocidad de flujo de 0,75 ml/min. Se inicia luego un gradiente, en el que B se aumenta desde un 20% hasta un 50% durante 6 min. Luego se cambia el gradiente desde un 50% hasta un 100% de B durante 3 min, seguido del 100% de B durante 6 min. Se cambian de nuevo progresivamente las concentraciones de sal hasta el 20% otra vez durante 4 min, y se mantienen al 20% de B durante otros 6 min. El tiempo de retención del Adp53 es de 9,5 ± 0,3 min con $A_{260}/A_{280} \cong 1,26 \pm 0,03$. Se consigue la limpieza de la columna después de cada serie cromatográfica mediante la inyección de 100 µl de NaOH 0,15 M y luego haciendo pasar el gradiente.

EJEMPLO 2

Efecto de la tasa de perfusión del medio en Cellcube™ en la producción y purificación de virus.

Para un sistema de cultivo celular de perfusión, tal como el Cellcube™, la tasa de perfusión del medio juega un papel importante en el rendimiento y la calidad del producto. Se examinaron dos estrategias de perfusión del medio diferentes. Una estrategia fue mantener la concentración de glucosa en el Cellcube™ ≥ 2 g/l (tasa de perfusión alta). La otra fue mantener la concentración de glucosa ≥ 1 g/l (tasa de perfusión del medio baja).

No se observaron cambios significativos en los parámetros del cultivo, tales como pH, OD, entre las dos tasas de perfusión diferentes. Se produjeron aproximadamente cantidades equivalentes de virus bruto (antes de la purificación) después de recoger usando la disolución de lisis Tween-20 al 1% tal como se muestra en la tabla 5. Sin embargo, se observó una diferencia drástica en los perfiles de HPLC de las soluciones virales de las series de producción de la tasa de perfusión del medio alta y baja.

Tabla 5. Efecto de la concentración de glucosa del medio sobre el rendimiento de virus

Concentración de glucosa (g/l)	≥ 2,0	≥ 1,0
Rendimiento de virus bruto (UFP)	4 x 10 ¹²	4,9 x 10 ¹²

Tal como se muestra en la figura 1, se produjo un pico de virus muy bien separado (tiempo de retención de 9,39 min.) a partir de la disolución viral usando una tasa de perfusión del medio baja. Se encontró que se obtuvo un virus de pureza y actividad biológica adecuadas después de una purificación por cromatografía de intercambio iónico de una única etapa de la disolución de virus producida a una tasa de perfusión del medio baja. Por otro lado, no se observó un pico de virus separado en el tiempo de retención de 9,39 min. de la disolución viral producida usando una tasa de perfusión del medio alta. Esto sugiere que se produjeron contaminantes que tienen el mismo perfil de elución que el virus a una tasa de perfusión del medio alta. Aunque aún no está clara la naturaleza de los contaminantes, se espera que los contaminantes estén relacionados con el aumento de la producción de proteínas de la matriz extracelular a una tasa de perfusión del medio alta (alta alimentación de suero) de las células productoras. Estas características de separación deficientes observadas en la HPLC crearon dificultades para procesar la purificación por CII del proceso tal como se muestra en los siguientes ejemplos. Como resultado, la tasa de perfusión del medio usada durante el crecimiento celular y las fases de producción de virus en el Cellcube™ tiene un efecto significativo en la purificación por CII aguas abajo del virus. Se recomienda una tasa de perfusión del medio baja. Esto produce no sólo producto bruto fácil de purificar sino que también ofrece una producción más económica debido al consumo del medio reducido.

EJEMPLO 3

Métodos de recogida de células y lisis

Basándose en experiencia previa, los inventores evaluaron en primer lugar el método de congelado-descongelado.

Se recogieron las células del Cellcube™ 45-48 h después de la infección. Primero, se aisló el Cellcube™ del sistema de cultivo y se drenó el medio gastado. Luego, se bombeó disolución de EDTA 50 mM al Cellcube™ para separar las células de la superficie de cultivo. La suspensión celular así obtenida se centrifugó a 1.500 rpm (Beckman GS-6KR) durante 10 min. El sedimento de células resultante se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS). La suspensión celular se sometió a 5 ciclos de congelado/descongelado entre un baño de agua a 37°C y un baño de etanol e hielo seco para liberar el virus de las células. Se analizó el lisado celular bruto (CCL) así generado por HPLC.

La figura 2 muestra el perfil de HPLC. No se observa ningún pico de virus al tiempo de retención de 9,32 min. Por el contrario, se producen dos picos a los tiempos de retención de 9,11 y 9,78 min. Este perfil sugiere que los otros contaminantes que tienen un tiempo de elución similar al del virus existen en el CCL e interfieren con la purificación del virus. Como resultado, se observó una eficacia de purificación muy baja cuando se purificó el CCL mediante CII usando FPLC.

Además de la baja eficacia de purificación, hubo una pérdida significativa de producto, durante la etapa de recogida de células, hacia la disolución de EDTA tal como se indica en la tabla 6. Aproximadamente se perdió el 20% del producto en la disolución de EDTA que se descartó. Además aproximadamente el 24% del producto de virus bruto está presente en el medio gastado que también se descartó. Por tanto, sólo el 56% del producto de virus bruto está en el CCL. Además, el congelado-descongelado es un proceso de gran variación y con una escalabilidad muy limitada. Es necesario desarrollar un proceso de lisis celular más eficaz con menor pérdida de producto.

Tabla 6. Pérdida de virus durante la recogida con EDTA de células del Cellcube™

	Desecho		Producto bruto	Producto bruto total (UFP)
	Medio gastado	Disolución de recogida con EDTA	Lisado bruto de células	
Volumen (ml)	2800	2000	82	3 x 10 ¹²
Título (UFP/ml)	2,6 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	2 x 10 ¹⁰	
Virus total (UFP)	7,2 x 10 ¹¹	6 x 10 ¹¹	1,64 x 10 ¹²	
Porcentaje	24%	20%	56%	

Los datos se generaron a partir de un Cellcube™ de 1 mer.

TABLA 7. Evaluación de detergentes no iónicos para la lisis celular

Detergentes	Concentraciones (p/v)	Química	Comentarios
Thesit	1%	Dodecilpoli(etilenglicol éter) _n , n = 9-10	Precipitado grande
	0,5%		
	0,1%		
NP-40	1%	Etilfenolpoli(etilenglicol éter) _n , n = 9-11	Precipitado grande
	0,5%		
	0,1%		
Tween-20	1%	Monolaurato de poli(oxietileno) _n sorbitano n = 20	Precipitado pequeño
	0,5%		
	0,1%		
Brij-58	1%	Cetilpoli(etilenglicol éter) _n , n = 20	disolución turbia
	0,5%		
	0,1%		
Triton X-100	1%	Octilfenolpoli(etilenglicol éter) _n , n = 10	Precipitado grande
	0,5%		
	0,1%		

Los detergentes se han usado para lisar células para liberar los orgánulos intracelulares. Consiguientemente, los inventores evaluaron el método de lisis por detergente para la liberación del adenovirus. La tabla 7 enumera los 5 detergentes no iónicos diferentes que se evaluaron para la lisis celular. Se recogieron las células del Cellcube™ 48 h después de la infección usando EDTA 50 mM. El sedimento de células se resuspendió en los diferentes detergentes a varias concentraciones, enumeradas en la tabla 7.

La lisis celular se llevó a cabo o bien a temperatura ambiente o bien en hielo durante 30 min. Se obtuvo una disolución de lisis clara después de la centrifugación para eliminar el precipitado y el residuo celular. Se trataron las disoluciones de lisis con Benzonase y luego se analizaron mediante HPLC. La figura 3 muestra los perfiles de HPLC de disoluciones de lisis de los detergentes diferentes. Thesit y NP-40 tuvieron rendimientos similares a Triton X-100. La disolución de lisis generada a partir de Tween-20 al 1% dio la mejor resolución de virus y observándose la peor resolución de virus con Brij-58. Se encontró la lisis celular más eficaz a una concentración de detergente del 1%

(p/v). La temperatura de lisis no contribuyó significativamente a la resolución de virus a las concentraciones de detergente examinadas. Con el fin de simplificar el proceso, se recomienda la lisis a temperatura ambiente. Se utilizó la disolución de lisis compuesta por Tween-20 al 1% en Tris 20 mM + NaCl 0,25 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 7,50 para la lisis celular y la recogida de virus en el Cellcube™.

5

EJEMPLO 4

Efectos de la concentración/diafiltración sobre la recuperación de virus

Se clarificó y filtró la disolución de virus de la etapa de lisis antes de la concentración/diafiltración. Se evaluaron las membranas de TFF de diferentes NMWC, incluyendo 100K, 300K, 500K, y 1000K, para conseguir una concentración/diafiltración eficaz. Se obtuvo el mayor flujo del medio, con pérdida de virus mínima en el filtrado, con una membrana de 300K de NMWC. Membranas con NMWC más grande ofrecieron un flujo del medio más alto, pero dieron como resultado una mayor pérdida de virus en el filtrado, mientras que membranas con NMWC más pequeños alcanzaron un flujo del medio insuficiente. En primer lugar, se concentró la disolución de virus 10 veces, que estuvo seguida de una diafiltración de 4 volúmenes de muestra con respecto al tampón Tris 20 mM + NaCl 0,25 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 9,00 usando el método de volumen constante. Durante el proceso de concentración/diafiltración, se mantuvo la caída de presión a través de la membrana a ≤ 5 psi. Se demostró un nivel consistente alto de recuperación de virus durante la etapa de concentración/diafiltración tal como se muestra en la tabla 8.

20

Tabla 8. Concentración/diafiltración de la disolución de virus bruto

	Título (UFP/ml)		Volumen (ml)		Virus total (UFP)		Recuperación	
	Serie n° 1	Serie n° 2	Serie n° 1	Serie n° 2	Serie n° 1	Serie n° 2	Serie n° 1	Serie n° 2
Antes de la conc./diaf.	$2,6 \times 10^9$	2×10^9	1900	2000	$4,9 \times 10^{12}$	4×10^{12}		
Después de la conc./diaf.	$2,5 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	200	200	5×10^{12}	$3,4 \times 10^{12}$	102%	85%
Conc. Factor			9,5	10				
Filtrado	5×10^5	1×10^6	3000	3000	$1,5 \times 10^9$	3×10^9		

EJEMPLO 5

Efecto de la adición de sal sobre el tratamiento con Benzonase

Se trató la disolución de virus, después de la concentración/diafiltración, con Benzonase (nucleasa) para reducir la concentración de ácido nucleico contaminante en la disolución de virus. Se evaluaron diferentes concentraciones de trabajo de Benzonase, que incluyeron 50, 100, 200, 300 unidades/ml, para la reducción de las concentraciones de ácido nucleico. Con el fin de simplificar el proceso, se llevó a cabo el tratamiento a temperatura ambiente durante la noche. Se observó una reducción significativa del ácido nucleico contaminante que puede hibridarse con el ADN genómico humano, después del tratamiento con Benzonase.

35

La tabla 9 muestra la reducción de la concentración de ácido nucleico antes y después del tratamiento con Benzonase. Se analizó la disolución de virus por HPLC antes y después del tratamiento con Benzonase. Tal como se muestra en la figura 4A y la figura 4B, se observó una reducción drástica en el pico de ácido nucleico contaminante después del tratamiento con Benzonase. Esto está de acuerdo con el resultado del ensayo de hibridación con ácido nucleico. Debido a su eficacia, se utilizó una concentración de Benzonase de 100 u/ml para el tratamiento de la disolución de virus bruto.

40

Tabla 9. Reducción de la concentración de ácido nucleico contaminante en la disolución de virus

	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Reducción
Concentración de ácido nucleico contaminante	200 μ g/ml	10 ng/ml	2×10^4 veces
Condición de tratamiento: concentración de Benzonase: 100 u/ml, temperatura: temperatura ambiente, tiempo: durante la noche.			

45

Se observó un cambio considerable en el perfil de HPLC antes y después del tratamiento con Benzonase. No se detectaron picos de virus separado en el tiempo de retención de 9,33 min. después del tratamiento con Benzonase. Al mismo tiempo, se desarrolló un pico importante con adsorción alta, a 260 nm, en el tiempo de retención de 9,54 min. Los resultados del ensayo de titulación indicaron que el tratamiento con Benzonase no afectó

negativamente al título del virus y el virus permaneció intacto e infeccioso después del tratamiento con Benzonase. Se dedujo que el ácido nucleico celular liberado durante la etapa de lisis de células interactuó con el virus y o bien formó agregados con el virus o bien se adsorbió sobre la superficie del virus durante el tratamiento con Benzonase.

- 5 Para minimizar la posible interacción del ácido nucleico y el virus durante el tratamiento con Benzonase, se añadieron diferentes concentraciones de NaCl a la disolución de virus antes del tratamiento con Benzonase. No ocurrió ningún cambio drástico en el perfil de HPLC después del tratamiento con Benzonase en presencia de NaCl 1 M en la disolución de virus. La figura 5 muestra el perfil de HPLC de la disolución de virus después del tratamiento con Benzonase en presencia de NaCl 1 M. A diferencia de lo mostrado en la figura 4B, todavía existe un pico de virus al tiempo de retención de 9,35 min, después del tratamiento con Benzonase. Este resultado indica que la presencia de NaCl 1 M previene la interacción del ácido nucleico con el virus durante el tratamiento con Benzonase y facilita la purificación adicional del virus del ácido nucleico contaminante.

EJEMPLO 6

- 15 Purificación por cromatografía de intercambio iónico

La presencia de una carga negativa en la superficie del adenovirus en condiciones de pH fisiológicas impulsó la evaluación de los intercambiadores de iones aniónicos para la purificación de adenovirus. Se utilizó el intercambiador de iones aniónico fuerte Toyopearl SuperQ 650M para el desarrollo de un método de purificación. Se evaluaron los efectos de la concentración de NaCl y el pH del tampón de carga (tampón A) sobre la purificación de virus utilizando el sistema FPLC.

- 25 A) Desarrollo de los métodos

Para la cromatografía de intercambio iónico, el pH del tampón es uno de los parámetros más importantes y puede tener influencias drásticas en la eficacia de la purificación. Con respecto al pH y la conductividad del medio utilizado durante la producción de virus, los inventores formularon Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 0,2 M, pH = 7,50 como tampón A. Se acondicionó con tampón A una columna XK16 empacquetada con Toyopearl SuperQ 650M con una altura de 5 cm.

Se cargó en la columna una muestra de 5 ml de sobrenadante de virus concentrado/diafiltrado, tratado con Benzonase, del biorreactor Celligen. Después de lavar la columna, se llevó a cabo la elución con un gradiente lineal de más de 10 volúmenes de columna de la formulación de tampón B para alcanzar Tris mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 2 M, pH = 7,50.

La figura 6 muestra el perfil de elución. Se observan tres picos durante la elución sin una separación satisfactoria entre ellos. Un estudio de control realizado con medio acondicionado de células 293 (sin virus) mostró que los primeros dos picos están relacionados con el virus. Se evaluó el efecto del pH del tampón para mejorar adicionalmente la eficacia de separación. Se aumentó el pH del tampón a 9,00 mientras que se mantuvieron constantes las otras condiciones. Se observó una separación muy mejorada, tal como se muestra en la figura 7, comparada con la del tampón de pH 7,50. Las fracciones nº 3, nº 4, y nº 8 se analizaron por HPLC.

Tal como se muestra en la figura 8, la mayoría de virus se encontraron en la fracción nº 4, sin detectarse ningún virus en las fracciones nº 3 y nº 8. Se encontró que la fracción nº 8 estaba principalmente compuesta por ácido nucleico contaminante. Sin embargo, la purificación aún no era óptima. Aún hubo superposición entre las fracciones nº 3 y nº 4 con contaminantes detectados en la fracción nº 4.

Basándose en el cromatograma de la figura 7, se dedujo que podría alcanzarse una mejora adicional en la purificación del virus mediante el aumento de la concentración de sal en el tampón A. Como resultado, los contaminantes presentes en la fracción nº 3, que es anterior al pico de virus, pueden desplazarse a la fracción de flujo no retenido. Se aumentó la concentración de NaCl en el tampón A a 0,3 M mientras que se mantuvieron constantes otras condiciones. La figura 9 muestra el perfil de elución en la condición de NaCl 0,3 M en el tampón A.

Se logró una mejora drástica en la eficacia de la purificación. Tal como se esperaba, se eliminó el pico de contaminante observado en la figura 7 en la condición de sal aumentada. Se analizaron por HPLC las muestras del sob. de virus bruto, flujo a través, pico nº 1, y pico nº 2 y los resultados se muestran en la figura 10. No se detectó ningún virus en la fracción de flujo no retenido. La mayoría de los contaminantes presentes en el material bruto se encontraron en el flujo a través. El análisis por HPLC del pico nº 1 mostró un único pico de virus bien definido. Este perfil de HPLC es equivalente al obtenido a partir del virus purificado en gradiente de CsCl doble. Los picos observados en los tiempos de retención de 3,14 y 3,61 min. en el virus purificado en gradiente de CsCl son picos relacionados con glicerol. El virus purificado tiene una razón A260/A280 de 1,27 ± 0,03. Esto es similar al valor de virus purificado en gradiente de CsCl doble así como también a los resultados presentados por Huyghe *et al.* (1996). El pico nº 2 se compone principalmente de ácido nucleico contaminante. Basándose en el resultado de la purificación, los inventores propusieron el siguiente método para la purificación por CII del sob. de adenovirus del biorreactor.

Tampón A: Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 0,3 M, pH = 9,00

Tampón B: Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 2 M, pH = 9,00

5

Elución: gradiente lineal de 10 volúmenes de columna

B) Ampliación a escala del método

10 Siguiendo el desarrollo del método, se amplió a escala la purificación de la columna XK16 (1,6 cm D.I.) a una columna XK50 (5 cm D.I., ampliación a escala de 10 veces) utilizando el mismo método de purificación. Se logró un perfil de elución similar en la columna XK50 tal como se muestra en la figura 11. Se analizó la fracción de virus por HPLC, lo que indicó una pureza de virus equivalente a la obtenida a partir de la columna XK16.

15 Durante los estudios de ampliación a escala, se encontró que era más conveniente y consistente usar la conductividad para cuantificar la concentración de sal en el tampón A. La conductividad óptima del tampón A está en el intervalo de 25 ± 2 mS/cm a aproximadamente temperatura ambiente (21°C). Se analizaron las muestras producidas durante el proceso de purificación junto con el virus purificado con CsCl doble por SDS-PAGE.

20 Tal como se muestra en la figura 12, todas las proteínas estructurales del adenovirus se detectan por SDS-PAGE. El virus purificado por CII muestra tinción equivalente a la del virus purificado por CsCl doble. Se logró una reducción significativa en la concentración de albúmina sérica bovina (BSA) durante la purificación. La concentración de BSA en el virus purificado estuvo por debajo del nivel de detección del ensayo de inmunotransferencia de tipo Western, tal como se muestra en la figura 13.

25

Se determinó la reducción de la concentración de ácido nucleico contaminante en la disolución de virus durante el proceso de purificación usando el ensayo de inmunotransferencia en líneas del ácido nucleico. Se utilizó el ADN genómico humano marcado con ³²P como la sonda de hibridación (porque las células 293 son células de riñón embrionario humano). La tabla 10 muestra la concentración de ácido nucleico en etapas diferentes del proceso de purificación. Se redujo la concentración del ácido nucleico en la disolución final de virus purificado a 60 pg/ml, una reducción de aproximadamente $3,6 \times 10^6$ veces comparada con el sobrenadante de virus inicial. Se determinaron el título del virus y la razón de partículas infecciosas con respecto a totales para el virus purificado y se compararon los resultados con los de la purificación en CsCl doble en la tabla 10. Tanto la recuperación de virus como la razón partícula/UFP son muy similares entre los dos métodos de purificación. Se puede aumentar adicionalmente el título de la disolución de virus purificado en columna mediante la realización de una etapa de concentración.

