

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 232**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.1998 E 98945922 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1009808**

54 Título: **Procedimientos para la generación de preparaciones de vectores de AAV recombinantes de títulos altos exentas de auxiliares**

30 Prioridad:

05.09.1997 US 925815
16.01.1998 US 71733 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2013

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 Kendall Street
Cambridge, MA 02142 , US

72 Inventor/es:

ATKINSON, EDWARD, MORROW;
FUNG, VICTOR, P.;
WILKINS, PERRY, C.;
TAKEYA, RYAN, K. y
REYNOLDS, THOMAS, C.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 399 232 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

Procedimientos para la generación de preparaciones de vectores de aav recombinantes de títulos altos exentas de auxiliares

5

Campo de la invención

[0001] La presente divulgación se refiere en general al campo de los vectores de virus adenoasociados (AAV) recombinantes y a preparaciones de los mismos que pueden usarse para transferencia génica. Más específicamente, se refiere a procedimientos para generar preparaciones de títulos altos de vectores de AAV recombinantes que estén sustancialmente exentas de virus auxiliares (por ejemplo adenovirus) así como de proteínas celulares.

Antecedentes

15

[0002] Los virus adenoasociados (AAV) tienen rasgos únicos que los hacen atractivos como vectores para terapia génica. Los virus adenoasociados infectan un amplio intervalo de tipos celulares. Sin embargo, no son transformantes y no están implicados en la etiología de ninguna enfermedad humana. La introducción de ADN en células hospedadoras receptoras conduce generalmente a la persistencia a largo plazo y la expresión del ADN sin alterar el metabolismo normal de la célula.

[0003] Existen al menos tres rasgos deseables de una preparación de vector de AAV recombinante para uso en transferencia génica, especialmente en terapia génica humana. En primer lugar, se prefiere que el vector se genere a títulos suficientemente altos para transducir una proporción eficaz de células en el tejido diana. La terapia génica *in vivo* requiere típicamente un alto número de partículas vectoriales. Por ejemplo, algunos tratamientos pueden requerir más de 10^8 partículas, y el tratamiento de fibrosis quística mediante suministro directo a las vías respiratorias puede requerir más de 10^{10} partículas. En segundo lugar, se prefiere que las preparaciones vectoriales estén esencialmente exentas de AAV competentes de replicación (concretamente, AAV de tipo fenotípicamente silvestre que pueda replicarse en presencia de virus auxiliares o funciones de virus auxiliares). En tercer lugar, se prefiere que la preparación de vector de AAVr en conjunto esté esencialmente exenta de otros virus (tales como un virus auxiliar usado en la producción de AAV) así como de virus auxiliares, proteínas celulares y otros componentes tales como lípidos y carbohidratos, para minimizar o eliminar cualquier riesgo de generación de una respuesta inmunitaria en el contexto de la terapia génica. Este último punto es especialmente significativo en el contexto de los AAV, porque el AAV es un virus "dependiente de auxiliar" que requiere coinfección con un virus auxiliar (típicamente adenovirus) u otra provisión de funciones de virus auxiliar para replicarse y empaquetarse eficazmente durante el proceso de producción de AAV y, además, se ha observado que los adenovirus generan una respuesta inmunitaria en el hospedador en el contexto de aplicaciones de terapia génica (véanse, por ejemplo, Byrnes y col., *Neuroscience* 66: 1015, 1995; McCoy y col., *Human Gene Therapy* 6: 1553, 1995 y Barr y col., *Gene Therapy* 2: 151, 1995). Los procedimientos de la presente divulgación se dirigen a estos y otros rasgos deseables de preparaciones de vector de AAVr como se describen e ilustran con detalle a continuación.

[0004] Están disponibles en otro lugar revisiones generales de la virología y genética de los AAV. El lector puede remitirse, entre otros, a Carter, "Handbook of Parvoviruses", vol. I, pág. 169-228 (1989) y Berns, "Virology", pág. 1743-1764, Raven Press, (1990). Lo siguiente es una breve sinopsis para conveniencia del lector. El AAV es un virus defectivo de replicación, lo que significa que se apoya en un virus auxiliar para completar su ciclo de replicación y empaquetamiento en una célula hospedadora. El genoma de AAV comprende generalmente los genes de empaquetamiento *rep* y *cap*, estando proporcionadas otras funciones necesarias en *trans* por el virus auxiliar y la célula hospedadora.

[0005] Las partículas de AAV comprenden una cápsida proteica que tiene tres proteínas de cápsida, VP1, VP2 y VP3, que engloban un genoma de ADN monocatenario lineal de ~4,6 kb. Las partículas individuales empaquetan solo una hebra de molécula de ADN, pero esta puede ser la hebra positiva o negativa. Las partículas que contienen cualquier hebra son infecciosas, y la replicación ocurre mediante conversión de la hebra individual infecciosa progenitora en una forma de dúplex y la posterior amplificación, de la que las hebras individuales de progenie se desplazan a y empaquetan en cápsidas. Las copias de dúplex o monocatenarias de genomas de AAV (a veces designadas como "ADN provírico" o "provirus") pueden insertarse en plásmidos o fagémidos bacterianos, y transfectarse a células infectadas con adenovirus.

[0006] A modo de ilustración, el genoma lineal del serotipo AAV2 está terminado en cada extremo por una secuencia de repetición terminal invertida (RTI). Entre las RTI hay tres promotores de transcripción p5, p19 y p40 que se usan para expresar los genes *rep* y *cap* (Laughlin y col., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5567-5571). Las secuencias de RTI son necesarias *in cis* y son suficientes para proporcionar un origen de replicación funcional, la integración en el genoma celular y una escisión eficaz y recuperación de los cromosomas de la célula hospedadora o plásmidos recombinantes. Los productos génicos de *rep* y *cap* proporcionan funciones para la replicación y encapsidación de genoma vírico, respectivamente, y es suficiente con que estén presentes en *trans*.