30

35

Tabla 10. Eliminación de los ácidos nucleicos contaminantes durante la purificación

Etapas durante la purificación	Concentración de ácido nucleico contaminante
Sobrenadante de virus del biorreactor	220 µg/ml
Sob. concentrado/diafiltrado	190 µg/ml
Sob. después del tratamiento con Benzonase (durante la noche, T.A., 100 u/ml)	10 ng/ml
Virus purificado de la columna	210 pg/ml
Virus purificado después de la concentración/diafiltración	60 pg/ml
Virus purificado en CsCl	800 pg/ml

40 EJEMPLO 7

Otros métodos de purificación

Además de la cromatografía de intercambio iónico aniónica intensa, también se evaluaron otros modos de métodos cromatográficos, para la purificación del virus AdCMVp53 (por ejemplo la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de interacción hidrofóba, la cromatografía de intercambio catiónico o la cromatografía de afinidad iónica de metales). En comparación con la resina Toyopearl SuperQ, todos esos modos de purificación ofrecieron una purificación mucho menos eficaz con baja recuperación de producto. Por tanto, se recomienda la resina Toyopearl SuperQ para la purificación de AdCMVp53. Sin embargo, es probable que otros intercambiadores aniónicos fuertes basados en la química de amonio cuaternario sean adecuados para la purificación de AdCMVp53 con algunas modificaciones del proceso.

50

EJEMPLO 8

55 Purificación del virus AdCMVp53 generado del Cellcube™

Se desarrollaron dos métodos de producción diferentes para producir el virus AdCMVp53. Uno estaba basado en el cultivo de microsoportes en un biorreactor de tanque de agitado. El otro estaba basado en un biorreactor Cellcube™. Tal como se describió anteriormente, el método de purificación se desarrolló utilizando el sobrenadante de virus bruto generado del biorreactor de tanque agitado. Se notó que aunque se usaron el mismo medio, células y virus para la producción de virus tanto en el biorreactor como en el Cellcube™, la superficie de cultivo a la que las células se unieron era diferente.

En el biorreactor, se hicieron crecer las células en un microsoporte recubierto de vidrio, mientras que en el Cellcube™ se hicieron crecer las células en superficie de cultivo de poliestireno tratada de manera patentada. En el Cellcube™ se utilizó la perfusión del medio constante, por otro lado, en el biorreactor no se utilizó ninguna perfusión del medio. En el Cellcube™, el producto de virus bruto se recogió en forma de células infectadas víricamente, lo que es diferente al sobrenadante de virus recogido del biorreactor.

Se purificó el lisado celular bruto (CCL), producido después de 5 ciclos de congelado-descongelado de las células recogidas infectadas víricamente, mediante CII usando el método descrito anteriormente. De manera diferente al sobrenadante de virus del biorreactor, no se logró ninguna purificación satisfactoria para el material del CCL generado del Cellcube™. La figura 14 muestra el cromatograma. El resultado sugiere que la disolución de virus bruto generado del Cellcube™ mediante el congelado-descongelado de células recogidas no se purifica fácilmente mediante el método de CII.

Se examinaron otros métodos de purificación, incluyendo las cromatografías de interacción hidrofóbica y de quelatos metálicos, para la purificación de virus en el CCL. Desafortunadamente no se observó ninguna mejora en la purificación mediante ninguno de los métodos. Considerando las dificultades de la purificación de virus en el CCL y las desventajas asociadas con la etapa de congelado-descongelado en el proceso de producción, los inventores decidieron investigar otros métodos de lisis de células.

A) Purificación de la disolución de virus bruto en el tampón de lisis.

Tal como se describe en los ejemplos 1 y 3, se utilizó el análisis de HPLC para seleccionar métodos de lisis diferentes. Basándose en los resultados de HPLC, se empleó un tampón de Tween-20 al 1% en Tris 20 mM + NaCl 0,25 M + MgCl₂ 1 mM, pH = 7,50 como el tampón de lisis. Al final de la fase de producción de virus, en lugar de recoger las células infectadas, se bombeó el tampón de lisis al Cellcube™ después de drenar el medio gastado. Se lisaron las células y se liberó el virus en el tampón de lisis mediante la incubación durante 30 min.

Después de la clarificación y filtración, se concentró/diafiltró la disolución de virus y se trató con Benzonase para reducir la concentración de ácido nucleico contaminante. Se purificó la disolución de virus tratada mediante el método desarrollado anteriormente, usando la resina Toyopearl SuperQ. Se alcanzó una separación satisfactoria, similar a la obtenida usando el sobrenadante de virus del biorreactor, durante la elución. La figura 15 muestra el perfil de elución. Sin embargo, cuando se analizó la fracción de virus en HPLC, se detectó otro pico, además del pico de virus. El resultado se muestra en la figura 16A.

Para purificar adicionalmente el virus, se volvió a purificar la fracción de virus recogida usando el mismo método. Tal como se muestra en la figura 16B, la pureza de la fracción de virus mejoró considerablemente después de la segunda purificación. También se evaluó la cromatografía de quelatos metálicos como un candidato para la segunda purificación. Se alcanzaron mejoras similares en la pureza de virus a las observadas con la segunda IEC. Sin embargo, por su simplicidad, se prefiere la IEC como el método elegido para la segunda purificación.

Tal como se describió anteriormente en el ejemplo 2, la tasa de perfusión del medio empleada durante las fases de crecimiento celular y producción de virus tiene un impacto considerable en el perfil de separación de HPLC de la recogida de virus bruto de Tween-20. Para la disolución de virus producida a una tasa de perfusión del medio alta, se requieren dos columnas de intercambio iónico para alcanzar la pureza de virus requerida.

Basándose en la separación muy mejorada observada en HPLC para la disolución de virus producida a tasa de perfusión de medio baja, es probable que la purificación a través de una columna de intercambio iónico pueda alcanzar la pureza de virus requerida. La figura 17 muestra el perfil de elución usando la disolución de virus bruto producida a tasa de perfusión de medio bajo. Se obtuvo un pico de virus bien definido durante la elución. El análisis de HPLC de la fracción de virus indica una pureza de virus equivalente a la del virus purificado en gradiente de CsCl después de una etapa de cromatografía de intercambio iónico. La figura 18 muestra el resultado del análisis de HPLC.

Se analizó adicionalmente el virus purificado mediante SDS-PAGE, inmunotransferencia de tipo Western para BSA, e inmunotransferencia en líneas de ácido nucleico para determinar la concentración de ácido nucleico contaminante. Los resultados del análisis se muestran en la figura 19A, la figura 19B y la figura 19C, respectivamente. Todos esos análisis muestran que el virus purificado en columna tiene una pureza equivalente comparado con el virus purificado en gradiente de CsCl doble. La tabla 11 muestra el título de virus y la recuperación antes y después de la purificación en columna. Con el fin de compararlas, también se incluyó la recuperación de virus típica alcanzada

mediante la purificación en gradiente de CsCl doble. Se alcanzaron recuperaciones de virus similares mediante ambos métodos.

Tabla 11. Comparación de la purificación por IEC y ultracentrifugación en gradiente de CsCl doble de AdCMVp53 a partir de Cellcube™

	Título (UFP/ml)	A260/A280	Partícula/UFP	Recuperación
IEC	1×10^{10}	1,27	36	63%
Ultracentrifugación	2×10^{10}	1,26	38	60%

A) Estudio de la capacidad de la resina

Se evaluó la capacidad dinámica de la resina Toyopearl SuperQ para la purificación de la disolución de virus recogida en Tween-20 producida a tasa de perfusión de medio baja. Se empaquetaron cien ml de resina en una columna XK50. Se purificó una cantidad diferente de disolución de virus bruto a través de la columna usando los métodos descritos en el presente documento.

Se analizaron en HPLC la eficacia de la ruptura y purificación de virus. La figura 20 muestra los resultados del análisis de HPLC. A un factor de carga de la columna superior a una razón en volumen muestra/columna de 2:1, se redujo la pureza de la fracción de virus. Los contaminantes coeluyeron con el virus. A un factor de carga superior a 3:1, se observó la ruptura del virus en el flujo a través. Por tanto, se propuso que la capacidad de carga de trabajo de la resina estuviera en el intervalo de razón en volumen de muestra/columna de 1:1.

B) Concentración/diafiltración después de la purificación

Una etapa de concentración/diafiltración después de la purificación en columna sirve no sólo para aumentar el título de virus, si es necesario, sino también para cambiar al sistema de tampón especificado para el producto de virus. Se empleó una membrana de TFF de 300K de NMWC para la etapa de concentración. Debido a la ausencia de contaminantes proteicos y de ácido nucleico en el virus purificado, se alcanzó un flujo de tampón muy alto sin un descenso de presión perceptible a través de la membrana.

Se alcanzó aproximadamente una recuperación de virus del 100% durante esta etapa cambiando el tampón a Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 0,15 M, pH = 7,50. También se cambió satisfactoriamente el tampón del virus purificado por DPBS durante la etapa de concentración/diafiltración. Puede determinarse el factor de concentración mediante el título de virus que se desea en el producto final y el título de la disolución de virus eluido de la columna. Esta flexibilidad ayudará a mantener la consistencia del producto final de virus purificado.

C) Evaluación de adenovirus defectuoso en el AdCMVp53 purificado por IEC

Debido a una eficacia de empaquetamiento inferior al 100% de adenovirus en células productoras, algunos adenovirus defectuosos existen de manera general en la disolución de virus bruto. Los virus defectuosos no tienen el ADN empaquetado dentro de la cápsida viral y por tanto pueden separarse del virus intacto mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl basándose en la diferencia de densidad. Es probable que fuera difícil separar los virus defectuosos de los intactos basándose en cromatografía de intercambio iónico asumiendo que ambos virus tienen una química de superficie similar. La presencia de una cantidad excesiva de virus defectuosos afectará a la calidad del producto purificado.

Para evaluar el porcentaje de partículas de virus defectuoso presente, se sometieron los virus concentrados y purificados a ultracentrifugación en CsCl isopícnica. Tal como se muestra en la figura 21, se observó una banda débil sobre la banda de virus intacto después de la centrifugación. Se recuperaron y dializaron ambas bandas frente al tampón Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM, pH = 7,50 para extraer el CsCl. Se analizaron los virus dializados en HPLC y los resultados se muestran en la figura 22. Ambos virus muestran tiempos de retención similares. Sin embargo, el virus defectuoso tiene una razón A260/A280 inferior a la del virus intacto. Esto es indicativo de menos ADN viral en el virus defectuoso.

Los picos observados en los tiempos de retención entre 3,02 y 3,48 min. se producen mediante el glicerol que se añade a los virus (10% v/v) antes de la congelación a -70°C. El porcentaje del virus defectuoso fue inferior al 1% del virus total. Es improbable que este bajo porcentaje de virus defectuosos afecte a la razón de partículas totales con respecto a virus infeccioso (UFP) en el producto de virus purificado. Se analizaron ambos virus mediante SDS-PAGE (mostrado en la figura 19A). Comparados con los virus intactos, los virus defectuosos carecen de las proteínas de núcleo asociadas al ADN que aparecen en las bandas a 24 y 48,5 KD. Este resultado está de acuerdo con la ausencia de ADN en el virus defectuoso.

D) Visión general del proceso de la producción y purificación de virus AdCMVp53

Basándose en los resultados del desarrollo del proceso anterior, la presente invención propone un diagrama de flujo

de producción y purificación para AdCMVp53 tal como se muestra en la figura 23. Se incluye la recuperación de virus por etapas y acumulativa, con el rendimiento de virus correspondiente basado en un Cellcube™ de 1 mero. La recuperación de virus final es aproximadamente del 70 ± 10%. Esto es aproximadamente 3 veces superior a la recuperación de virus notificada por Huyghe *et al.* (1996) usando un intercambiador de iones DEAE y un procedimiento de purificación cromatográfica de quelatos metálicos para la purificación del adenovirus que codifica para la proteína p53. Se produjeron aproximadamente 3 x 10¹² UFP del producto final de virus purificado de un Cellcube™ de 1 mero. Esto representa un rendimiento de producto final similar comparado con el método de producción actual usando la ultracentrifugación en gradiente de CsCl doble para la purificación.

10 *E) Aumento a escala*

Se han realizado estudios de aumento a escala exitosos con el sistema Cellcube™ de 4 mero, y actualmente están en proceso para evaluar la producción de virus en el Cellcube™ de 16 mero. Se filtrará, concentrará y diafiltrará la disolución de virus bruto producida usando un cassette de Pellicon más grande. Se determinará la calidad y la recuperación del virus. Después del tratamiento con Benzonase, se purificará la disolución de virus bruto usando una columna de BioProcess de 20 cm y una de 30 cm para el 4 mero y 16 mero, respectivamente.

EJEMPLO 9

20 Producción de Ad-p53 mejorada en cultivo en suspensión libre de suero

Adaptación de células 293

Se adaptaron las células 293 a un medio libre de suero IS293 comercialmente disponible (Irvine Scientific; Santa Ana, CA) mediante la disminución secuencial de la concentración de FBS en frascos T. Se descongelaron las células congeladas en un vial de PDWB y se colocaron en medios DMEM con FBS al 10% en frascos T-75 y se adaptaron las células a los medios IS 293 libres de suero en frascos T mediante la disminución de la concentración de FBS en los medios secuencialmente. Después de 6 pases en los frascos T-75 se estimó que el % de FBS era de aproximadamente el 0,019%. Se subcultivaron las células dos veces más en los frascos T antes de que se transfirieran a los frascos centrifugadores.

Se adaptaron las células 293 adaptadas a medios libres de suero en frascos T al cultivo en suspensión

Se transfirieron las células adaptadas a medios libres de suero anteriores en los frascos T a un cultivo en suspensión centrifugador de 250 ml libre de suero (100 ml de volumen de trabajo) para el cultivo en suspensión. La densidad celular inicial fue 1,18E + 5 cv/ml. Durante el cultivo celular la viabilidad disminuyó y se observaron grandes grupos de células. Después de 2 pases en los frascos T volvió a intentarse la adaptación al cultivo en suspensión. En un segundo intento se complementó el medio con heparina, a una concentración de 100 mg/l, para prevenir la aglomeración de células y se aumentó la densidad celular inicial hasta 5,22E + 5 cv/ml. Durante el cultivo de células hubo cierto aumento de la densidad celular y se mantuvo la viabilidad celular. Después se subcultivaron las células en los frascos centrifugadores durante 7 pases adicionales y durante los pases se redujo progresivamente el tiempo de duplicación de las células y al final de los siete pases fue de aproximadamente 1,3 días lo que es comparable a 1,2 días de las células en medio con FBS al 10% en el cultivo celular unido. En el medio IS 293 libre de suero complementado con heparina casi todas las células existían como células individuales sin formar aglomerados de células en el cultivo en suspensión (tabla 12).

Tabla 12. Cultivo en suspensión libre de suero: Adaptación a la suspensión

Nº de pase	Nº de frasco	Tiempo de duplicación promedio (días)
11		Viabilidad disminuida
13		3,4
14		3,2
15	1	Viabilidad disminuida
heparina añadida	2	4,7
	3	5,0
	4	3,1
	16	1
16	2	4,8
	3	4,3
	4	4,3
	17	1
17	2	3,5
	3	2,4
	4	1,7
	18	1

	2	13,1
	3	6,1
	4	3,8
19	1	2,5
	2	2,6
	3	2,3
	4	2,5
20	1	1,3 (97% de viabilidad)
	2	1,5 (99% de viabilidad)
	3	1,8 (92% de viabilidad)
	4	1,3 (96% de viabilidad)

Producción viral y crecimiento de células en cultivo en suspensión libre de suero en frasco centrifugador

5 Para someter a prueba la producción de vectores de Ad5-CMVp53 en el cultivo en suspensión libre de suero, se hicieron crecer las células anteriores adaptadas al cultivo en suspensión libre de suero en medio en 100 ml de IS293 libre de suero complementado con Pluronic F-68 al 0,1% y heparina (100 mg/l) en frascos centrifugadores de 250 ml, se infectaron las células a 5 MDI cuando las células alcanzaron las $1,36E + 06$ células viables/ml en el día 3. Se analizó el sobrenadante todos los días para determinar las partículas virales de HPLC/ml después de la infección. No se detectaron virus en otras muestras que no fueran las del día 3. En el día 3 fue de $2,2E + 09$ pv/ml. El ufp/ml en el día 6 fue de $2,6 \pm 0,6E + 07$ ufp/ml. Se estimó que la producción de ufp por célula era de 19 lo que es aproximadamente 46 veces inferior a la del cultivo unido en el medio complementado con suero. Como control se comprobó el crecimiento de células en ausencia de una infección.

Tabla 13. Cultivo en suspensión libre de suero: Producción viral y crecimiento celular

	Control sin infección viral	Infección viral sin cambio de medios	Infección viral con cambio de medios
Densidad inicial (cv/ml)	$2,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
Densidad celular en la infección (cv/ml)	$9,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Producción viral volumétrica (ufp/ml) 6 días después de la infección	NA	$2,6 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$
Producción viral volumétrica (pv de HPLC/ml) 6 días después de la infección	NA	NA	$1,3 \times 10^{10}$
Producción viral por célula (pv de HPLC/célula)	NA	NA	$1,3 \times 10^4$

Preparación de bancos de células 293 adaptadas a la suspensión libre de suero

20 Tal como se describió anteriormente, después de demostrarse que las células producen los vectores de Ad-p53, se propagaron las células en el medio IS293 libre de suero con F-68 al 0,1% y heparina 100 mg/l en los frascos centrifugadores para producir bancos de células adaptadas a suspensiones libres de suero que contienen $1,0E + 07$ células viables/ml/vial. Para recoger las células, se centrifugaron cuando estaban a mitad de un crecimiento de fase logarítmica y la viabilidad era superior al 90%, y se resuspendieron en el medio IS293 complementado libre de suero, y se centrifugaron nuevamente para lavar las células. Se resuspendieron luego de nuevo las células en el medio de crioconservación que es IS293 frío con F-68 al 0,1%, heparina 100 mg/l, DMSO al 10% y metilcelulosa al 0,1%, dando como resultado $1E + 07$ células viables/ml. Se transfirió la suspensión celular a viales de crioconservación estériles y se sellaron y congelaron en un recipiente criogénico a -70°C durante la noche. Se transfirieron los viales a un almacenamiento en nitrógeno líquido. La prueba de micoplasma fue negativa.

30 Para reactivar las células congeladas se descongeló un vial en 50 ml de medio IS293 libre de suero con F-68 al 0,1% y heparina 100 mg/l en un T-150. Desde ese momento se subcultivaron los cultivos tres veces en frascos centrifugadores de 250 ml. En el otro estudio, se descongeló un vial en 100 ml de medio IS293 complementado libre de suero en un frasco centrifugador de 250 ml. Desde ese momento éstos se subcultivaron en frascos centrifugadores libres de suero 2 veces. En ambos estudios las células crecieron muy bien.

Sustitución de medio y producción viral en cultivo en suspensión libre de suero en frasco centrifugador

35 En la producción viral libre de suero previa en el cultivo en suspensión en el frasco centrifugador la producción viral

por célula fue demasiado baja para que la producción en suspensión libre de suero sea práctica. Se supuso que esto podría deberse al agotamiento de nutrientes y/o la producción de subproductos inhibidores. Para sustituir el medio gastado por medio IS293 complementado libre de suero nuevo, se centrifugaron las células en el día 3 y se resuspendieron en medio IS293 libre de suero complementado con F-68 y heparina (100 mg/l) y la densidad celular resultante era $1,20E + 06$ cv/ml, y se infectaron las células con vectores de Ad5-CMVp53 a 5 MDI. Las pv de HPLC extracelulares/ml eran $7,7E + 09$ pv/ml en el día 3, $1,18E + 10$ pv/ml en el día 4, $1,2E + 10$ pv/ml en el día 5 y $1,3E + 10$ pv/ml en el día 6 y la ufp/ml en el día 6 eran $2,75 +/- 0,86E + 08$ pvt/ml. La razón de partículas virales de HPLC con respecto a las UFP fue aproximadamente de 47. Además las células se han centrifugado y lisado con el mismo tipo de tampón de lisis detergente que el usado en la recogida de CellCube. Las pv de HPLC/ml celulares eran $1,6E + 10$ pv/ml en el día 2, $6,8E + 09$ pv/ml en el día 3, $2,2E + 09$ pv/ml en el día 4, $2,24E + 09$ pv/ml en el día 5 y $2,24E + 09$ pv/ml en el día 6.

La sustitución del medio gastado con un medio IS 293 complementado libre de suero nuevo dio como resultado un aumento significativo en la producción de vectores de Ad-p53. La sustitución de medios aumentó la producción de partículas virales de HPLC extracelulares a 3,6 veces más que el nivel previo en el día 3 y la producción del título de ufp extracelulares diez veces más que el nivel previo en el día 6. Se estimó que la producción de vectores de Ad-p53 por célula era de aproximadamente $1,33E + 04$ pv de HPLC.

Las partículas virales de HPLC intracelulares llegaron a su punto más alto en el día 2 después de la infección y luego el número de partículas disminuyó. Por otro lado las partículas virales extracelulares aumentaron progresivamente hasta el día 6 de recogida. Casi todos los vectores de Adp53 se produjeron durante los 2 días después de la infección y se localizaban intracelularmente y luego se liberaron los virus fuera de las células. Casi la mitad de los virus se liberaron fuera de las células en el sobrenadante entre el día 2 y el día 3 después de la infección y la tasa de liberación disminuyó a lo largo del tiempo.

Todas las células infectadas con vectores de Ad-p53 perdieron su viabilidad al final de 6 días después de la infección mientras que las células en ausencia de infección fueron viables en un 97%. En presencia de la infección el pH del medio gastado sin cambio de medio y con cambio de medio fue de 6,04 y 5,97, respectivamente, mientras que el de ausencia de la infección fue de 7,00 (tabla 12).

Producción viral y cultivo celular en biorreactor con agitación con sustitución de medio y superposición de gases

Para aumentar la producción de vectores de Ad-p53, se utilizó un biorreactor CelliGen de 5 l para proporcionar un ambiente más controlado. En el biorreactor CelliGen de 5 l se controlaron el pH y el oxígeno disuelto así como la temperatura. Se conectaron los gases de oxígeno y dióxido de carbono a la válvula de solenoide para el suministro de oxígeno y el ajuste de pH, respectivamente. Se implementó un agitador de tipo hélice para un mejor mezclado pero generando un ambiente de baja fuerza de corte. Se suministró aire todo el tiempo durante la operación para mantener una presión positiva dentro del biorreactor.

Para inocular el biorreactor se descongeló un vial de células en 100 ml de medio libre de suero en un frasco centrifugador de 250 ml y se expandieron las células en frascos centrifugadores de 250 o 500 ml. Se mezclaron 800 ml de inóculo celular, hecho crecer en frascos de 500 ml, con 2700 ml de medio nuevo en una garrafa de 10 l y se transfirieron al biorreactor CelliGen mediante presión de gases. El volumen de trabajo inicial del biorreactor CelliGen fue de aproximadamente 3,5 l de cultivo. Se fijaron la velocidad de agitación del agitador de tipo hélice a 80 rpm, la temperatura a 37°C, el pH a 7,1 al inicio y 7,0 después de la infección y el OD al 40% todo el tiempo durante la serie.

La densidad celular inicial fue de $4,3E + 5$ cv/ml (97% de viabilidad) y 4 días después, cuando la densidad de células alcanzó $2,7E + 6$ cv/ml (93% de viabilidad) se centrifugaron las células y se resuspendieron las células en un medio nuevo y se transfirieron al biorreactor CelliGen. Después del cambio de medio la densidad celular fue de $2,1E+6$ cv/ml y se infectaron las células a una MDI de 10. Desde ese momento el OD cayó a menos del 40%. Para mantener el OD por encima del 40%, se retiraron aproximadamente 500 ml de cultivo del biorreactor CelliGen para disminuir la demanda de oxígeno del cultivo celular y se colocó la hélice superior cerca de la superficie de contacto entre las fases gaseosa y líquida para mejorar la transferencia de oxígeno mediante el aumento de la renovación de la superficie. Desde ese momento pudo mantenerse el OD por encima del 40% hasta el fin de la serie.

Para el control de pH, se utilizó gas CO₂ para acidificar el cultivo celular y disolución de NaHCO₃ 1 N para hacer el cultivo celular alcalino. Se fijó inicialmente el control de pH a 7,10. El pH inicial del cultivo celular fue de aproximadamente 7,41. Se consumieron aproximadamente 280 ml de la disolución de NaHCO₃ 1N hasta que el pH del cultivo celular se estabilizó a aproximadamente pH 7,1. Después de la infección viral del cultivo celular, se bajó el control de pH hasta pH 7,0 y se cerró la línea de suministro de gas CO₂ para reducir el consumo de la disolución de NaHCO₃. El consumo de demasiada disolución de NaHCO₃ 1 N para el ajuste de pH aumentaría el volumen del cultivo celular de una manera no deseable. Desde ese momento se consumieron 70 ml de disolución de NaHCO₃ 1 N y el pH estuvo en el intervalo entre 7,0 y 7,1 durante la mayor parte del tiempo de la serie. Se controló la temperatura entre 35°C y 37°C.

Después de la infección la viabilidad de las células disminuyó a ritmo constante hasta el día 6 de la recogida después de la infección. En el día de la recogida ninguna de las células era viable. La producción viral volumétrica del biorreactor CelliGen fue de $5,1E + 10$ pv de HPLC/ml comparada con $1,3E + 10$ pv de HPLC/ml en el frasco centrifugador. El ambiente controlado en el biorreactor CelliGen aumentó la producción de vectores de Ad-p53 4 veces comparado con los frascos centrifugadores con sustitución de medio. Esto se debe tanto al aumento de la densidad celular en el momento de infección desde $1,2E + 6$ hasta $2,1E + 6$ cv/ml como al aumento de producción viral por célula desde $1,3E + 4$ hasta $2,5E + 4$ pv/ml. El $2,5E + 4$ pv/ml puede compararse al $3,5E + 4$ pv/célula en el cultivo celular unido complementado con suero.

10 *Producción viral y cultivo celular en biorreactores con agitación y burbujeo*

En el primer estudio se hicieron crecer las células de manera satisfactoria en un biorreactor con agitación para la producción viral y se suministraron el oxígeno y el CO₂ mediante una superposición de gas en el espacio de aire de un biorreactor. Sin embargo, este método limitará el aumento a escala del sistema de cultivo celular por su transferencia de gases ineficaz. Por tanto, en el segundo estudio, para someter a prueba la viabilidad del aumento a escala del cultivo en suspensión libre de suero e investigar el crecimiento de células y la producción de Ad-p53 en un biorreactor con burbujeo, se suministraron gases de oxígeno CO₂ puros mediante el burbujeo a través del medio IS293 libre de suero complementado con F-68 (0,1 %) y heparina (100 mg/l).

Se burbujeó oxígeno puro a través del medio líquido para suministrar el oxígeno disuelto a las células y se controló el suministro de oxígeno puro mediante una válvula de solenoide para mantener el oxígeno disuelto por encima del 40%. Para un suministro de oxígeno eficaz pero minimizando el daño a las células, se utilizó un difusor de aire sinterizado de acero inoxidable con un tamaño de poro nominal que es aproximadamente de 0,22 micrómetros, para la administración de oxígeno puro. Se suministró también el gas CO₂ al medio líquido mediante el burbujeo desde el mismo difusor y tubo que el oxígeno puro para mantener el pH a aproximadamente 7,0. Para el control de pH se conectó también una disolución de Na₂CO₃ (106 g/l) al biorreactor. Se suministró aire al espacio de aire del biorreactor para mantener una presión positiva dentro del biorreactor. Las otras configuraciones del biorreactor fueron las mismas que en el primer estudio.

Se desarrollaron células de inóculo a partir de un vial congelado. Se descongeló un vial de células congeladas ($1,0E + 7$ cv) en 50 ml de medio en un frasco T-150 y se subcultivó 3 veces en 200 ml de medio en frascos centrifugadores de 500 ml. Se mezclaron 400 ml de células de inóculo, hechas crecer en 2 de los frascos centrifugadores de 500 ml, con medio IS293 con F-68 y heparina en una garrafa de 10 l para constituir 3,5 l de suspensión celular y se transfirió al biorreactor CelliGen de 5 l.

La densidad celular inicial en el biorreactor fue de $3,0E + 4$ cv/ml. La densidad celular inicial es más baja que en primer estudio. En el primer estudio se utilizaron cuatro de los frascos centrifugadores de 500 ml como el inóculo. Incluso con la densidad celular inicial más baja, las células crecieron hasta $1,8E + 6$ cv/ml en el día 7 en el ambiente con burbujeo y la viabilidad fue del 98%. Durante los 7 días de crecimiento, la concentración de glucosa disminuyó desde 5,4 g/l hasta 3,0 g/l y el lactato aumentó desde 0,3 g/l hasta 1,8 g/l.

En el día 7, cuando la densidad celular alcanzó $1,8E + 6$ cv/ml, se centrifugaron las células en el biorreactor y se resuspendieron en 3,5 l de medio IS293 libre de suero nuevo con F-68 y heparina en una garrafa de 10 l. Se infectaron las células 293 con $1,25E + 11$ ufp de Ad-p53 y se transfirieron al biorreactor CelliGen. En el biorreactor, la viabilidad celular fue del 100% pero la densidad de células fue de sólo $7,2E + 5$ cv/ml. Hubo una pérdida de células durante la operación de cambio de medio. El título viral en el medio se midió como $2,5E + 10$ pv de HPLC/ml en el día 2, $2,0E + 10$ en el día 3, $2,8E + 10$ en el día 4, $3,5E + 10$ en el día 5 y $3,9E + 10$ pv de HPLC/ml en el día 6 de recogida. El primer estudio en biorreactor CelliGen con superposición de gases produjo $5,1E + 10$ pv de HPLC/ml. La menor concentración de virus en la segunda serie se debió probablemente a la densidad celular más baja en el momento de la infección. En comparación con $7,2E + 5$ cv/ml en la segunda serie, se utilizaron $2,1E + 6$ cv/ml en la primera serie. En realidad se estimó que la producción de Ad-p53 por célula en el segundo biorreactor CelliGen con burbujeo era de $5,4E + 4$ pv/célula, que es la producción de células más alta jamás alcanzada hasta ahora. La producción por célula en el primer biorreactor CelliGen libre de suero sin burbujeo y en el frasco T complementado con suero fue de $2,5E + 4$ pv/célula y $3,5E + 4$ pv/célula, respectivamente.

Después de la infección viral, la viabilidad de las células disminuyó desde el 100% hasta el 13% en el día 6 de recogida. Durante esos 6 días después de la infección la concentración de glucosa disminuyó desde 5,0 g/l hasta 2,1 g/l y el lactato aumentó desde 0,3 g/l hasta 2,9 g/l. Durante el periodo completo de operación se consumieron aproximadamente 20 ml de disolución de Na₂CO₃ (106 g/l).

Los resultados experimentales muestran que es técnica y económicamente factible producir Ad-p53 en el biorreactor con burbujeo y agitación. El aumento a escala y la operación unitaria a gran escala del biorreactor con burbujeo y agitación están bien establecidas.

Todas las composiciones y/o los métodos dados a conocer y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva en vista de la presente descripción.

Bibliografía

- 5 Aboud *et al.*, *Arch. Virol.*, 71:185-195, 1982.
- Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55:1351-1354, 1995.
- Bahnemann *et al.*, *Abs. Pap. ACS*, 180:5. 1980.
- 10 Baichwal y Sugden, en: *Gene transfer*, Kucherlapati R, ed., Nueva York: Plenum Press, págs. 117-148, 1986.
- Benvenisty y Neshif, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986.
- 15 Berg *et al.*, *BioTechniques*, 14(6):972-978, 1993.
- Bett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(19):8802-8806, 1994.
- Bussemakers *et al.*, *Cancer Res.*, 52:2916-2922, 1992.
- 20 Caldas *et al.*, *Nat. Genet.*, 8:27-32, 1994.
- Casey *et al.*, *Oncogene*, 6:1791-1797, 1991.
- Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- 25 Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54:5547-5551, 1994.
- Cheung *et al.*, *Biochem. J.*, 295:427-435, 1993c.
- 30 Cheung *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268:24303-24310, 1993a.
- Cheung *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268:6139-6146, 1993b.
- Coffin, En: *Virology*, Fields BN, Knipe DM, ed., Nueva York: Raven Press, págs. 1437-1500, 1990.
- 35 Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Crooks *et al.*, *J Chrom.*, 502: 59-68, 1990.
- 40 Dubensky *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
- Edelman y Crossin, *Annu. Rev. Biochem.*, 60:155-190, 1991
- Edelman, *Annu. Rev. Biochem.*, 54:135-169, 1985.
- 45 Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Ferkol *et al.*, *FASEB J*, 7:1081-1091, 1993.
- 50 Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Freedman *et al.*, WO 94/17178 (4 de agosto de 1994).
- 55 Frixen *et al.*, *J Cell Biol.*, 113:173-185, 1991.
- Garnier *et al.*, *Cytotechnol.*, 15:145-155, 1994.
- Ghosh y Bachhawat, en: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, Wu G, Wu C ed., Nueva York: Marcel Dekker, págs. 87-104, 1991.
- 60 Giancotti y Ruoslahti, *Cell*, 60:849-859, 1990.
- Gilbert, "Adaptation of cells to serum free culture for production of adenovirus vectors and recombinant proteins", *Williamsburg BioProcessing Conference*, 18-21 de noviembre de 1996.
- 65 Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

- Graham y Prevec, en: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols 7*, Murray, E.J., (Eds.), Clifton, NJ: Humana Press, 109-128 y 205-225, 1991.
- 5 Graham y Van Der Eb, *Virology*; 52:456-467, 1973.
Graham *et al*, *J Gen. Virol.*, 36:59-74, 1977.
Graham, *J. Gen. Virol.*, 68:937-940, 1987.
- 10 Griffiths, en: *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, págs. 179-220, (Eds., Spier, R.E. y Griffiths, J.B.), Academic Press, Londres., 1986
- 15 Harland y Weintraub, *J Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
Hay *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, 175:493-510, 1984.
Hearing y Shenk, *Journal of Molecular Biology*, 167:809-822, 1983.
- 20 Hearing *et al.*, *Journal of Virology*, 67:2555-2558, 1987.
Hermonat y Muzycska, *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- 25 Hollestein *et al.*, *Science*, 253:49-53 1991.
Hussussian *et al.*, *Nature Genetics*, 15-21, 1994.
Huyghe *et al.*, *Human Gene Therapy*, 6:1403-1416, 1996.
- 30 Jones y Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
Kamb *et al.*, *Nature Genetics*, 8:22-26, 1994.
- 35 Kamb *et al.*, *Science*, 267:436-440, 1994.
Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- 40 Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987.
Larsson y Litwin, *Dev. Biol. Standard.*, 66:385-390, 1987.
- 45 Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
Lim, patente estadounidense 4.352.883, 5 de octubre de 1982.
- 50 Lin y Guidotti, *J Biol. Chem.*, 264:14408-14414, 1989.
Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
Matsura *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 66:1122-1130, 1992.
- 55 McGrath *et al.*, *J. Virol.*, 25: 923-927, 1978.
Mercer, *Critic. Rev. Eukar. Gene Express.* 2:251-263, 1992.
Mizrahi, *Process Biochem.*, (agosto):9-12, 1983.
- 60 Montenarh, *Crit. Rev. Oncogen*, 3:233-256, 1992.
Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3396-3397, 1994.
- 65 Morris *et al.*, "Serum-free production of adenoviral vectors for gene therapy," *Williamsburg BioProcessing Conference*, 18-21 de noviembre de 1996.

- Myers, documento EPO 0273085
- 5 Nicolas y Rubenstein, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham: Butterworth, págs. 493-513, 1988.
- Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- 10 Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nilsson y Mosbach, *Dev. Biol. Standard.*, 66:183-193, 1987
- 15 Nobri *et al.*, *Nature (Londres)*, 368:753-756, 1995.
- O'Neil y Balkovic, *Bio/Technol.*, 11:173-178, 1993.
- Obrink, *BioEssays.*, 13:227-233, 1991.
- 20 Odin y Obrink, *Exp. Cell Res.*, 171:1-15, 1987.
- Okamoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:11045-11049, 1994.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res.*, 54:2848-2851, 1994.
- 25 Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- 30 Perrin *et al.*, *Vaccine*, 13(13):1244-1250, 1995.
- Petricciani, *Dev. Biol. Standard.*, 66:3-12, 1985.
- Phillips *et al.*, En: *Large Scale Mammalian Cell Culture* (Feder, J. and Tolbert, W. R., eds.), Academic Press, Orlando, FL, EE.UU., 1985.
- 35 Potter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- 40 Ridgeway, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham: Butterworth, págs. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- 45 Roux *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- 50 Serrano *et al.*, *Science*, 267:249-252, 1995.
- Smith y Lee, *Analytical Biochem.*, 86: 252-263, 1978.
- Takahashi *et al.*, *Cancer Res.*, 52:2340-2342, 1992.
- 55 Temin, en: *Gene transfer*, Kucherlapati R, ed., Nueva York: Plenum Press, págs. 149-188, 1986.
- Tibbetts, *Cell*, 12:243-249, 1977.
- 60 Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Umbas *et al.*, *Cancer Res.*, 52:5104-5109, 1992.
- van Wezel, *Nature*, 216:64-65, 1967.
- 65 Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87(9):3410-3414, 1990.

Wagner *et al.*, *Science*, 260:1510-1513, 1993.

5 Wang *et al.*, en: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, S. Kaminogawa *et al.*, (eds), vol. 5, págs. 463-469, Kluwer Academic Publishers, Países Bajos, 1993.

Wang *et al.*, *Cytotechnology*, 9:41-49, 1992.

10 Wang *et al.*, *Proceeding of the Japanese Society for Animal Cell Technology*, 1994.

Watt *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 83(2):3166-3170, 1986.

Weinberg, *Science*, 254:1138-1146, 1991.

15 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94,1980.

Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.

20 Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.