[0007] El gen *rep* se expresa por dos promotores, p5 y p19, y produce cuatro proteínas designadas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Solo se requieren Rep78 y Rep68 para la replicación de ADN de dúplex de AAV, pero Rep52 y Rep40 parecen ser necesarias para la acumulación de ADN monocatenario de progenie (Chejanovsky y col., Virology 173: 120, 1989). Rep68 y Rep78 se unen específicamente a la conformación de horquilla de RTI de AAV y poseen varias actividades enzimáticas necesarias para resolver la replicación en los extremos de AAV. Rep78 y Rep68 exhiben también actividades reguladoras pleiotrópicas que incluyen regulación positiva y negativa de los genes de AAV y expresión por algunos promotores heterólogos, así como efectos inhibidores sobre el crecimiento celular. El gen *cap* codifica las proteínas de cápsida VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas comparten una secuencia superpuesta común, pero VP1 y VP2 contienen secuencias aminoterminales adicionales transcritas por el promotor p40 mediante el uso de codones de iniciación alternativos. Se requieren las tres proteínas para una producción de cápsida eficaz.

[0008] Los genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como prolongación de CG (Samulski y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2077-2081), adición de ligadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasa de restricción (Laughlin y col., 1983, Gene, 23: 65-73) o mediante ligamiento de extremo romo directo (Senapathy y Carter, 1984, J. Biol. Chem., 59: 4661-4666). La transfección de dichos plásmidos recombinantes de AAV en células de mamífero con un virus auxiliar apropiado da como resultado la recuperación y escisión del genoma de AAV exento de cualquier secuencia plasmídica, la replicación del genoma recuperado y la generación de partículas de AAV infecciosas de progenie.

[0009] Pueden construirse vectores de AAV recombinantes que comprenden un polinucleótido heterólogo de interés terapéutico sustituyendo porciones de la secuencia de codificación de AAV en plásmidos bacterianos por el polinucleótido heterólogo. Los principios generales de construcción de un vector de AAVr se revisan también en otro lugar. Véanse, por ejemplo, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 3: 533-539 y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbiol. and Immunol., 158: 97-129). Las RTI de AAV se retienen generalmente, puesto que el empaquetamiento del vector requiere que estén presentes en *cis*. Sin embargo, pueden omitirse otros elementos del genoma de AAV, en particular, uno o más de los genes de empaquetamiento. El plásmido vectorial puede empaquetarse en una partícula de AAV suministrando los genes de empaquetamiento omitidos en *trans* a través de una fuente alternativa.

[0010] En un enfoque, se introducen la secuencia flanqueada por RTI de AAV (la secuencia del vector de AAVr) y los genes de empaquetamiento de AAV a proporcionar en *trans* en la célula hospedadora en plásmidos bacterianos separados. Se describen ejemplos de este enfoque en Ratschin y col., Mol. Cell. Biol. 4: 2072 (1984); Hermonat y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466 (1984); Tratschin y col., Mol. Cell. Biol. 5: 3251 (1985); McLaughlin y col., J. Virol., 62: 1963 (1988) y Lebkowski y col., 1988 Mol. Cell. Biol., 7: 349 (1988). Samulski y col. (1989, J. Virol., 63: 3822-3828) han descrito un plásmido de empaquetamiento denominado pAAV/Ad, que consiste en las regiones de codificación Rep y Cap rodeadas por RTI de adenovirus. Se han transducido células epiteliales de vías respiratorias humanas de un paciente de fibrosis quística con un vector de AAV preparado usando el plásmido de empaquetamiento pAAV/Ad y un plásmido que comprende el gen marcador selectivo neo expresado a través del promotor p5 de AAV (Flotte y col., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7: 349, 1992).

[0011] Es un segundo enfoque proporcionar la secuencia vectorial o los genes de empaquetamiento de AAV en forma de un plásmido episómico en una célula de mamífero usada para replicación de AAV. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.173.414 describe una línea celular en que la secuencia vectorial está presente como un plásmido episómico de alto número de copias. Las líneas celulares pueden transducirse con las funciones de AAV complementarias en *trans rep* y *cap*, generando preparaciones de vector de AAV. Este enfoque no es ideal, porque el número de copias por célula no puede controlarse rigurosamente y el ADN episómico es mucho más probable que experimente redistribución, conduciendo a la producción de subproductos vectoriales.

[0012] Es un tercer enfoque proporcionar la secuencia vectorial o los genes de empaquetamiento de AAV, o ambos, integrados establemente en el genoma de la célula de mamífero usada para replicación.

[0013] Se expone una técnica ejemplar en la solicitud de patente internacional WO 95/13365 (Targeted Genetics Corporation y Johns Hopkins University) y la correspondiente patente de EE.UU. n° 5.658.776 (de Flotte y col.). Este ejemplo usa una célula de mamífero con al menos una copia intacta de un vector de AAVr integrado establemente, en la que el vector comprende una RTI de AAV y un promotor de transcripción ligados operativamente con un polinucleótido diana, pero en la que la expresión de *rep* es limitante. En un caso preferido, se introduce en la célula un plásmido de empaquetamiento de AAV que comprende el gen *rep* ligado operativamente con un AAV heterólogo, y se incuba entonces la célula en condiciones que permitan la replicación y empaquetamiento de la secuencia del vector de AAV en partículas.

[0014] Se expone una segunda técnica ejemplar en la solicitud de patente WO 95/13392 (Trempe y col.). Este ejemplo usa una línea celular de mamífero estable con un gen *rep* de AAV ligado operativamente con un promotor heterólogo para poder expresar proteína Rep funcional. En diversos casos preferidos, el gen *cap* de AAV puede proporcionarse establemente también o puede introducirse transitoriamente (por ejemplo, en un plásmido). También puede introducirse un vector de AAV recombinante estable o transitoriamente.

[0015] Se expone otra técnica ejemplar en la solicitud de patente WO 96/17947 (de Targeted Genetics Corporation. J. Allen). Este ejemplo usa una célula de mamífero que comprende un gen *cap* de AAV integrado establemente y un gen *rep* de AAV integrado establemente ligados operativamente con un promotor heterólogo e inducibles por virus auxiliares. En diversos casos preferidos, se introduce también en las células un plásmido que comprende la secuencia vectorial (estable o transitoriamente). La recuperación de las partículas de vector de AAV se inicia entonces mediante la introducción del virus auxiliar.

[0016] Estos diversos ejemplos se dirigen al problema de proporcionar AAV a un título suficientemente alto, minimizando la recombinación entre vector y componentes de empaquetamiento y reduciendo o evitando las dificultades potenciales asociadas a la expresión del gen *rep* de AAV en la línea celular de mamífero (puesto que las proteínas Rep pueden no solo limitar su propia expresión sino que también pueden afectar al metabolismo celular). Sin embargo, el empaquetamiento de un vector de AAV en partículas víricas sigue apoyándose en la presencia de un virus auxiliar adecuado para AAV o la provisión de funciones de virus auxiliar. Los virus auxiliares capaces de apoyar la replicación de AAV se ejemplifican por adenovirus, pero incluyen otros virus tales como herpesvirus y poxvirus. La presencia de cantidades significativas de virus auxiliar infeccioso en una preparación de vectores de AAV es problemática porque la preparación se pretende para uso en la administración humana. Incluso la presencia de componentes de virus auxiliares no replicativos puede causar una reacción inmunológica inaceptable en el sujeto tratado.