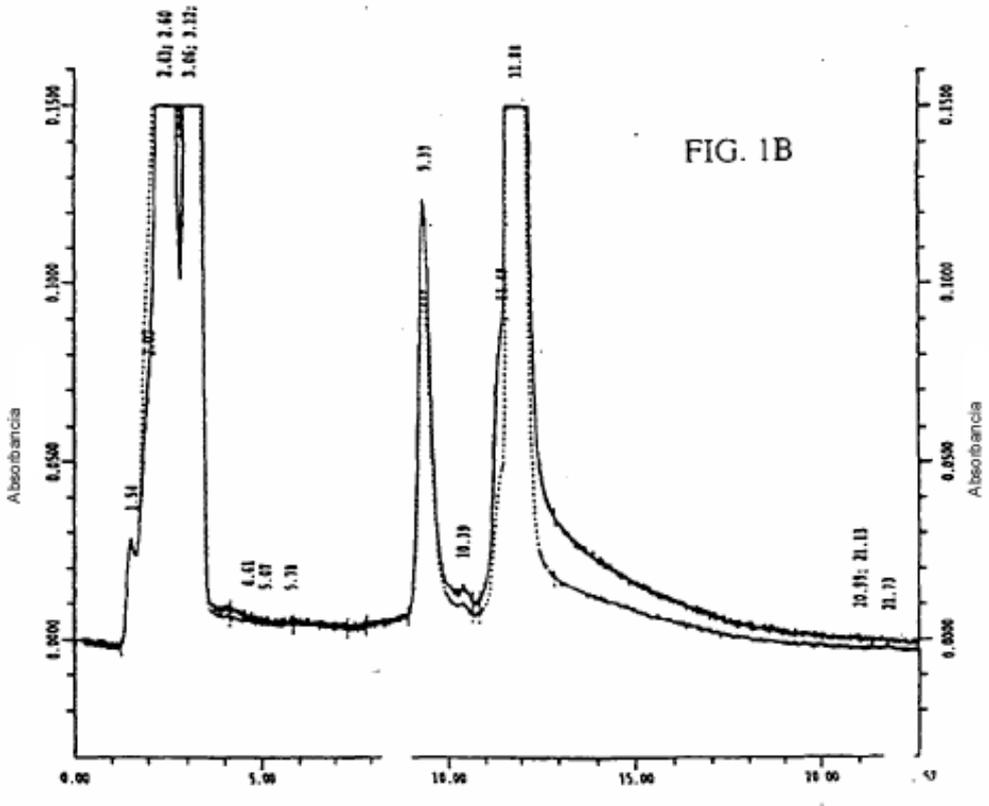
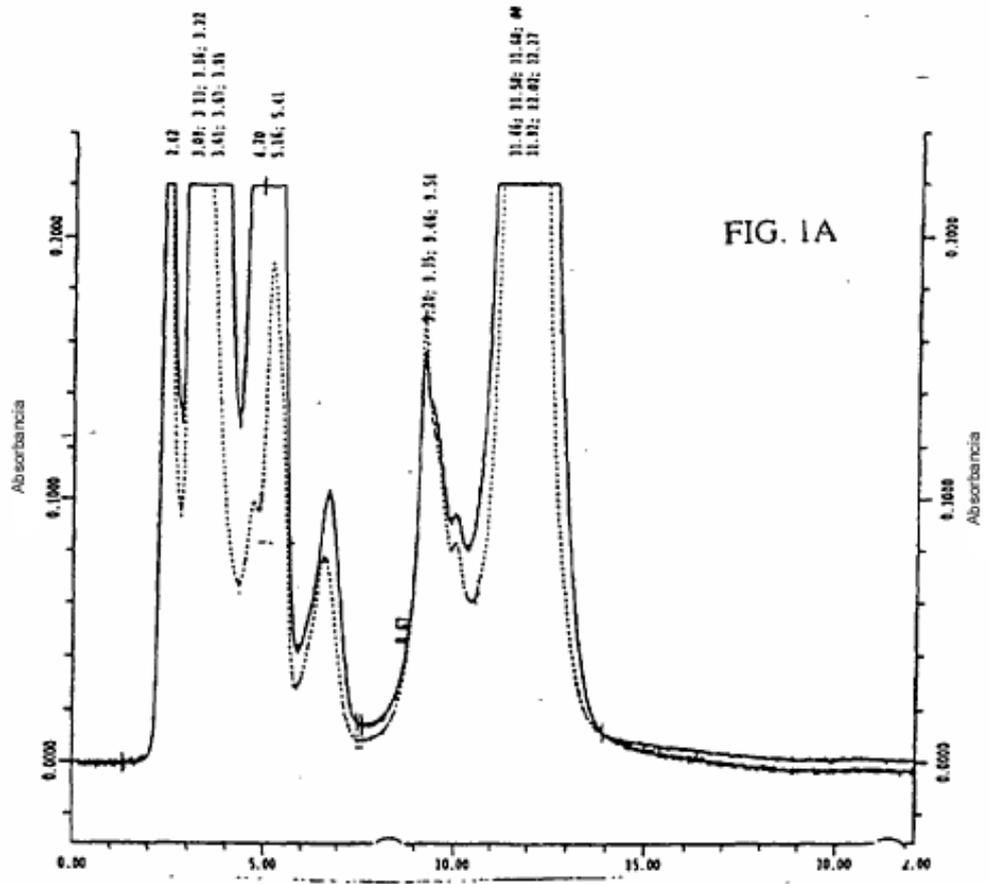
Wu y Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.

Yang *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572,1990.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de adenovirus, que puede obtenerse mediante un método que comprende las siguientes etapas en ese orden:
- a) hacer crecer células huésped proporcionando nutrientes a las células huésped mediante perfusión con un medio que contiene glucosa, en el que se regula la tasa de perfusión del medio para controlar la concentración de glucosa desde 1 g/l hasta menos de 2 g/l;
- 10 b) infectar dichas células huésped con un adenovirus;
- c) recoger y lisar dichas células huésped usando Tween-20 al 1%,
- d) clarificar y filtrar el producto de la etapa c),
- 15 e) concentrar y diafiltrar la disolución de virus usando una membrana de TFF de 300K de NMWC
- f) tratar la disolución de virus de la etapa e) con Benzonase® 100 U/ml durante la noche a temperatura ambiente en presencia de NaCl 1 M,
- 20 g) someter la disolución de virus diluida de la etapa f) a cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Toyopearl Super Q 650 M, y usando al siguiente sistema de tampón: tampón de carga: Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 0,3 M, pH=9,00, tampón de elución: Tris 20 mM + MgCl₂ 1 mM + NaCl 2 M, pH=9,00
- 25 h) concentrar y diafiltrar la disolución de virus de la etapa g) usando una membrana de TFF de 300K de NMWC.
- 30 2. Composición según la reivindicación 1, en la que tras la etapa b) se proporcionan nutrientes a dichas células huésped.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dichos medios están libres de suero.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que dichas células huésped pueden crecer en medios libres de suero.
- 35 5. Composición según la reivindicación 4, en la que dichas células huésped se han adaptado para el crecimiento en medios libres de suero mediante una disminución secuencial en el contenido en suero bovino fetal de los medios de cultivo.
- 40 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dichas células huésped son células 293.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho adenovirus es un adenovirus incompetente para la replicación.
- 45 8. Composición según la reivindicación 7, en la que dichas células huésped pueden completar la replicación.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dichas células se hacen crecer como un cultivo en suspensión celular.
- 50 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dichas células se hacen crecer como un cultivo dependiente de anclaje.
- 55 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicho adenovirus comprende un vector adenoviral que codifica para un constructo génico exógeno.
12. Composición según la reivindicación 11, en la que dicho constructo génico está operativamente unido a un promotor.
- 60 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en la que dicho constructo génico exógeno codifica para un gen terapéutico.

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía única.
 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la recuperación de adenovirus purificado tras la etapa de cromatografía es del $70\% \pm$ el 10% de las UFP de partida.
- 5



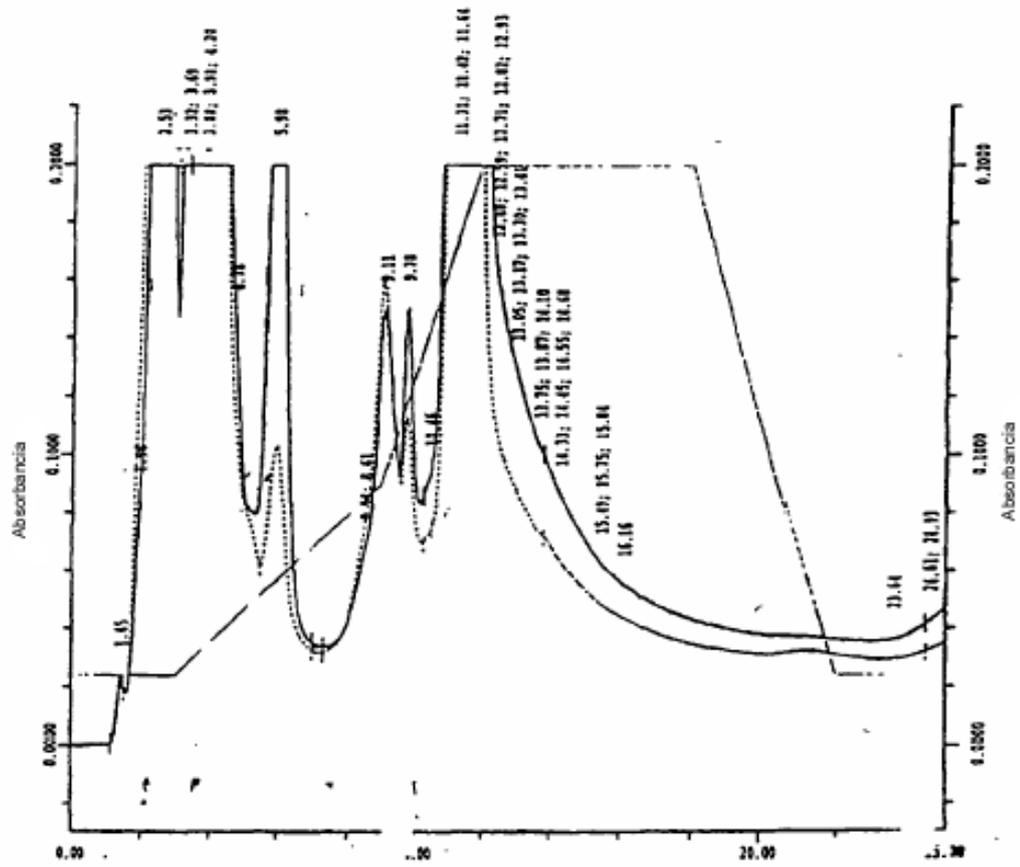


FIG. 2

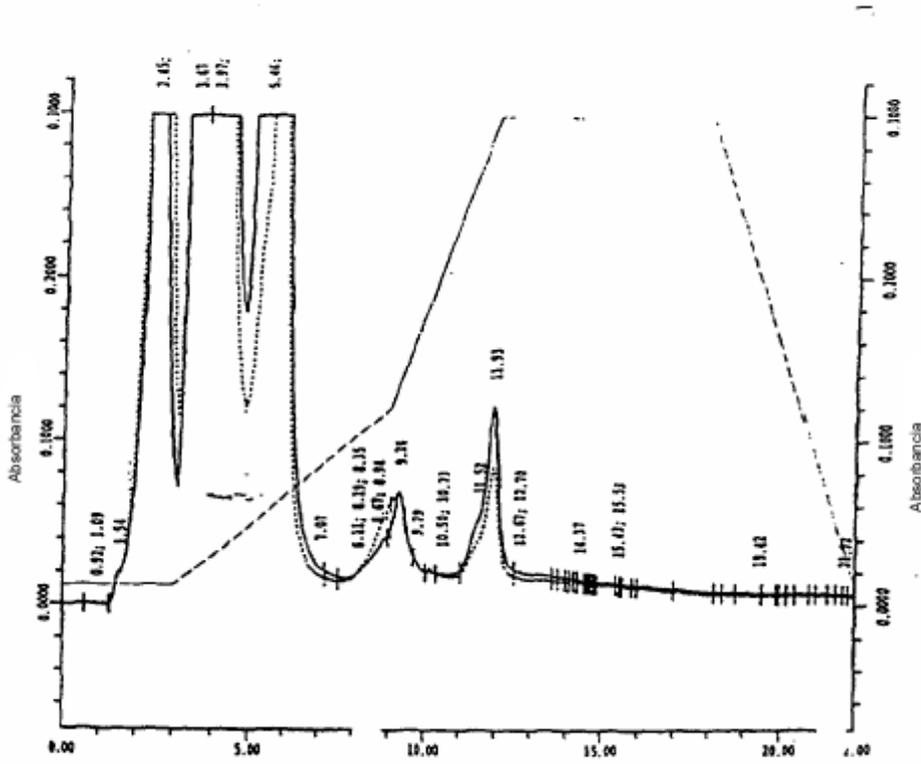


FIG. 3C

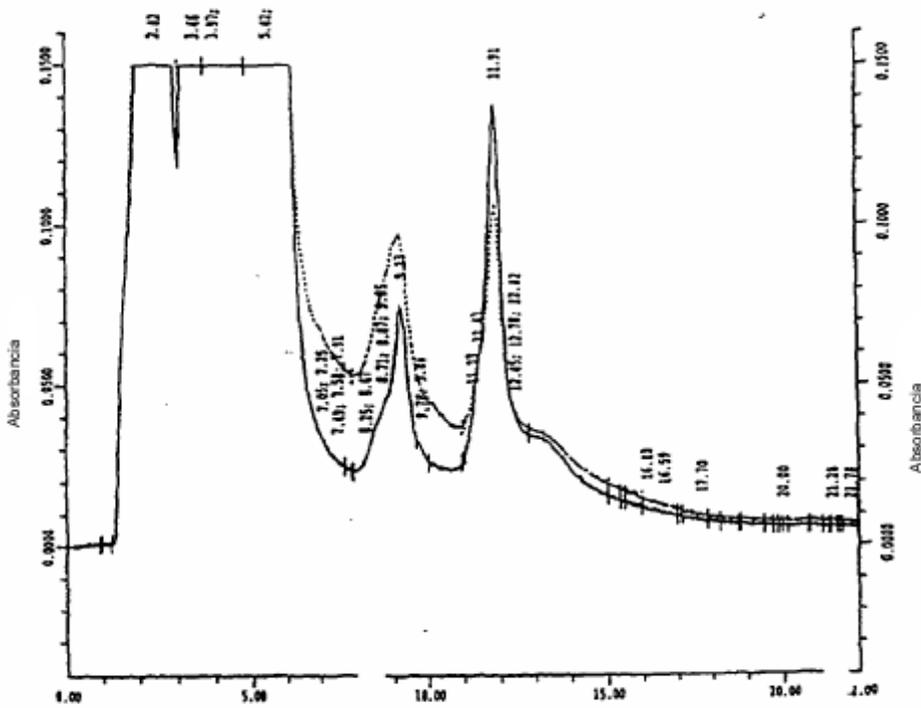


FIG. 3D

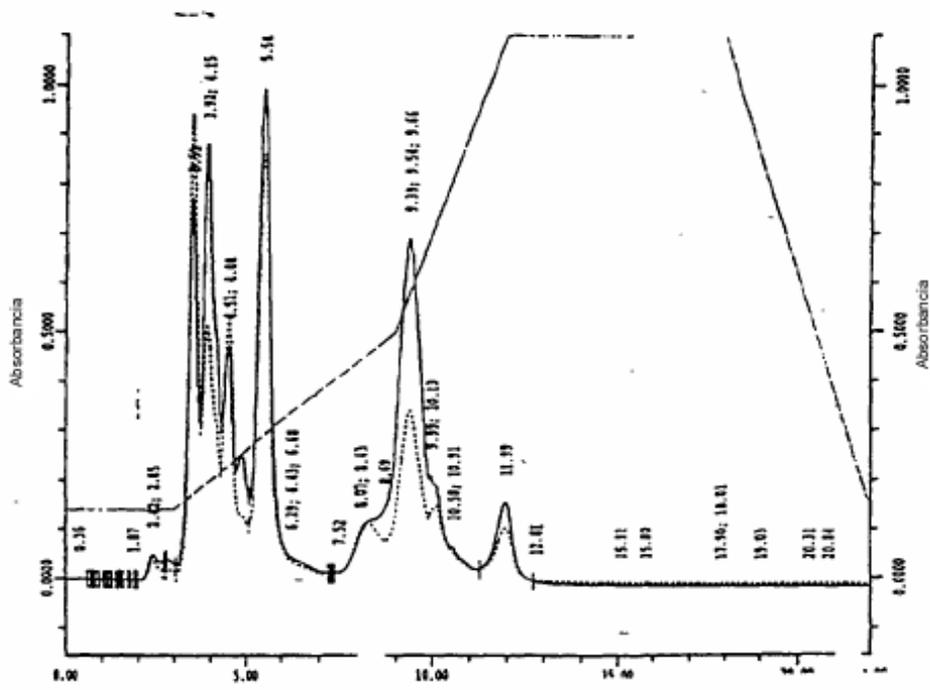
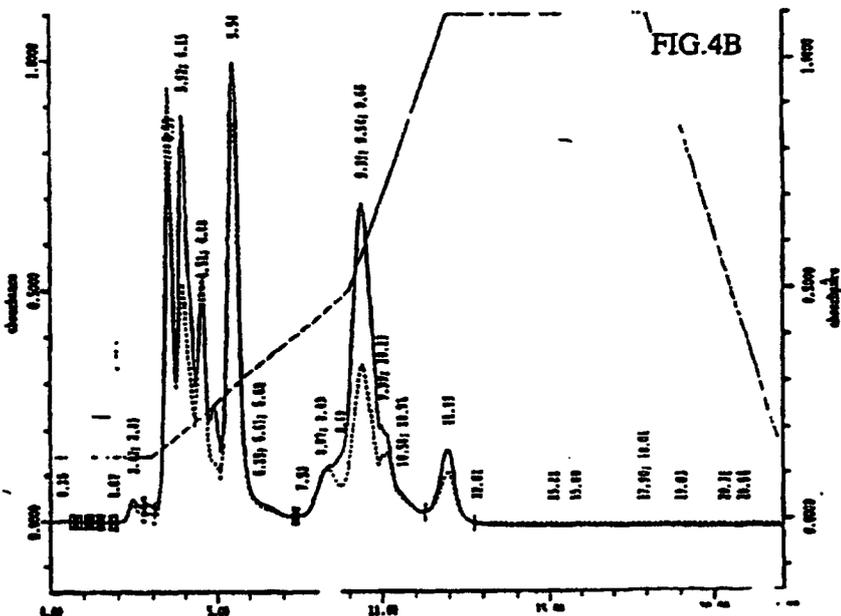
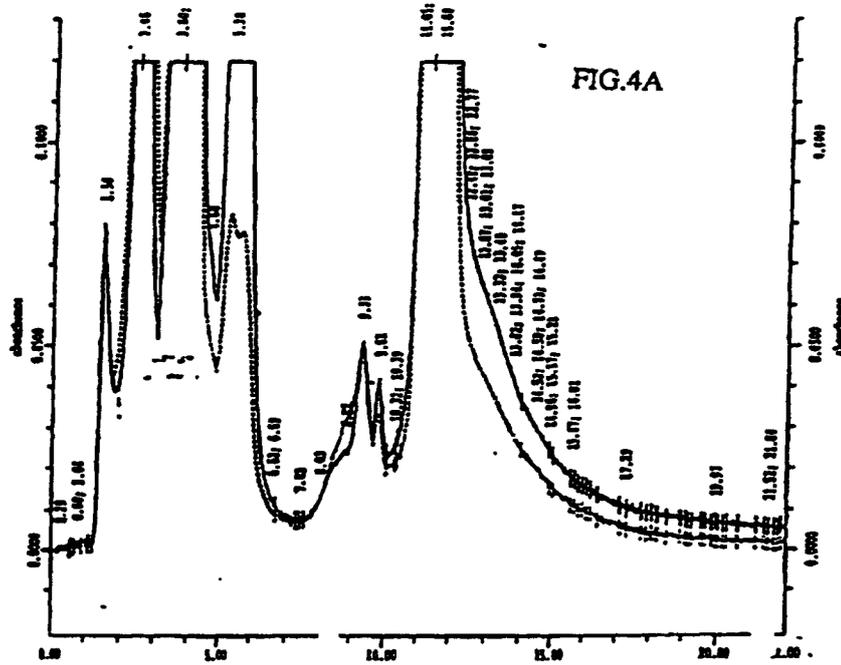