[0017] Los problemas potenciales desencadenados por el antígeno de virus auxiliar se han ilustrado en varios estudios recientes. Bymes y col. (*Neuroscience* 66: 1015, 1995) inyectaron un adenovirus de tipo 5 humano no replicativo con delección de la región E1 en los cerebros de ratas endogámicas. Se observó una respuesta de inflamación que se atribuyó a las partículas administradas en lugar de a la expresión de nuevas proteínas víricas debido a la infección vírica de las células. La presencia del virus estaba asociada con un aumento de la expresión de MHC de clase I y una gran infiltración de macrófagos y linfocitos T. McCoy y col. (*Human Gene Therapy* 6: 1553, 1995) instilaron los pulmones de ratones con adenovirus intacto, adenovirus con genomas incompletos o adenovirus inactivados con luz ultravioleta. Todos indujeron inflamación pulmonar, y el número de células inflamatorias en el tejido pulmonar era cuantitativamente similar para las tres formas del virus. Los experimentos comparativos que usan constructos de adenovirus en ratones normales e inmunodeficientes efectuados por Barr y col. (*Gene Therapy* 2: 151, 1995) indican que la respuesta inmunitaria antiadenovírica está mediada principalmente por linfocitos T y da lugar a una respuesta de memoria que afecta a las dosis posteriores.

[0018] Por consiguiente, en el desarrollo de vectores de AAV recombinantes tales como aquellos para uso en terapia génica, existe la necesidad de estrategias que minimicen la cantidad de virus auxiliar, así como de proteínas de virus auxiliar y proteínas celulares, presentes en la preparación final, consiguiendo todavía al mismo tiempo un título alto de AAV de modo que los procedimientos puedan emplearse eficazmente a una escala que sea adecuada para la aplicación práctica de las técnicas de terapia génica.

[0019] Puesto que los títulos altos de preparaciones de vector de AAVr son particularmente útiles, pero la producción de títulos altos de AAVr, particularmente en procedimientos a gran escala, puede conducir a la generación de cantidades significativas de virus auxiliares (por ejemplo, adenovirus o "Ad"), proteínas de virus auxiliar (por ejemplo, proteínas Ad) y/o proteínas celulares contaminantes, se ha vuelto especialmente importante diseñar procedimientos escalables para la producción de AAVr que puedan usarse para la generación de preparaciones de títulos altos que estén sustancialmente exentas de virus y/o proteínas víricas o celulares contaminantes. La presente divulgación proporciona procedimientos para conseguir estos objetivos concurrentes y demuestra que dichas técnicas pueden emplearse para la producción a gran escala de preparaciones de vector de AAV recombinante.

50 Resumen de la invención

[0020] Esta divulgación proporciona procedimientos y materiales para generar preparaciones de títulos altos de virus adenoasociados (AAV) que están sustancialmente exentos de virus auxiliares, proteínas de virus auxiliares y proteínas celulares y otros componentes.

[0021] La divulgación incluye los siguientes casos, pero sin limitación:

Un procedimiento para generar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr) que comprende las etapas de: a) proporcionar una célula productora de AAV que comprende: (a) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en los que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un provector de AAV recombinante (AAVr) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal inversa (RTI) de AAV; y (iii) un virus auxiliar de AAV; b) incubar la célula productora proporcionada en la etapa a) en condiciones que sean permisivas para la replicación de AAV; c) lisar la célula productora después de la incubación de la etapa b), produciendo un lisado de célula productora de AAV y d) someter a cromatografía el lisado de célula productora de AAV de la etapa c) en una pluralidad de resinas de intercambio iónico que comprenden al menos una resina de

intercambio aniónico cargada positivamente y al menos una resina de intercambio catiónico cargada negativamente, generando una población purificada de partículas de vector de AAVr, o someter a cromatografía el lisado de célula productora de AAV de la etapa c) sobre una resina de intercambio aniónico seguido de flujo tangencial.