FIG.3E



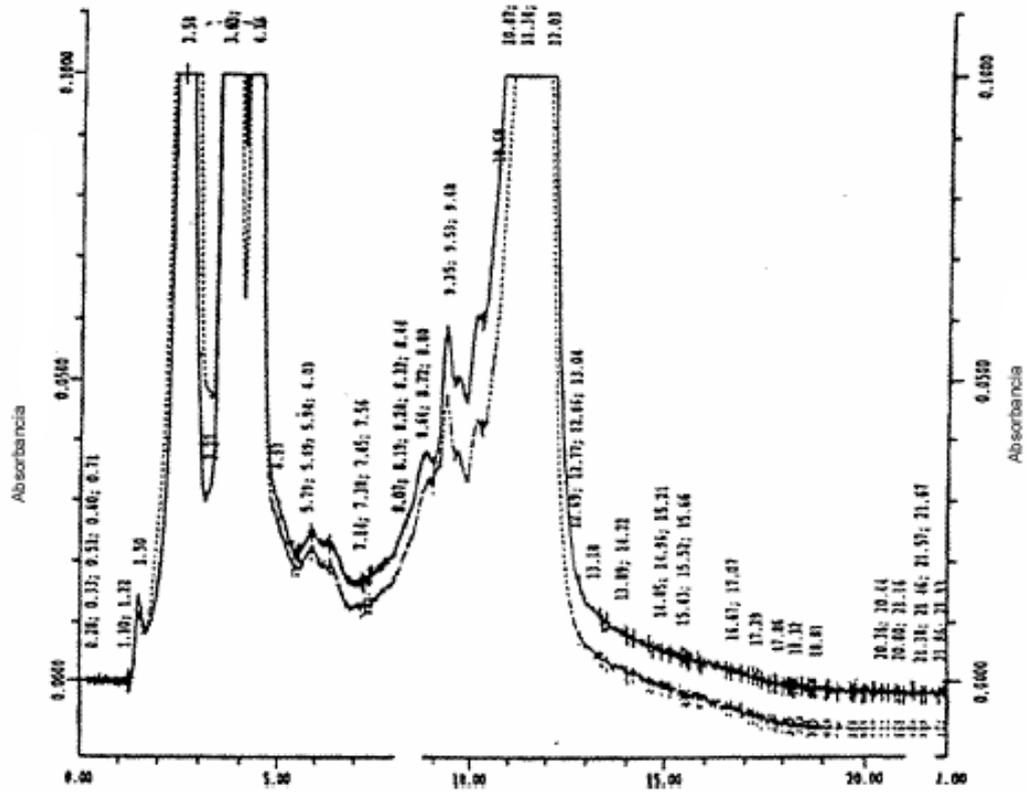


FIG.5

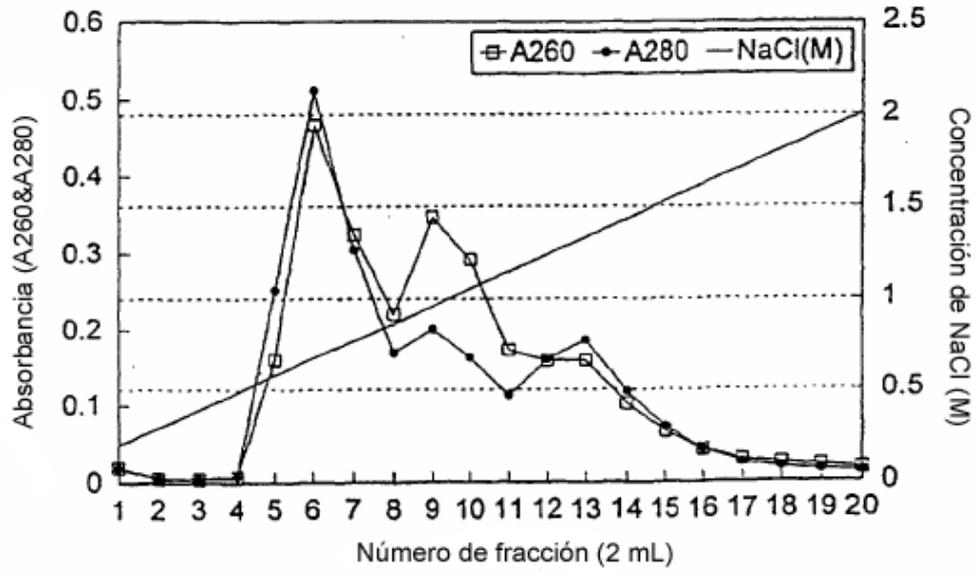


FIG.6

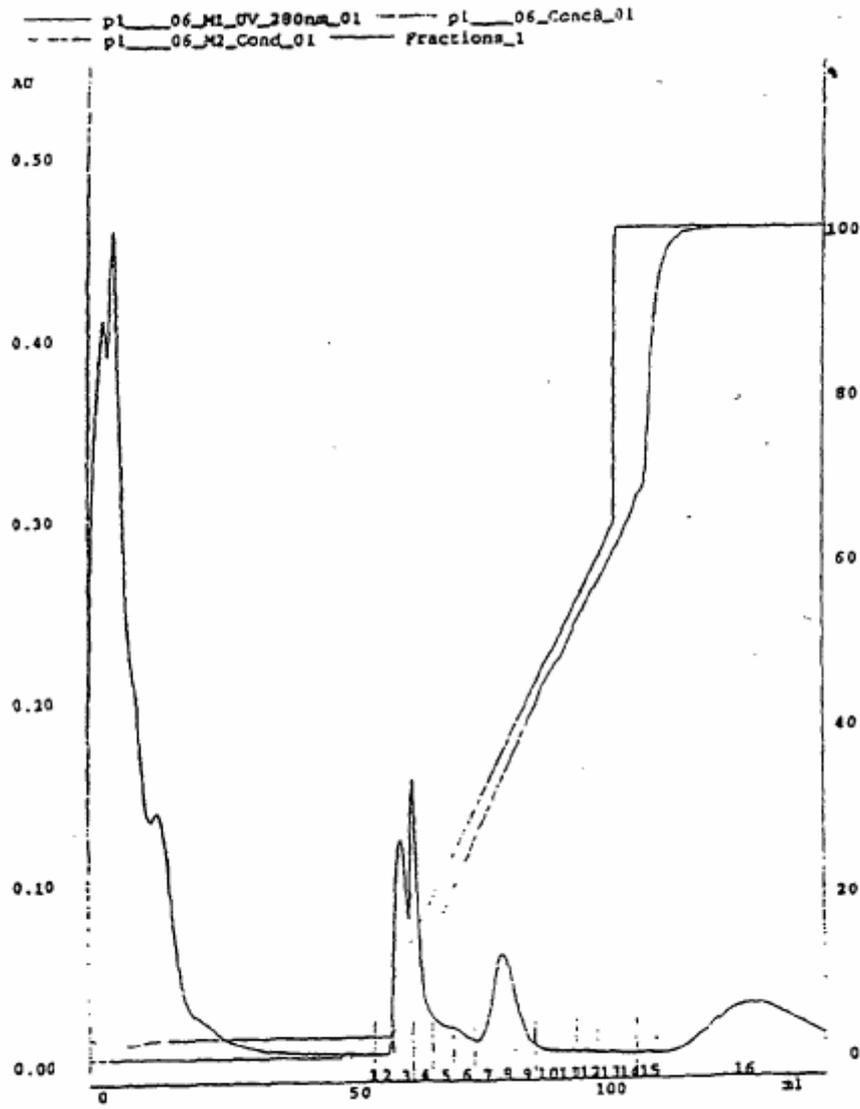
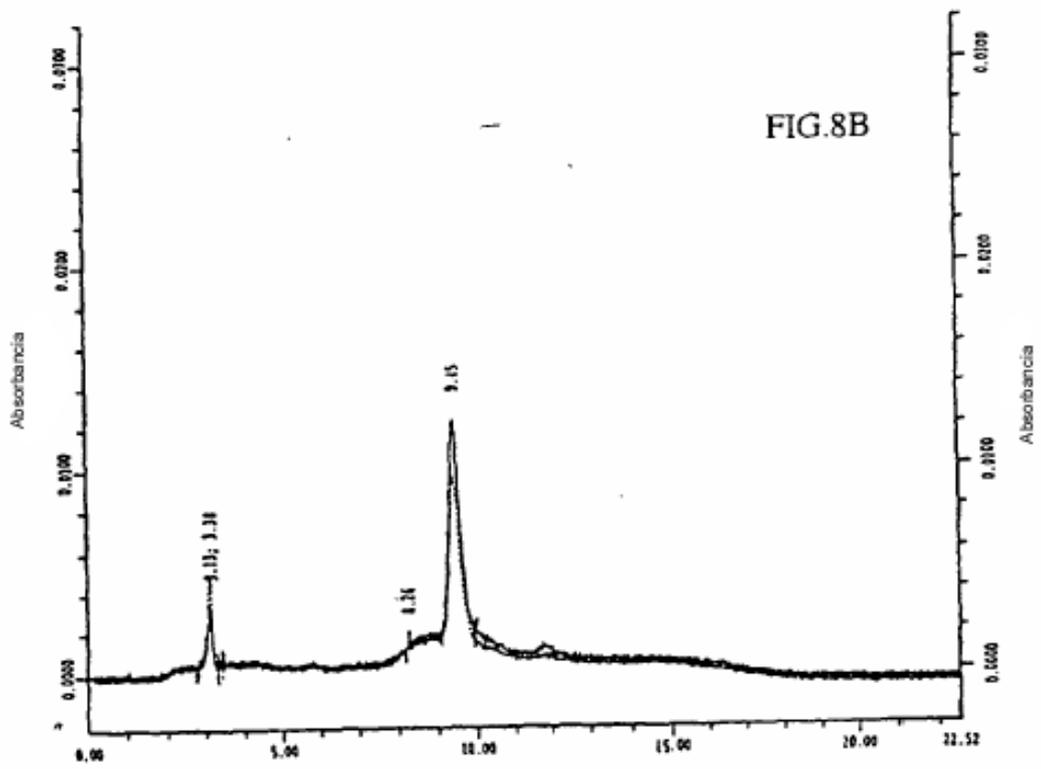
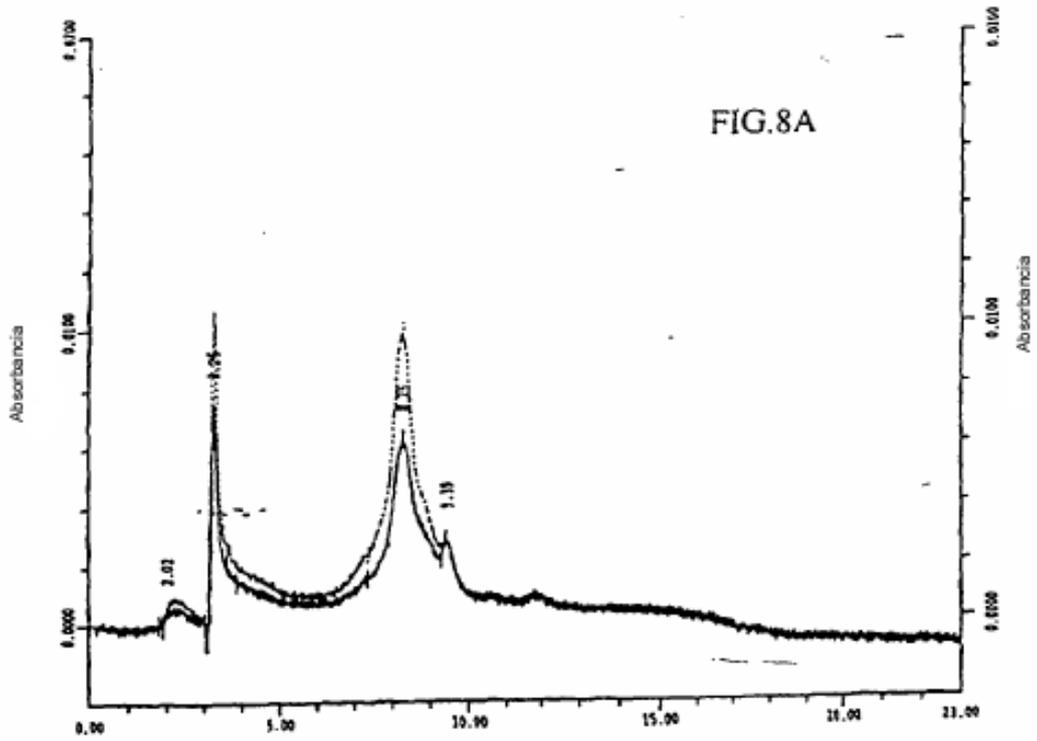
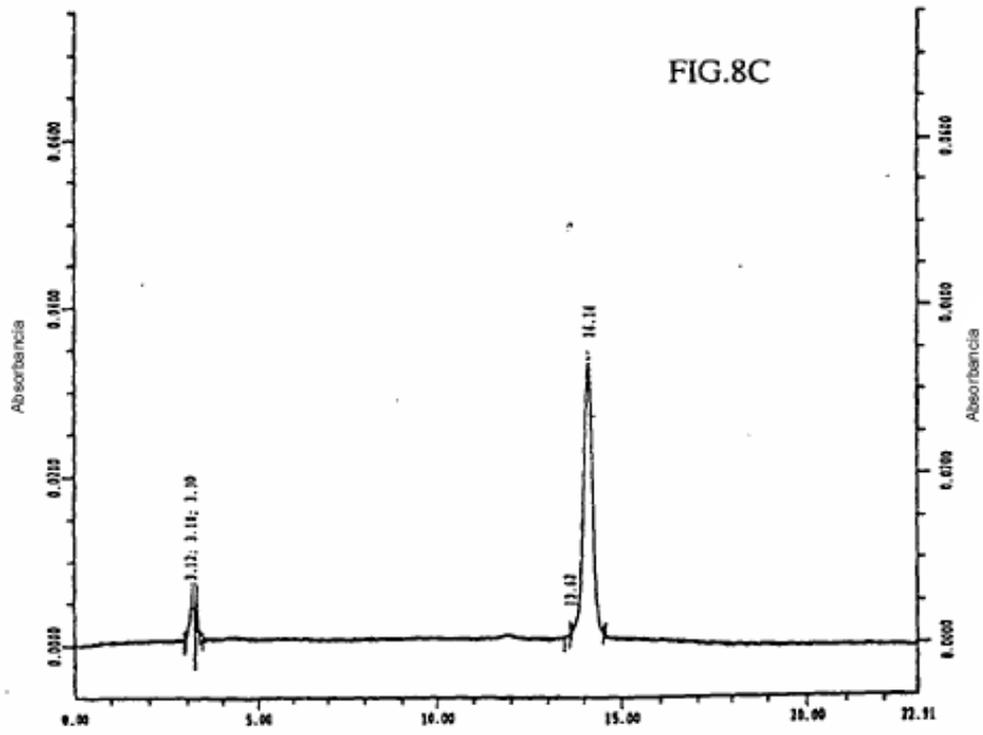


FIG.7





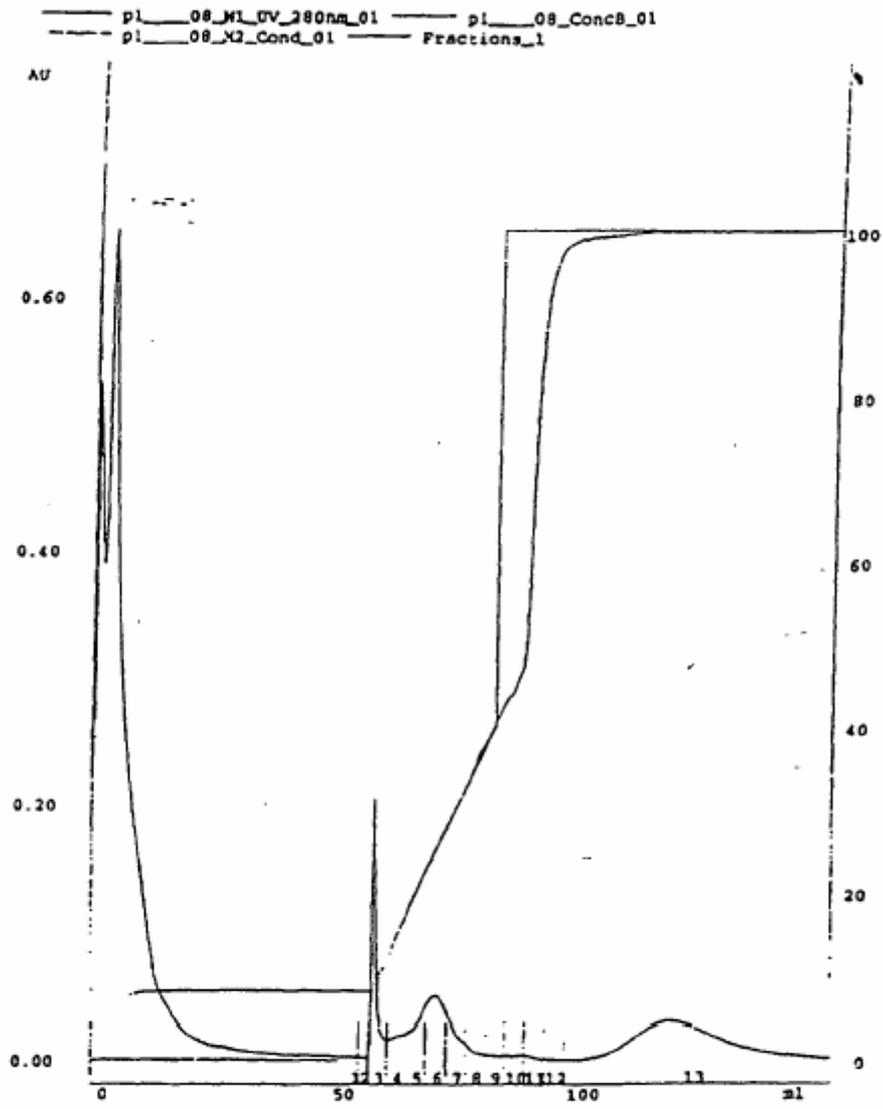
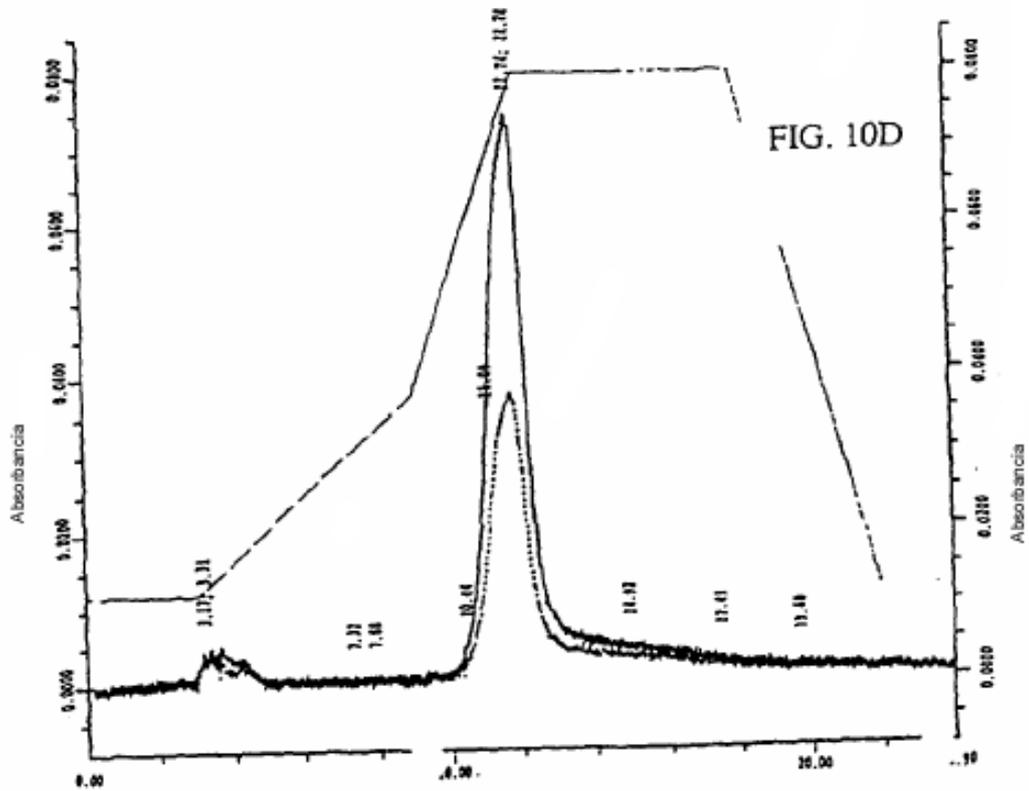
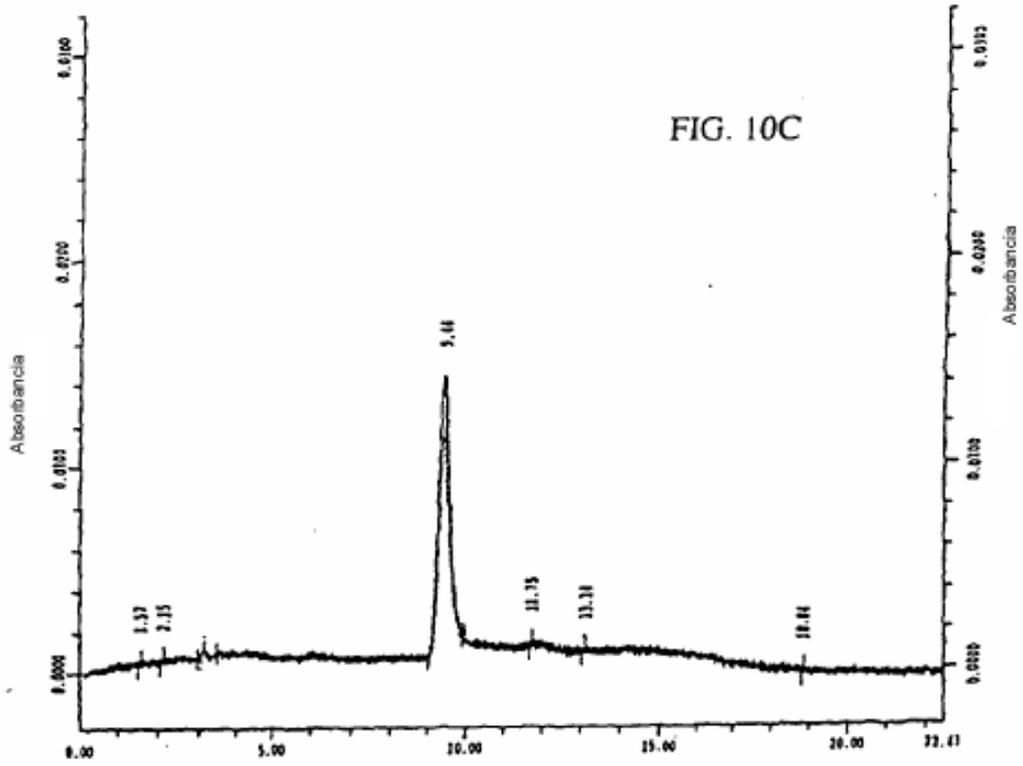
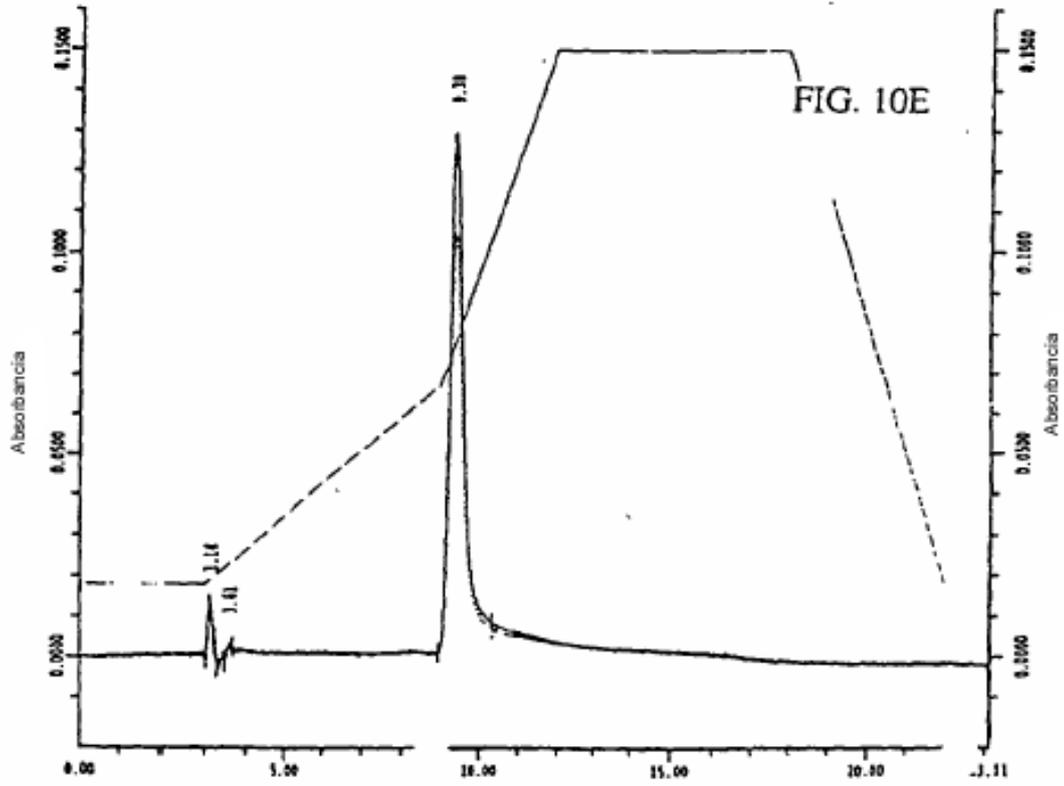


FIG. 9





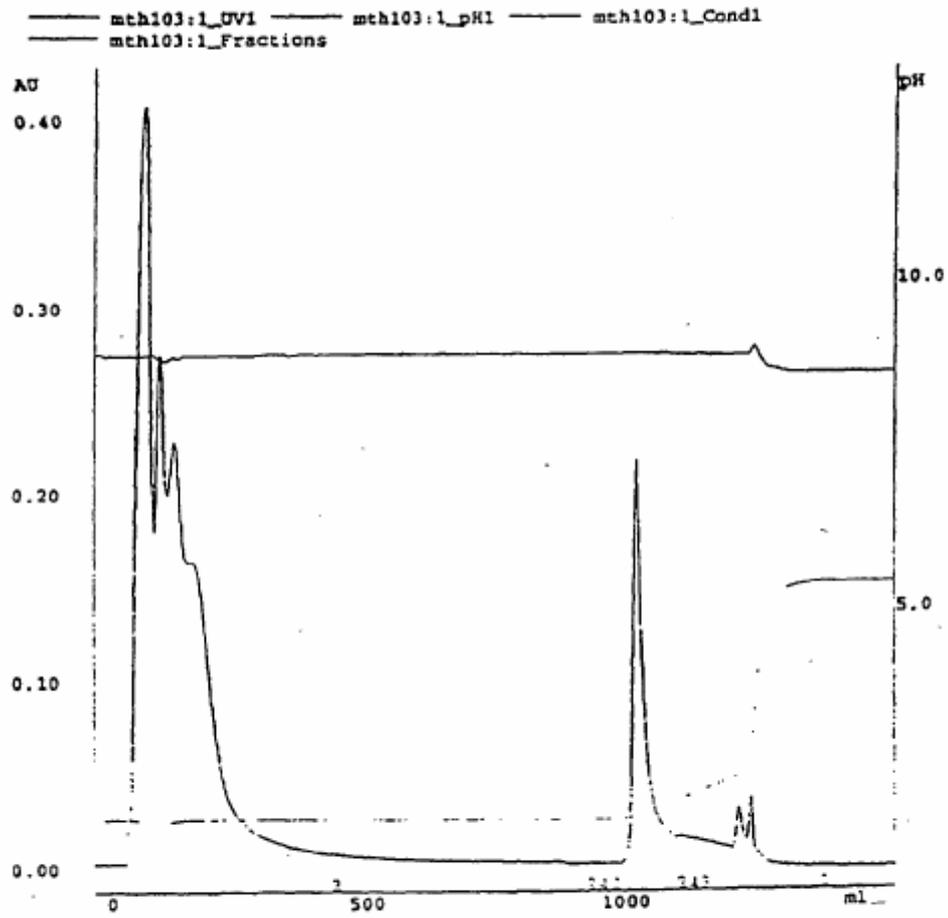


FIG. 11

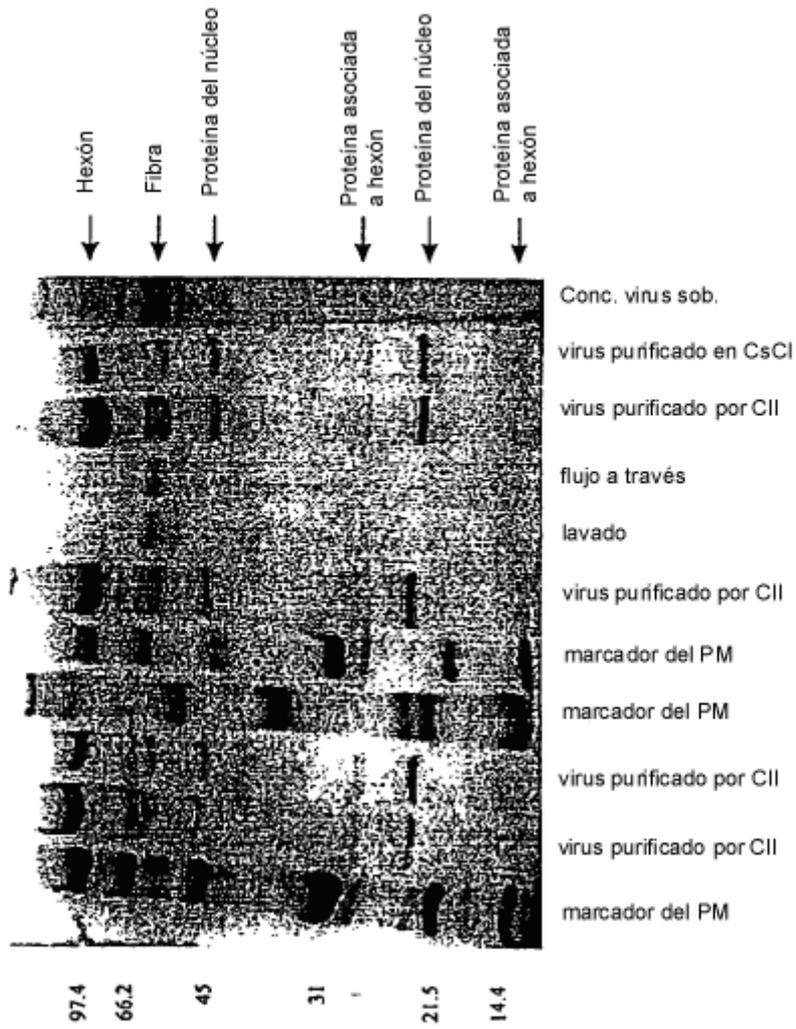


FIG. 12

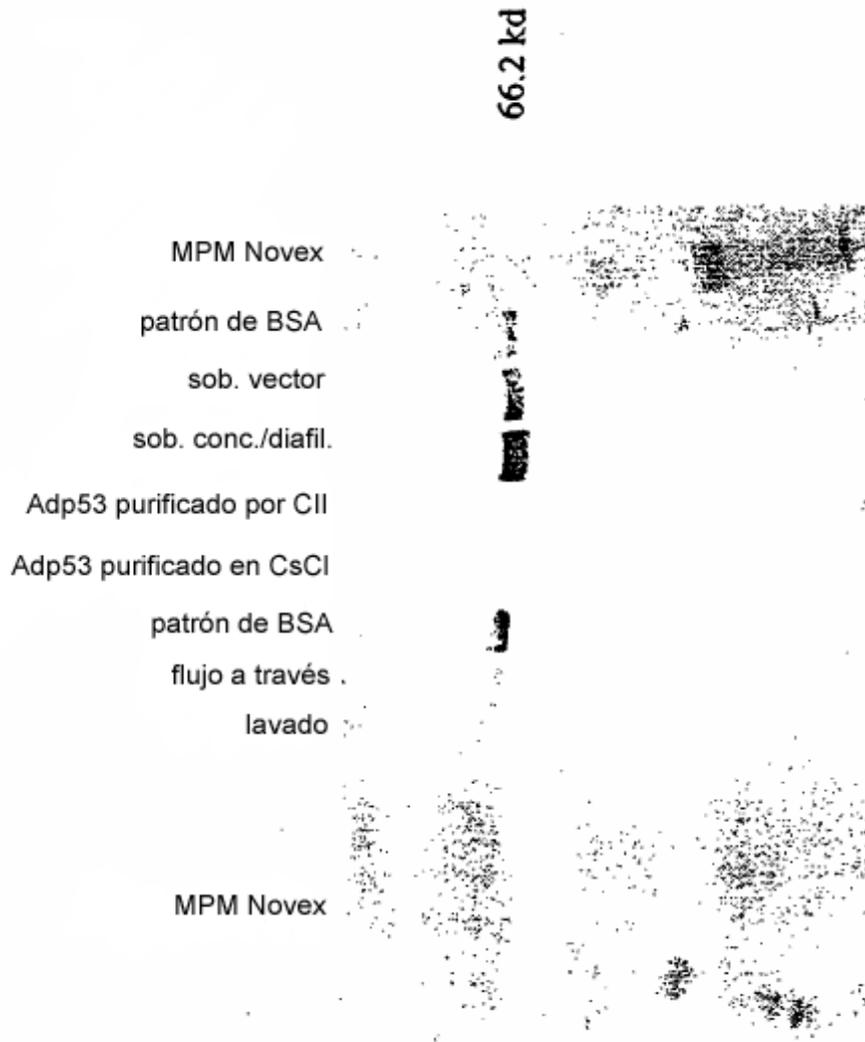


FIG. 13

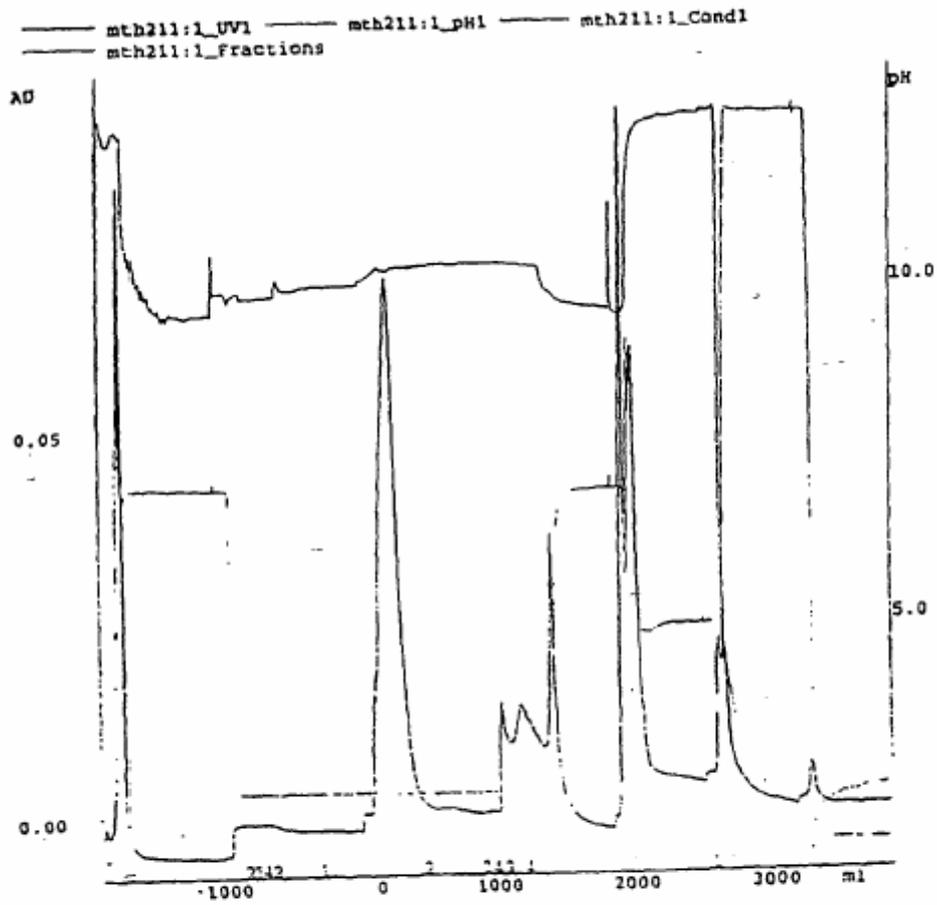


FIG. 14

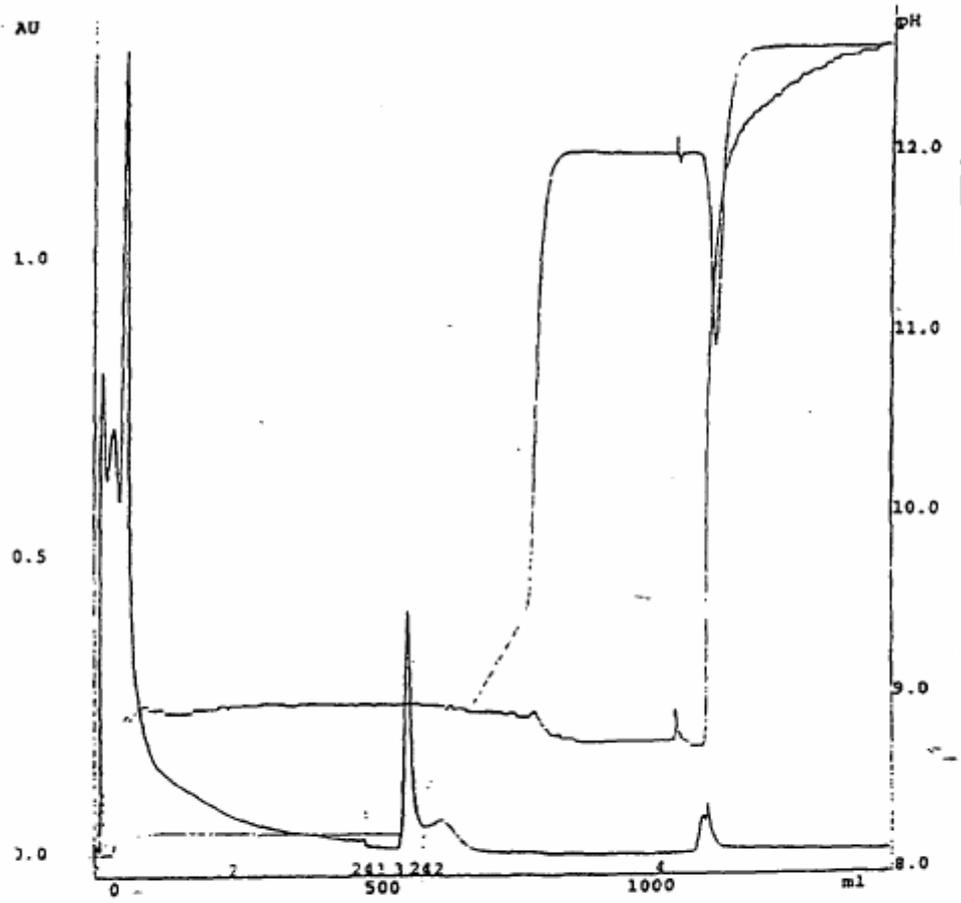
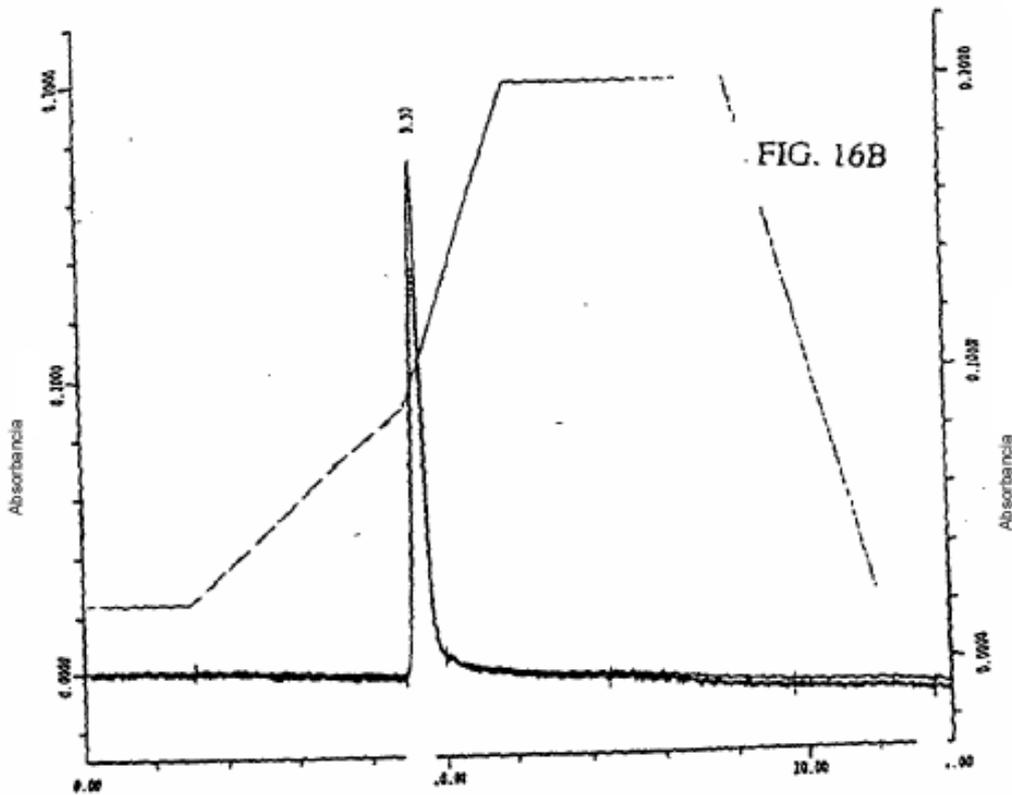
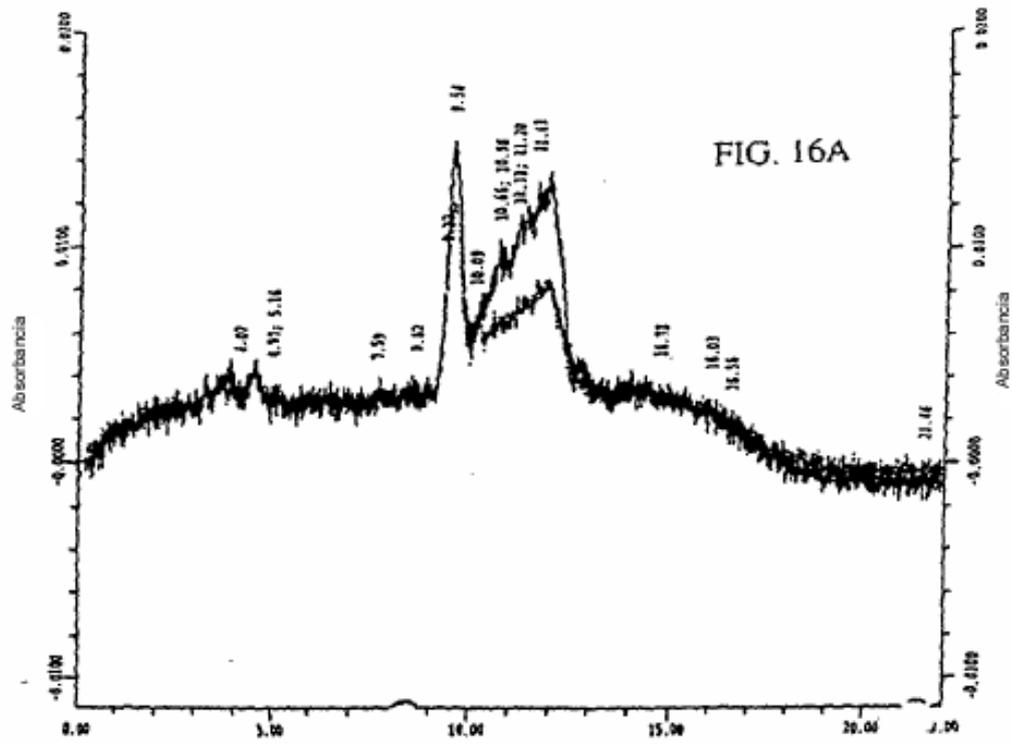