- 5 **[0022]** Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según el procedimiento anterior, en el que dicho virus auxiliar es un adenovirus o un virus auxiliar termosensible, y dicha etapa de incubación de la célula productora se realiza a una temperatura que es permisiva para la replicación de AAV pero no permisiva para la replicación del virus auxiliar termosensible.
- 10 **[0023]** Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr, en el que la incubación de la célula productora se realiza en un recipiente seleccionado del grupo consistente en un matraz de cultivo de tejido, un frasco giratorio, un matraz de agitación, un reactor de tipo tanque, un fermentador y un biorreactor, usando opcionalmente un microportador, y usando preferiblemente una línea celular de mamífero adaptada a la suspensión.
- 15 **[0024]** Un procedimiento de generación de una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr) que comprende las etapas de: a) proporcionar una célula productora de AAV que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en la que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un provector de AAV recombinante (AAVr) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal inversa (RTI) y
 20 (iii) un virus auxiliar de AAV o una secuencia polinucleotídica de dicho virus auxiliar que codifica al menos una función de virus auxiliar; b) someter la célula productora proporcionada en la etapa a) a un estrés subletal y c) incubar la célula productora estresada de la etapa b) en condiciones que sean permisivas para la replicación de AAV. Las posibles formas de estrés subletal pueden seleccionarse, pero sin limitación, de aquellas del grupo
 25 mecánico, estrés de radiación y estrés tóxico. Es un ejemplo no limitante de cómo se impone el estrés nutricional cultivar las células productoras en un medio que sea deficiente en uno o más aminoácidos. Se proporcionan a continuación ilustraciones adicionales.
- [0025]** Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr en el que dicha población
 30 purificada de partículas de vector de AAVr está sustancialmente exenta de AAV competentes de replicación y de virus auxiliares y proteínas celulares.
- [0026]** Un procedimiento de generación de una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr) que comprende las etapas de: a) proporcionar una célula productora de AAV que comprende:
 35 (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en la que dicho gen de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un provector de AAV recombinante (AAVr) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (RTI) y (iii) un virus auxiliar de AAV; b) incubar la célula productora proporcionada en la etapa a) en condiciones que sean permisivas para la replicación de AAV y que comprenden inducir un estrés subletal en la célula productora de AAV; c) lisar la
 40 célula productora después de la incubación de la etapa b), produciendo un lisado de célula productora de AAV y d) purificar el lisado de célula productora de AAV, generando una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr). Los procedimientos de purificación adecuados incluyen aquellos descritos en otro lugar de esta divulgación. Un procedimiento de purificación ejemplar comprende someter a cromatografía el lisado de célula productora de AAV de la etapa c) sobre al menos una resina cromatográfica seleccionada del grupo consistente en
 45 una resina de intercambio aniónico cargada positivamente y una resina de intercambio catiónico cargada negativamente, generando una población purificada de partículas de vector de AAVr (los procedimientos preferidos incluyen intercambio aniónico seguido de intercambio catiónico o filtración por flujo tangencial (FFT)). Se proporcionan a continuación a modo de ejemplo procedimientos cromatográficos ilustrativos, incluyendo cromatografía de intercambio iónico y purificación cromatográfica en sulfato de heparina.
 50
- [0027]** Una célula hospedadora para producir partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr) con alta eficacia que comprende: a) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en los que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; b) un polinucleótido heterólogo introducido en dicha célula hospedadora usando un provector de AAVr, en el que el
 55 provector de AAVr comprende el polinucleótido heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (RTI) de AAV y es deficiente en dicho gen o genes de empaquetamiento de AAV; c) un virus auxiliar tal como un virus auxiliar termosensible (VATs) de AAV, en el que dicho VATs es termosensible para autorreplicación.
- [0028]** Una población de partículas de AAVr, producida según cualquiera de los procedimientos de producción
 60 de esta divulgación. Preferiblemente, la población de partículas contiene no más de aproximadamente una partícula adenovírica infecciosa por 1000 partículas de AAVr infecciosas, preferiblemente menos de una por cada 10^6 AAVr, aún más preferiblemente menos de aproximadamente una en 10^9 .
- [0029]** Se proporcionan también técnicas de ensayo de alto rendimiento que pueden usarse, por ejemplo, en
 65 la titulación de preparaciones víricas así como en el cribado de agentes que afectan a la replicación vírica.

[0030] Basándose ahora en la divulgación contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un procedimiento de generación de una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr) que comprende las etapas de:

- 5 (a) incubar la célula productora de AAV en condiciones que sean permisivas para la replicación de AAV y que comprenden inducir un estrés subletal en la célula productora de AAV para potenciar el nivel de producción de AAV, en el que la célula productora de AAV es una célula de mamífero, y en el que dicha célula comprende:
- (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en el que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de
10 AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV;
- (ii) un provector de AAV recombinante (AAVr) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (RTI); y
- 15 (iii) un virus auxiliar de AAV,
- (b) lisar la célula productora después de la incubación de la etapa a), produciendo un lisado de célula productora de AAV, y
- 20 (c) purificar el lisado de célula productora de AAV, generando una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr),
- en el que el estrés subletal se selecciona de:
- 25 (I) un estrés nutricional impuesto por uno o más de los siguientes:
- (i) cultivar la célula productora en un medio que sea deficiente en uno o más aminoácidos, opcionalmente ácido aspártico o ácido glutámico;
- 30 (ii) cultivar la célula productora en un medio que contenga menos de 10 $\mu\text{mol/l}$ de ácido aspártico;
- (iii) cultivar la célula productora en un medio que contenga menos de 2 $\mu\text{mol/l}$ de ácido glutámico; o
- (iv) cultivar la célula productora en un medio que sea deficiente en suero; o
- 35 (II) un estrés térmico impuesto al cultivar la célula productora durante 3-6 días a:
- (i) una temperatura menor que la temperatura de crecimiento óptima de la célula productora; o
- 40 (ii) una temperatura mayor que la temperatura de crecimiento óptima de la célula productora; o
- (III) un estrés osmótico impuesto:
- (i) al cultivar la célula productora en medio hipoosmótico; o
- 45 (ii) al cultivar la célula productora en un medio hiperosmótico; o
- (IV) un estrés de pH, en el que el estrés de pH comprende someter la célula productora a un pH de aproximadamente pH 7,2 continuamente durante el cultivo; o
- 50 (V) un estrés tóxico, en el que el estrés tóxico comprende exponer la célula productora a un agente genotóxico seleccionado de un carcinógeno químico, radiación, UV, un inhibidor metabólico de la síntesis de ADN y un fármaco que afecte a las topoisomerasas.

55 **[0031]** Se exponen estas y otras realizaciones de la invención en la descripción siguiente.

Breve descripción de los dibujos

[0032]

60 La Figura 1 es una reproducción semitónica de un análisis Southern de la producción de vector de AAVr usando una sonda para un gen terapéutico CF modelo contenido en el vector. La banda destacada a 1,4 kb indica la presencia de AAVr en la preparación. La función auxiliar se suministró por un adenovirus de subtipo 5 (Ad5) o por la cepa ts149 termosensible de adenovirus.

65 La Figura 2 es una reproducción semitónica de un análisis de transferencia por ranuras para la producción de un

vector de AAVr para cuantificar el nivel de AAVr presente en cada preparación. Cuando la función auxiliar se suministra por ts149, la cantidad de AAVr producida en condiciones de cultivo estándares es varias unidades logarítmicas menor que la producida en presencia de Ad5.

5 La Figura 3 es una reproducción semitónica de un análisis Southern para AAVr, que indica que aumentar el nivel de ts149 no mejora el nivel de producción de AAVr.

La Figura 4 es una gráfica de barras que indica un drástico aumento de la cantidad de AAVr producida en presencia de ts49 (barras rayadas) si los periodos de cultivo se prolongan más allá de 5 días. Esto está en notable
10 contraposición con la sustancial reducción de AAVr que aparece más allá del día 5 cuando se usan adenovirus no termosensibles para suministrar la función auxiliar (barras negras).

La Figura 5 es una gráfica lineal que muestra la densidad celular viable (DCV) de células HeLa S3 crecidas en suspensión a 37°C (círculos) o 32°C (cuadrados).
15

La Figura 6 es una gráfica lineal que muestra el efecto de la filtración por flujo tangencial a dos velocidades diferentes en células HeLa S3 cultivadas en cultivo en suspensión.

La Figura 7 es una gráfica de barras que muestra la producción de ts149 detectada en células HeLa S3 infectadas cultivadas durante 3-7 días en suspensión a la temperatura permisiva de 32°C, en comparación con el nivel
20 detectado el día 7 después de microfluidificación (MF).

La Figura 8 es una gráfica de combinación que muestra la purificación de ts149 por cromatografía de intercambio aniónico en una matriz de PI eluida con un gradiente lineal de 900-1300 meq de NaCl a pH 8,0.
25

La Figura 9 es una gráfica de combinación que muestra la purificación de adenovirus en matriz de intercambio aniónico de PI eluida con un gradiente de 800-1300 meq de NaCl a pH 8,0. Barras: actividad vírica medida en un ensayo de infectividad; línea continua: A₂₈₀ (una medida de la proteína total); línea de puntos: conductividad del tampón (ms).
30

La Figura 10 es una gráfica de combinación que muestra la separación de adenovirus y AAV recombinante. El panel superior muestra la separación en matriz de intercambio aniónico de PI eluida con un gradiente de 0-1000 meq de NaCl a pH 8,0. El panel inferior muestra la posterior separación de adenovirus de los contaminantes en matriz de intercambio catiónico HS eluida con un gradiente de 0-500 meq de NaCl a pH 8,0.
35

La Figura 11 es dos gráficas de barras que muestran el efecto de los niveles de suero fetal bovino (FBS) en el medio de cultivo sobre la producción de AAVr. La deficiencia de suero en el medio de cultivo es uno de una serie de factores de estrés a los que las células productoras pueden someterse para potenciar la producción de partículas víricas.
40

La Figura 12 es una reproducción semitónica de un análisis de gel de poliacrilamida-SDS para proteínas de AAV durante las etapas de purificación. Se sometió la preparación de AAV a filtración por flujo tangencial después de cromatografía en una columna de intercambio aniónico (POROS 50 PI). El gel teñido con plata muestra las proteínas de cápsida de AAV altamente purificadas VP1, VP2 y VP3 en el material bruto final.
45

La Figura 13 es un cromatograma que muestra la concentración de AAV en una columna de sulfato de heparina. El pico estrecho de absorbancia a 280 nm (eje izquierdo) a aproximadamente 18 minutos de tiempo de elución representa la fracción de AAV (después de intercambio aniónico y filtración por flujo tangencial) eluida de sulfato de heparina con un gradiente lineal de NaCl 0 a 1 M (mostrada la conductividad en ms en el eje derecho).
50

Descripción detallada

[0033] Es un objeto de esta divulgación proporcionar procedimientos y materiales para generar preparaciones de títulos altos de virus adenoasociados (AAV) que estén sustancialmente exentos de virus auxiliares, proteínas de
55 virus auxiliares y proteínas celulares y otros componentes.

[0034] Se describen con detalle a continuación diversos procedimientos para la generación y procesamiento de partículas de AAV en células de mamífero, y se proporcionan ilustraciones del uso de dichas técnicas en los ejemplos siguientes. Los procedimientos de la presente invención se definen por las reivindicaciones adjuntas.
60

[0035] A modo de introducción, es típico emplear una célula hospedadora o “productora” para replicación y empaquetamiento de vector de AAVr. Dicha célula productora (habitualmente una célula hospedadora de mamífero) comprende generalmente, o está modificada para comprender, varios tipos diferentes de componentes para la producción de AAVr. El primer componente es un genoma de vector vírico adenoasociado recombinante (AAVr) (o
65 “provector de AAVr”) que puede replicarse y empaquetarse en partículas de vector por la célula de empaquetamiento hospedadora. El provector de AAVr comprenderá normalmente un polinucleótido heterólogo (o

“transgén”) con el que se desea alterar genéticamente otra célula en el contexto de terapia génica (puesto que el empaquetamiento de dicho transgén en partículas de vector de AAVr puede usarse eficazmente para suministrar el transgén a una variedad de células de mamífero). El transgén está generalmente flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (RTI) de AAV, que comprenden secuencias que se reconocen durante la escisión, replicación y empaquetamiento del vector de AAV, así como durante la integración del vector en un genoma de célula hospedadora. Es un segundo componente un virus auxiliar que puede proporcionar funciones auxiliares para la replicación de AAV. Aunque se emplean comúnmente adenovirus, pueden usarse también otros virus auxiliares como es conocido en la materia. Como alternativa, las funciones de virus auxiliar necesarias pueden aislarse genéticamente de un virus auxiliar y los genes de codificación pueden usarse para proporcionar funciones del virus auxiliar en *trans*. Los elementos del vector de AAV y el virus auxiliar (o funciones del virus auxiliar) pueden introducirse en la célula hospedadora simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Los componentes finales para la producción de AAV a proporcionar a la célula productora son “genes de empaquetamiento de AAV” tales como los genes *rep* y *cap* de AAV que proporcionan proteínas de replicación y encapsidación, respectivamente. Pueden proporcionarse varias versiones diferentes de genes de empaquetamiento de AAV (incluyendo módulos *rep-cap* de tipo silvestre así como módulos *rep* y/o *cap* modificados en que los genes *rep* y/o *cap* pueden dejarse bajo el control de los promotores nativos o ligarse operativamente con promotores heterólogos). Dichos genes de empaquetamiento de AAV pueden introducirse transitoria o establemente en la célula de empaquetamiento hospedadora, como es conocido en la materia y se describe con más detalle a continuación.

20 **[0036]** Después de cultivar las células hospedadoras en condiciones que permitan la replicación y encapsidación de AAV, las células y fracciones subcelulares pueden procesarse para generar preparaciones de títulos altos de virus adenoasociados (AAV) que están sustancialmente exentas de virus auxiliares, proteínas de virus auxiliares y proteínas celulares. Se proporcionan a continuación descripciones detalladas de técnicas de procesamiento y protocolos ilustrativos que emplean dichas técnicas.

25 **Definiciones**

[0037] Un “vector” como se usa en la presente memoria designa una macromolécula o asociación de macromoléculas que comprende o está asociada con un polinucleótido y que puede usarse para mediar el suministro del polinucleótido a una célula. Los vectores ilustrativos incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores víricos, liposomas y otros vehículos de suministro génico.

[0038] “AAV” es una abreviatura de virus adenoasociado, y puede usarse para designar el virus mismo o derivados del mismo. El término cubre todos los subtipos y tanto las formas de origen natural como recombinante, excepto cuando se requiera otra cosa. La abreviatura “AAVr” designa virus adenoasociado recombinante, designado también como vector de AAV recombinante (o “vector de AAVr”).