FIG. 15



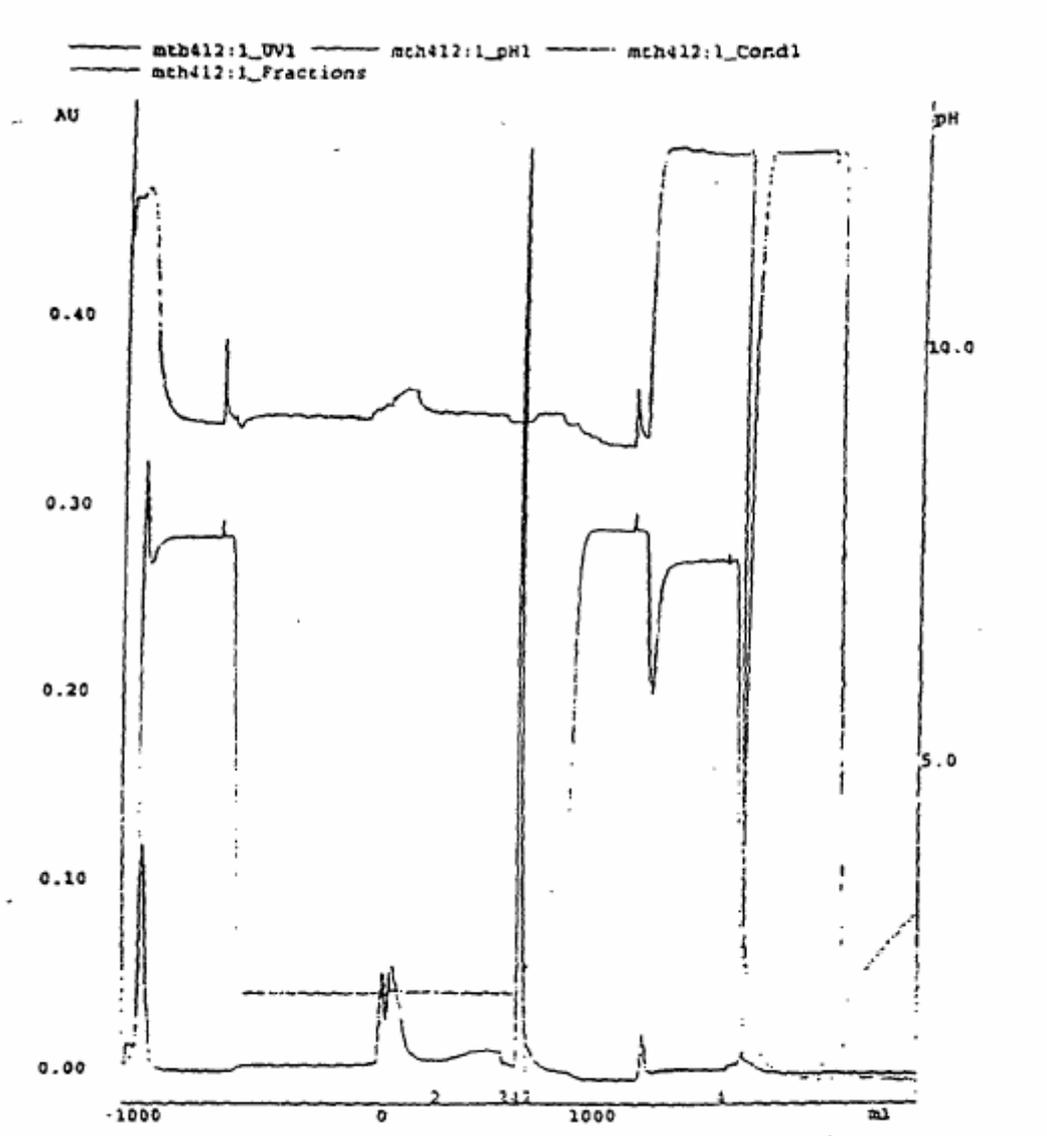


FIG. 17

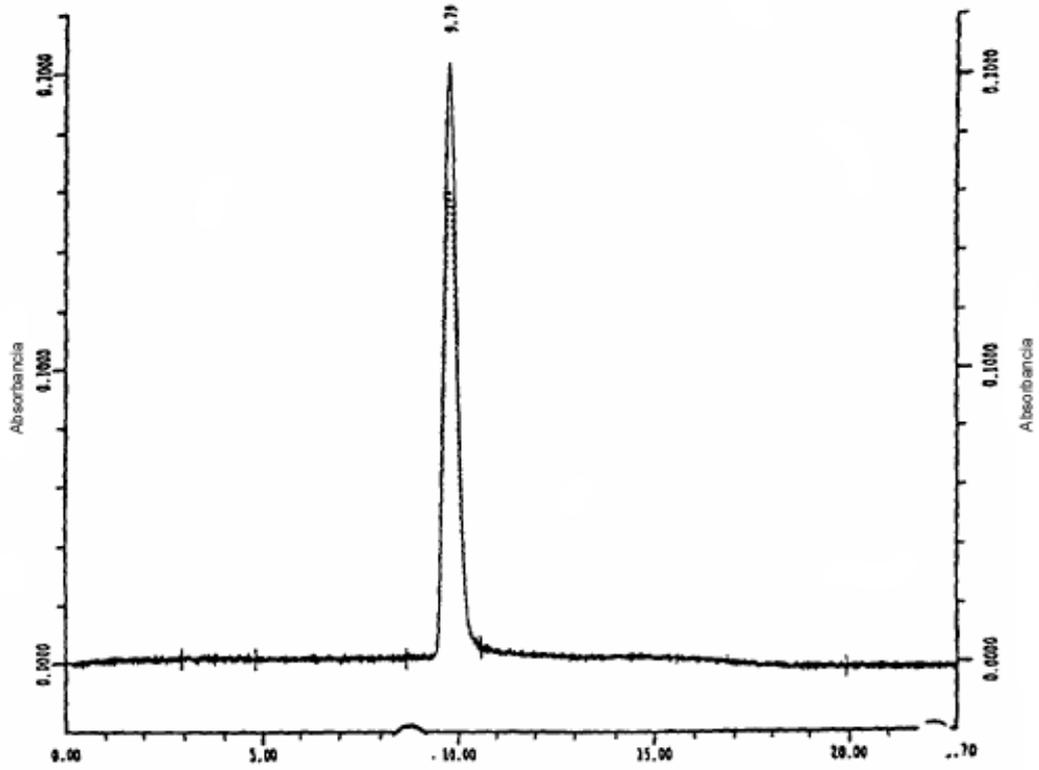
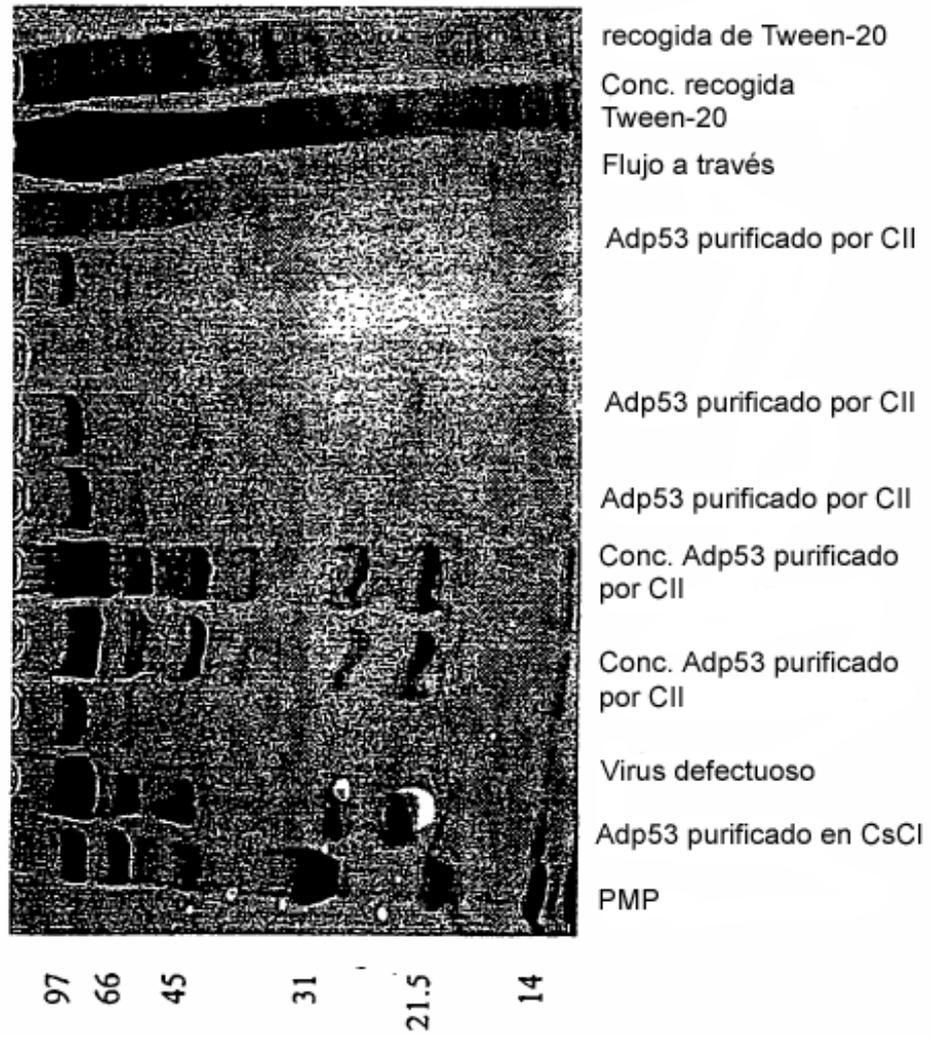