[0039] Un “vector de AAVr” como se usa en la presente memoria designa un vector de AAV que comprende una secuencia polinucleotídica de origen distinto de AAV (concretamente, un polinucleótido heterólogo de AAV), típicamente una secuencia de interés para la transformación genética de una célula. En los constructos de vector preferidos de esta divulgación, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, preferiblemente dos secuencias repetidas terminales invertidas (RTI) de AAV. El término vector de AAVr comprende tanto partículas de vector de AAVr como plásmidos de vector de AAVr.

45 **[0040]** Un “virus AAV” o “partícula vírica de AAV” designa una partícula vírica compuesta por al menos una proteína de cápsida de AAV (preferiblemente por todas las proteínas de cápsida de un AAV de tipo silvestre) y un polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (concretamente, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo silvestre tal como un transgén para suministrar a una célula de mamífero), se designa típicamente como “partícula de vector de AAVr” o simplemente “vector de AAVr”.

50 **[0041]** “Empaquetamiento” designa una serie de eventos intracelulares que dan como resultado el ensamblado y encapsidación de una partícula de AAV.

[0042] Los genes “*rep*” y “*cap*” de AAV designan secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas de replicación y encapsidación de virus adenoasociados. Se han encontrado en todos los serotipos de AAV examinados, y se describen a continuación y en la materia. Los genes *rep* y *cap* de AAV se designan en la presente memoria como “genes de empaquetamiento” de AAV.

[0043] Un “virus auxiliar” de AAV designa un virus que permite que AAV (por ejemplo AAV de tipo silvestre) se replique y empaquete en una célula de mamífero. Son conocidos en la materia una variedad de dichos virus auxiliares, incluyendo adenovirus, herpesvirus y poxvirus tales como Vaccinia. Los adenovirus engloban una serie de subgrupos diferentes, aunque el adenovirus de tipo 5 de subgrupo C es el usado más comúnmente. Son conocidos numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y están disponibles en depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes incluyen, por ejemplo, herpesvirus simple (HSV) y virus de Epstein-Barr (EBV), así como citomegalovirus (CMV) y virus de seudorrabia (PRV); que están también disponibles en depósitos tales como la ATCC.

[0044] El término "VATs" designa un virus auxiliar termosensible que puede proporcionar funciones auxiliares para la replicación y empaquetamiento de AAV pero que es termosensible con respecto a su propia replicación (concretamente, puede replicar a una temperatura "permissiva" pero replica con menor eficacia, o preferiblemente nada en absoluto, a una temperatura "no permissiva"). La capacidad del VATs de proporcionar ayuda a la replicación de AAV puede ser también termosensible, pero el VATs preferido para uso en la práctica de la presente divulgación que incluye la presente invención apoya eficazmente la replicación de AAV a temperaturas a las que el AAV puede replicar pero que no son permisivas para la replicación del VATs. Se describen a continuación ejemplos de dichos VATs.

[0045] Un virus o partícula vírica "infeccioso" es aquel que comprende un componente polinucleotídico que puede suministrarse a una célula para la que la especie vírica es trófica. El término no implica necesariamente ninguna capacidad de replicación del virus. Se describen en otro lugar de esta divulgación y en la materia los ensayos para contar partículas víricas infecciosas.

[0046] Un virus "competente de replicación" (por ejemplo, un AAV competente de replicación, a veces abreviado como "ACR") designa un virus de tipo fenotípicamente silvestre que es infeccioso y puede también replicarse en una célula infectada (concretamente, en presencia de un virus auxiliar o funciones de virus auxiliar). En el caso de AAV, la competencia de replicación requiere generalmente la presencia de genes de empaquetamiento de AAV funcionales. Los vectores de AAVr preferidos como se describen en la presente memoria son incompetentes de replicación en células de mamífero (especialmente en células humanas) en virtud de la falta de uno o más de los genes de empaquetamiento de AAV. Preferiblemente, dichos vectores de AAVr carecen de cualquier secuencia génica de empaquetamiento de AAV para minimizar la posibilidad de que se generen ACR mediante recombinación entre los genes de empaquetamiento de AAV y un vector de AAVr entrante. Son preparaciones de vector de AAVr preferidas como se describen en la presente memoria aquellas que contienen pocos o ningún ACR (preferiblemente, menos de aproximadamente 1 ACR por 10^2 partículas de AAVr, más preferiblemente menos de aproximadamente 1 ACR por 10^4 partículas de AAVr, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1 ACR por 10^8 partículas de AAVr, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1 ACR por 10^{12} partículas de AAVr, lo más preferiblemente ningún ACR).

[0047] El término "polinucleótido" designa una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos, y puede estar interrumpido por componentes no nucleotídicos. Si están presentes, las modificaciones de la estructura nucleotídica pueden conferirse antes o después del ensamblado del polímero. El término polinucleótido, como se usa en la presente memoria, designa intercambiamente moléculas bi- y monocatenarias. A menos que se especifique o requiera otra cosa, cada vez que la divulgación describa en la presente memoria que hay un polinucleótido, engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se conoce o predice que constituyen la forma bicatenaria.

[0048] Un "gen" designa un polinucleótido que contiene al menos un marco abierto de lectura que puede codificar una proteína particular después de transcripción y traducción.

[0049] "Recombinante", como se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligamiento y otros procedimientos que dan como resultado un constructo que es distinto de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula vírica que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen respectivamente duplicados del constructo polinucleotídico original y la progenie del constructo vírico original.

[0050] Un "elemento de control" o "secuencia de control" es una secuencia implicada en la interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, incluyendo replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar a la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso y puede ser de naturaleza potenciadora o inhibidora. Los elementos de control conocidos en la materia incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras transcripcionales tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz, en ciertas condiciones, de unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región de codificación localizada habitualmente en dirección 3' del promotor.

[0051] "Ligado operativamente" designa una yuxtaposición de elementos genéticos en la que los elementos están en una relación que les permite actuar de la manera esperada. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente con una secuencia de codificación si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia de codificación. Puede haber residuos intermedios entre el promotor y la región de codificación a condición de que se mantenga esta relación funcional.

[0052] Un "vector de expresión" es un vector que comprende una región que codifica un polipéptido de interés, y se usa para efectuar la expresión de la proteína en una célula diana pretendida. Un vector de expresión

comprende también elementos de control ligados operativamente con la región de codificación para facilitar la expresión de la proteína en la diana. La combinación de elementos de control y un gen o genes con los que están ligados operativamente para expresión se designa a veces como “módulo de expresión”, un gran número de los cuales son conocidos y están disponibles en la materia o pueden construirse fácilmente a partir de componentes que
5 están disponibles en la materia.

[0053] “Heterólogo” significa derivado de una entidad genotípicamente distinta del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, un polinucleótido introducido por técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor desprovisto de su secuencia
10 de codificación nativa y ligado operativamente con una secuencia de codificación con la que no se encuentra naturalmente ligado es un promotor heterólogo.

[0054] “Alteración genética” designa un proceso en el que se introduce un elemento genético en una célula de forma distinta a por mitosis o meiosis. El elemento puede ser heterólogo de la célula, o puede ser una copia
15 adicional o versión mejorada de un elemento ya presente en la célula. La alteración genética puede efectuarse, por ejemplo, transfectando una célula con un plásmido recombinante u otro polinucleótido mediante cualquier proceso conocido en la materia, tal como electroporación, precipitación con fosfato de calcio o puesta en contacto con un complejo de polinucleótido-liposoma. La alteración genética puede efectuarse también, por ejemplo, mediante transducción o infección con un virus o vector vírico de ADN o ARN. Preferiblemente, el elemento genético se
20 introduce en un cromosoma o minicromosoma de la célula, pero se incluye en este término cualquier alteración que cambie el fenotipo y/o genotipo de la célula y su progenie.

[0055] Se dice que una célula está alterada, transducida o transformada “establemente” con una secuencia genética si la secuencia está disponible para efectuar su función durante un cultivo prolongado de la célula *in vitro*.
25 En ejemplos preferidos, dicha célula está alterada “hereditariamente” porque se introduce una alteración genética que es también heredable por la progenie de la célula alterada.

[0056] Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan intercambiamente en la presente memoria para designar polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos engloban también un polímero
30 aminoácido que se ha modificado: por ejemplo, por formación de enlace disulfuro, glucosilación, lapidación o conjugación con un componente marcador.

[0057] Los polipéptidos tales como “CFTR”, “p53”, “E1A” y similares, cuando se examinan en el contexto de terapia génica y composiciones para la misma, designan el polipéptido intacto respectivo, o cualquier fragmento o
35 derivado modificado por ingeniería genética del mismo que retenga la función bioquímica deseada de la proteína intacta. De forma similar, las referencias a genes CFTR, p53, E1A y otros de dichos genes para uso en terapia génica (designados típicamente como “transgenes” para suministrar a una célula receptora) incluyen polinucleótidos que codifican el polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado modificado por ingeniería genética que posea la función bioquímica deseada.

[0058] Un plásmido, virus u otra sustancia “aislada” designa la preparación de la sustancia desprovista de al menos algunos de los demás componentes que pueden estar también presentes cuando la sustancia o una sustancia similar aparece naturalmente o se prepara inicialmente. Por tanto, por ejemplo, puede prepararse una sustancia aislada usando una técnica de purificación para enriquecerla desde una mezcla fuente. El enriquecimiento
45 puede medirse absolutamente, tal como en peso por volumen de disolución, o puede medirse con relación a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente. Son más preferidos los enriquecimientos crecientes de los casos de esta divulgación. Por tanto, por ejemplo, se prefiere un enriquecimiento de 2 veces, se prefiere más un enriquecimiento de 10 veces, se prefiere más un enriquecimiento de 100 veces y se prefiere incluso más un enriquecimiento de 1000 veces.

[0059] Se dice que una preparación de AAV está “sustancialmente exenta” de virus auxiliar si la relación de partículas de AAV infecciosas a partículas de virus auxiliar infeccioso es de al menos aproximadamente $10^2:1$, preferiblemente de al menos aproximadamente $10^4:1$, más preferiblemente de al menos aproximadamente $10^6:1$, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente $10^8:1$. Las preparaciones están también preferiblemente
55 exentas de cantidades equivalentes de proteínas de virus auxiliar (concretamente, proteínas como estarían presentes como resultado de dicho nivel de virus auxiliar si las impurezas de partículas de virus auxiliar observadas anteriormente estuvieran presentes en forma disgregada). Puede observarse generalmente contaminación de proteína vírica y/o celular por la presencia de bandas de tinción de Coomassie en geles de SDS (por ejemplo, la aparición de bandas distintas a las correspondientes a las proteínas de cápsida de AAV VP1, VP2 y VP3).

[0060] “Eficacia”, cuando se usa en la descripción de la producción, replicación o empaquetamiento vírico, designa propiedades útiles del procedimiento: en particular, la tasa de crecimiento y el número de partículas víricas producido por célula. Producción de “alta eficacia” indica la producción de al menos 100 partículas víricas por célula, preferiblemente de al menos aproximadamente 10.000 y más preferiblemente de al menos aproximadamente
65 100.000 partículas por célula, durante el transcurso del periodo de cultivo especificado.

[0061] Un "individuo" o "sujeto" tratado de acuerdo con esta divulgación designa vertebrados, particularmente miembros de una especie de mamífero, e incluye, pero sin limitación, animales domésticos, animales deportivos y primates, incluyendo seres humanos.

5 **[0062]** "Tratamiento" de un individuo o célula es cualquier tipo de intervención en un intento por alterar el transcurso natural del individuo o célula en el momento en que se inicia el tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento de un individuo puede emprenderse para reducir o limitar la patología causada por cualquier afección patológica incluyendo (pero sin limitación) una deficiencia genética heredada o inducida, una infección por un organismo vírico, bacteriano o parasitario, una afección neoplásica o aplásica o una disfunción del sistema inmunitario tal como
10 autoinmunidad o inmunosupresión. El tratamiento incluye (pero sin limitación) la administración de una composición, tal como una composición farmacéutica, y la administración de células compatibles que se han tratado con una composición. El tratamiento puede efectuarse profiláctica o terapéuticamente, es decir, antes o después del inicio del evento patológico o del contacto con el agente etiológico.

15 Técnicas generales

[0063] La práctica de la presente divulgación que incluye la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, virología, cultivo de células animales y bioquímica que están dentro de las habilidades de un experto en la materia. Dichas técnicas se explican detalladamente en la
20 bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel and col., eds., 1987); "Current Protocols in Protein Science" (John E Coligan, y col. eds. Wiley and Sons, 1995) y "Protein Purification: Principles and Practice" (Robert K. Scopes, Springer-Verlag, 1994).