FIG. 18

FIG. 19A



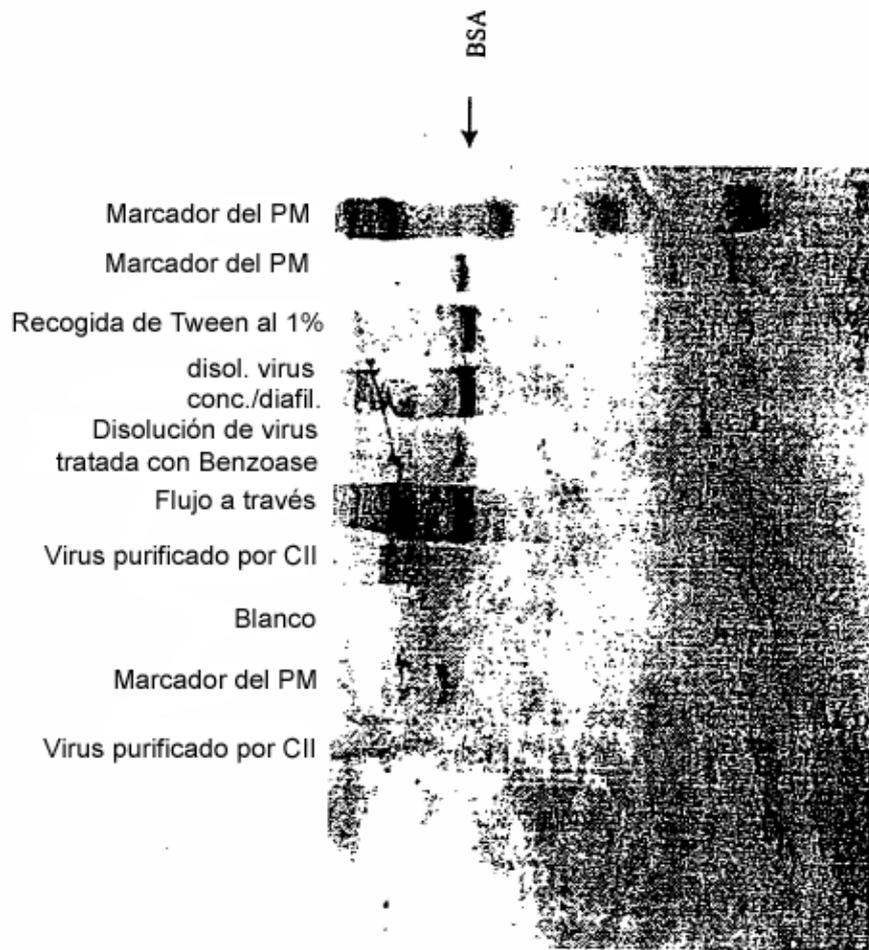


FIG. 19B

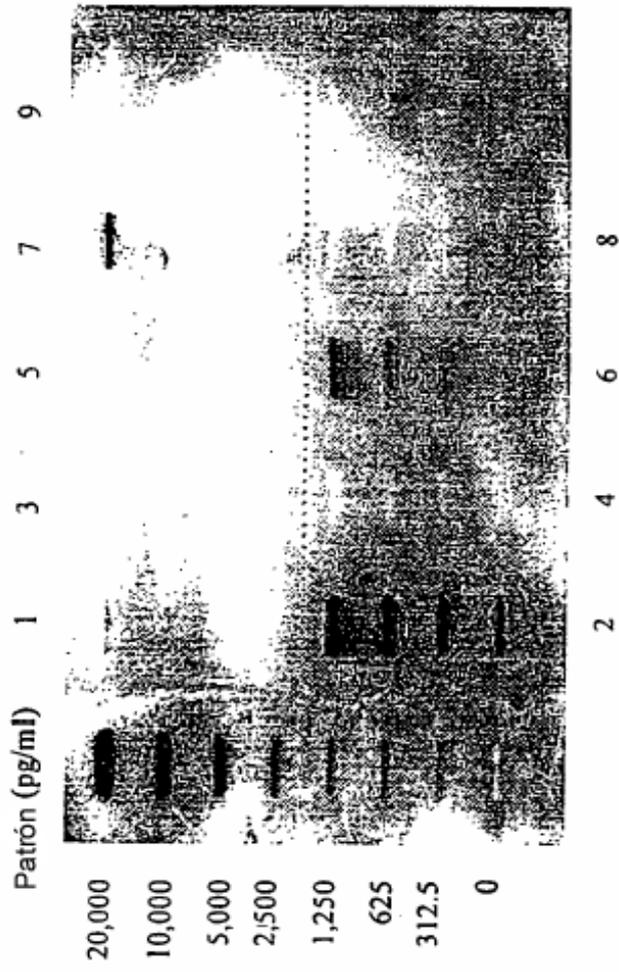
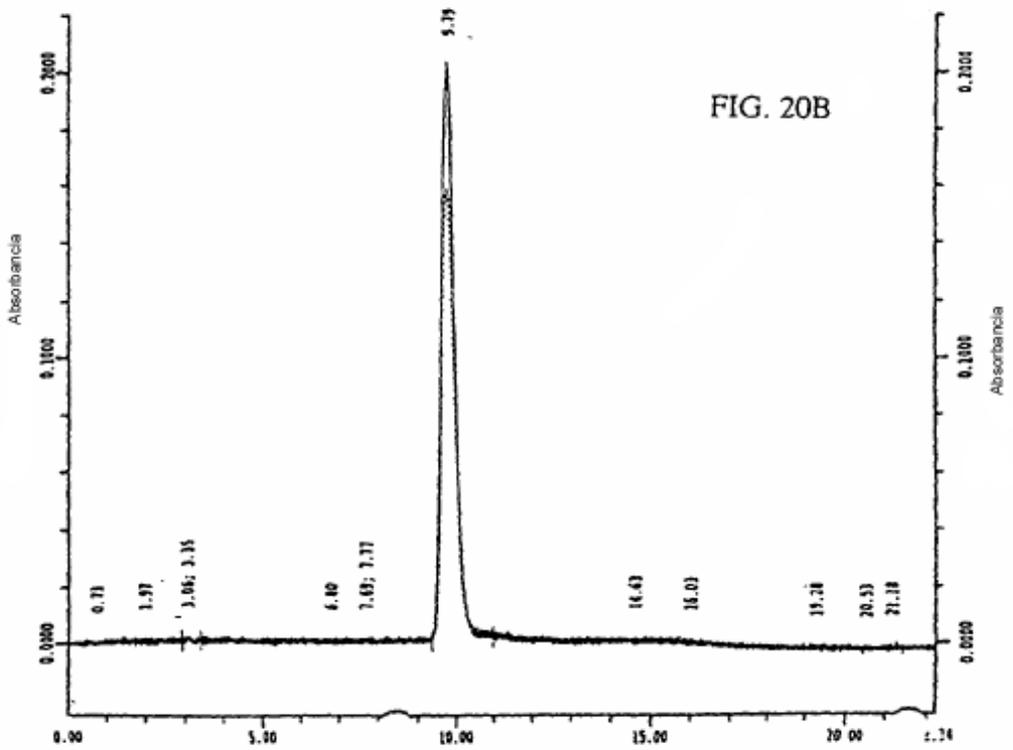
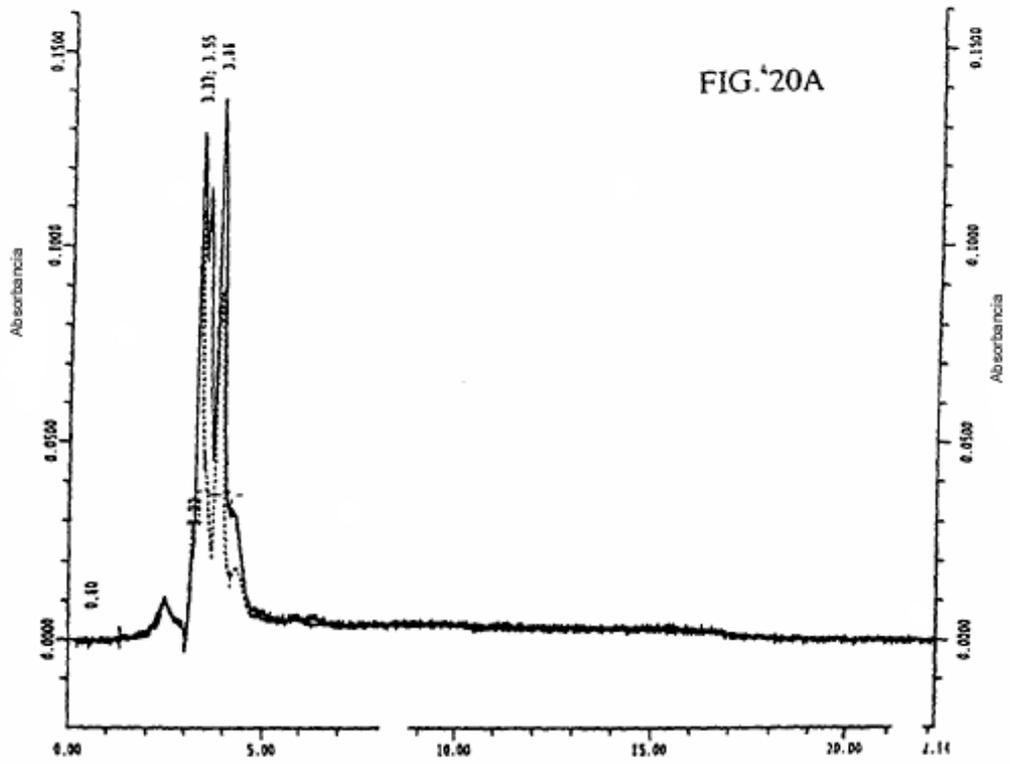
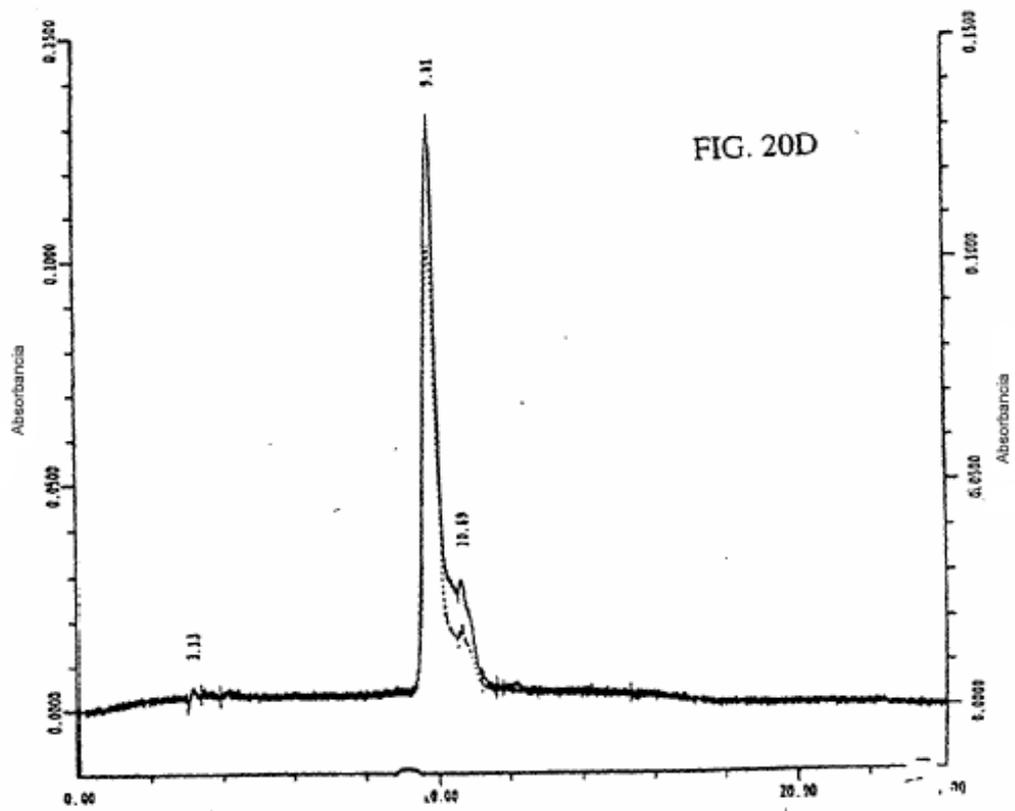
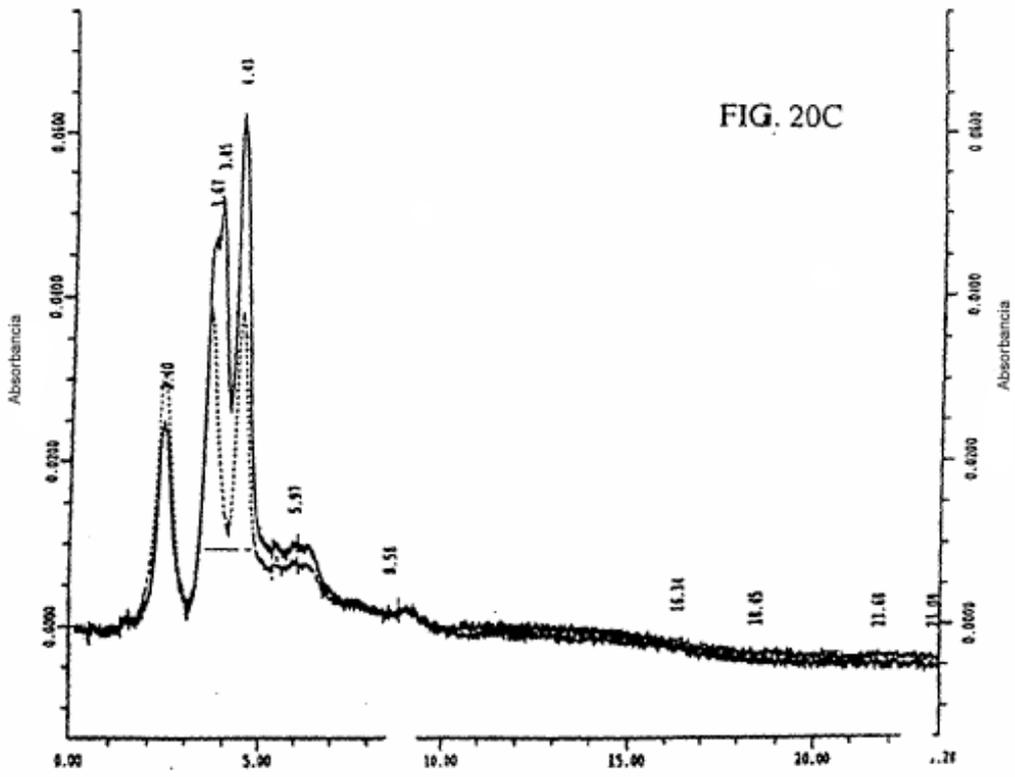
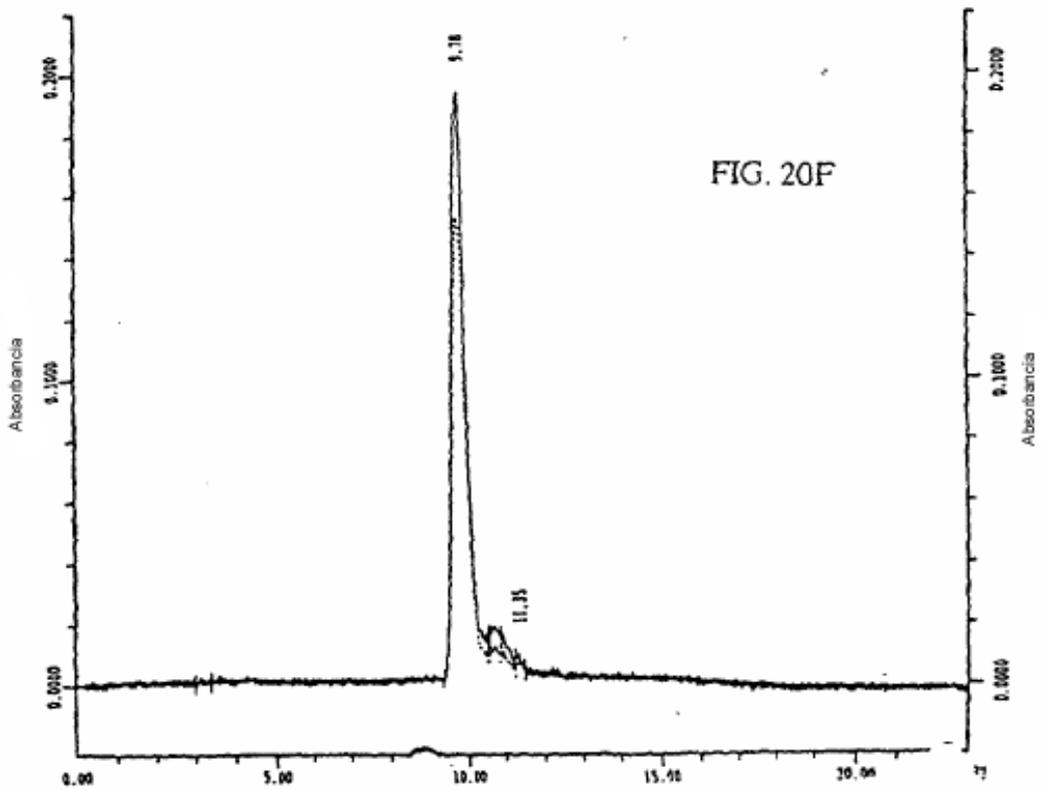
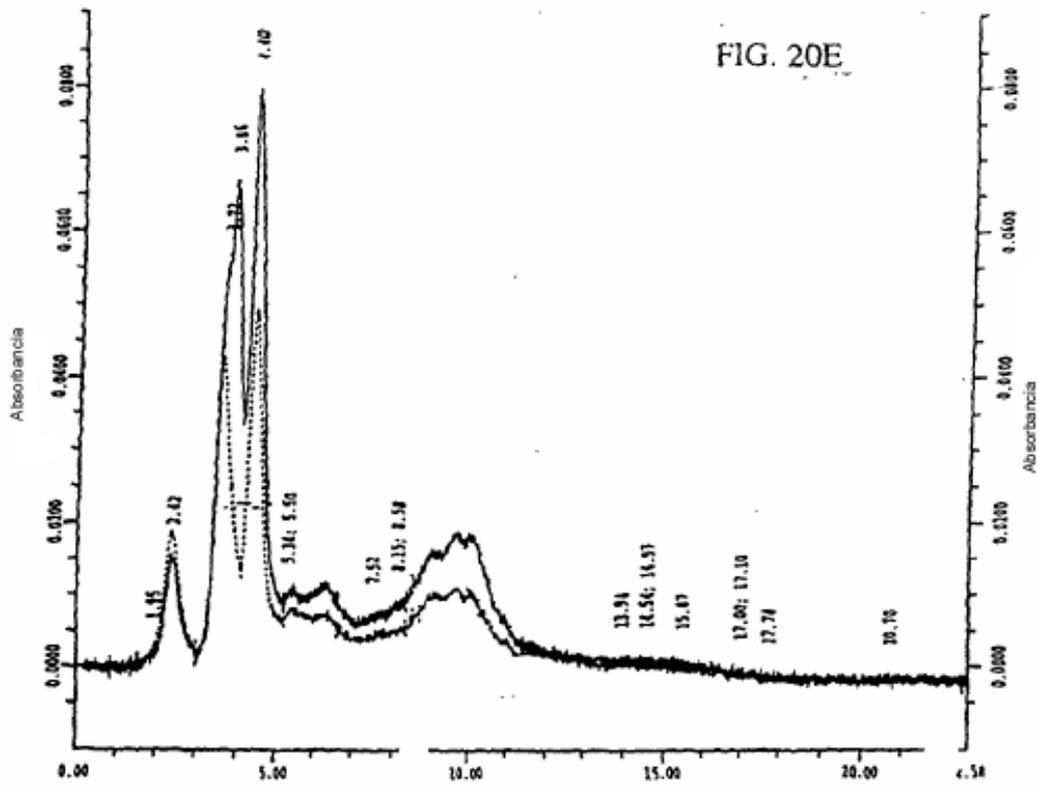


FIG. 19C







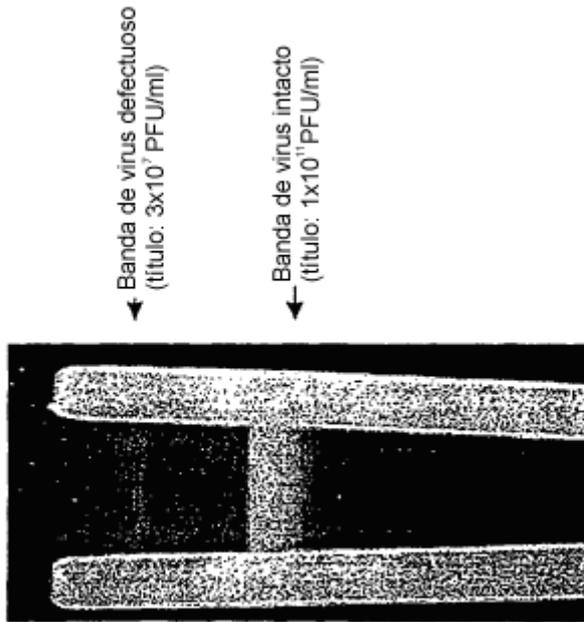
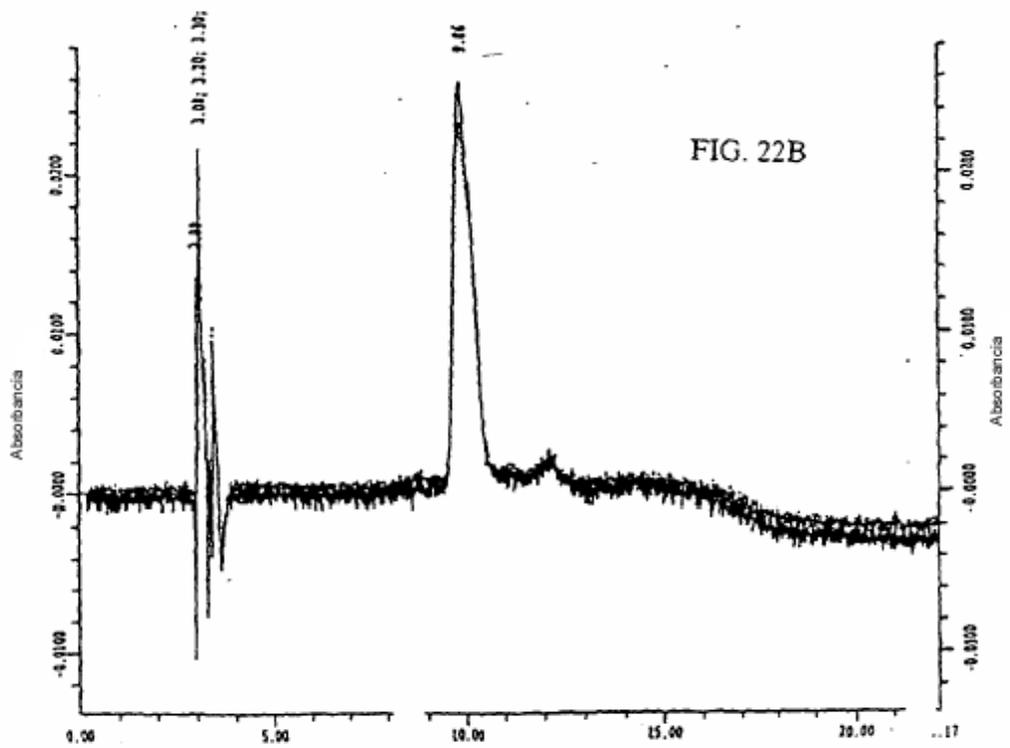
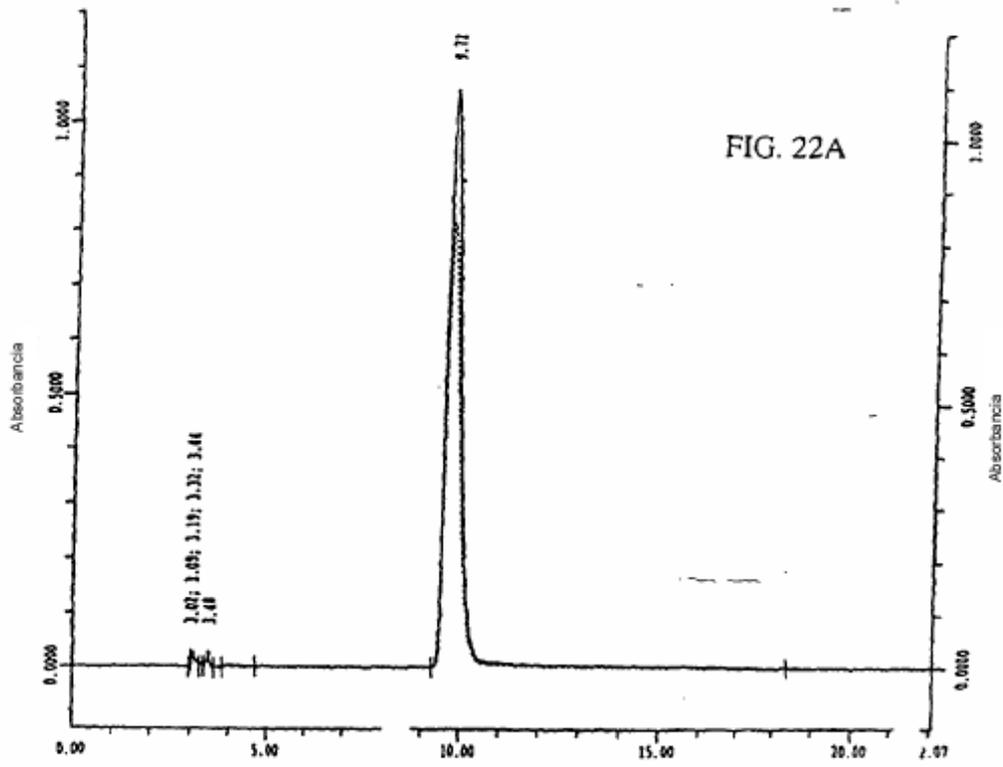


FIG: 21



	Título (PFU/ml)	Vol. (ml)	Rendimiento (UFP)	Recuperación (%)	
				Etapa	Acc.
Cube (tasa de perfusión baja, mantiene glucosa > 1 g/l)					
↓ Tween-20 al 1% en tampón A					
Recogida					
↓ Clarificación y filtración (0,22 µm)					
Disolución de virus	2.6x10 ⁹	1900	4.9x10 ¹²		
↓ Conc./diafil. (conc. 10 veces, diafil. en tampón A de NaCl 1M)					
Conc. sob.	2.5x10 ¹⁰	200	5x10 ¹²	102%	
↓ Tratamiento con Benzoase (durante la noche, TA, 100 u/ml)					
Sob. tratado					
↓ Diluido con agua hasta conductividad = 22-25 mS/cm					
Disolución de virus diluida	7x10 ⁹	700	4.9x10 ¹²	98%	100%
↓					
Virus purificado	1.5x10 ¹⁰	240	3.6x10 ¹²	73%	73%
↓ (conc./diafil. (conc. 5 veces)					
Producto final purificado	7x10 ¹⁰	50	3.5x10 ¹²	97%	71%

FIG. 23