25

Selección y preparación de vectores de AAV y genes de empaquetamiento de AAV

[0064] Un vector de AAV recombinante de esta divulgación comprende un polinucleótido heterólogo (concretamente, no de AAV) de interés en lugar de los genes *rep* y/o *cap* de AAV que constituyen normalmente el
30 grueso del genoma de AAV. Como en el genoma de AAV de tipo silvestre, sin embargo, el provector de AAVr está preferiblemente flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (RTI) de AAV como se observa anteriormente. Se han descrito también en la materia variaciones en que el constructo de AAVr está flanqueado por solo una RTI (típicamente modificada), y pueden emplearse con relación a la presente divulgación que incluye la presente invención.

35

[0065] Son adecuados virus adenoasociados de cualquier serotipo, puesto que los diversos serotipos están funcional y estructuralmente relacionados, incluso a nivel genético (véanse, por ejemplo, Blacklow, pág. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J.R Pattison, ed. (1988) y Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974). Todos los serotipos de AAV exhiben aparentemente propiedades de replicación similares mediadas por genes *rep* homólogos;
40 y generalmente todos portan tres proteínas de cápsida relacionadas tales como las expresadas en AAV2. El grado de relación se sugiere adicionalmente por el análisis de heterodúplex, que revela una extensa hibridación cruzada entre serotipos a lo largo del genoma, y la presencia de segmentos autoasociados análogos en los extremos que corresponden a RTI. El patrón de infectividad similar sugiere también que las funciones de replicación en cada serotipo están bajo un control regulador similar. Entre los diversos serotipos de AAV, el AAV2 es el más
45 comúnmente empleado.

[0066] Un vector de AAV de esta divulgación comprenderá típicamente un polinucleótido que es heterólogo del AAV. El polinucleótido es típicamente de interés debido a la capacidad de proporcionar una función a una célula diana en el contexto de terapia génica, tal como la regulación positiva o negativa de la expresión de un cierto
50 fenotipo. Dicho polinucleótido heterólogo o "transgén" será generalmente de suficiente longitud para proporcionar la función o secuencia de codificación deseada. Para encapsidación en partículas de AAV2, el transgén será preferiblemente menor de aproximadamente 5 kb, aunque pueden emplearse otros serotipos y/o modificaciones para permitir empaquetar secuencias mayores en las partículas víricas de AAV.

55 **[0067]** Cuando se desea la transcripción del polinucleótido heterólogo en la célula diana pretendida, puede ligarse operativamente con su propio promotor o uno heterólogo, dependiendo por ejemplo del nivel y/o especificidad de transcripción deseado en la célula diana, como es conocido en la materia. Son adecuados diversos tipos de promotores y potenciadores para uso en este contexto. Los promotores constitutivos proporcionan un nivel constante de transcripción génica y se prefieren cuando se desea expresar el polinucleótido terapéutico continuamente. Los
60 promotores inducibles exhiben generalmente baja actividad en ausencia del inductor, y se regulan positivamente en presencia del inductor. Pueden preferirse cuando se desea expresión solo en ciertos momentos o en ciertas localizaciones, o cuando es deseable titular el nivel de expresión usando un agente inductor. Los promotores y potenciadores pueden ser también específicos de tejido, es decir, exhiben su actividad solo en ciertos tipos celulares, presuntamente debido a elementos reguladores génicos encontrados únicamente en esas células.

65

[0068] Son ejemplos ilustrativos de promotores el promotor tardío de SV40 de virus de simio 40, el elemento

potenciador/promotor de poliedros de Baculovirus, la timidina cinasa de herpesvirus simple (tk de HSV), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y diversos promotores retrovíricos que incluyen elementos de LTR. Los promotores inducibles incluyen promotores inducibles por iones metálicos pesados (tales como el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MTVm) o diversos promotores de hormona de crecimiento) y promotores del fago T7 que son activos en presencia de ARN polimerasa T7. A modo de ilustración, los ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen diversos promotores de surfactina (para expresión en pulmón), promotores de miosina (para expresión en músculo) y promotores de albúmina (para expresión en hígado). Son conocidos y están generalmente disponibles en la materia una gran variedad de otros promotores, y están disponibles las secuencias de muchos de estos promotores en bases de datos de secuencias tales como la base de datos GenBank.

10

[0069] Cuando se desea también la traducción en la célula diana pretendida, el polinucleótido heterólogo comprenderá también preferiblemente elementos de control que faciliten la traducción (tales como un sitio de unión a ribosoma o "RBS" y una señal de poliadenilación). Por consiguiente, el polinucleótido heterólogo comprenderá generalmente al menos una región de codificación ligada operativamente con un promotor adecuado y puede comprender también, por ejemplo, un potenciador, sitio de unión a ribosoma y señal de poli-A ligados operativamente. El polinucleótido heterólogo puede comprender una región de codificación o más de una región de codificación bajo el control del mismo o diferentes promotores. La unidad completa, que contiene una combinación de elementos de control y región de codificación, se designa a menudo como módulo de expresión.

15

20 **[0070]**

El polinucleótido heterólogo se integra mediante técnicas recombinantes en o preferiblemente en lugar de la región de codificación genómica del AAV (concretamente, en lugar de los genes *rep* y *cap* de AAV), pero está generalmente flanqueado por ambos lados por regiones de repetición terminal invertida (RTI). Esto significa que aparece una RTI tanto en dirección 5' como 3' de la secuencia de codificación, en yuxtaposición directa preferiblemente (pero no necesariamente) sin secuencia intermedia de origen de AAV para reducir la probabilidad de recombinación que podría regenerar un genoma de AAV competente de replicación. Evidencias recientes sugieren que una sola RTI puede ser suficiente para llevar a cabo las funciones asociadas normalmente a configuraciones que comprenden dos RTI (documento WO 94/13788) y pueden emplearse por tanto constructos de vector con solo una RTI junto con los procedimientos de empaquetamiento y producción de la presente divulgación que incluyen los procedimientos de la presente invención.

25

30 **[0071]**

Los promotores nativos de *rep* son autorreguladores, y pueden limitar la cantidad de partículas de AAV producidas. El gen *rep* puede estar también ligado operativamente con un promotor heterólogo, si *rep* se proporciona como parte del constructo de vector, o separadamente. Es adecuado cualquier promotor heterólogo que no esté fuertemente regulado negativamente por la expresión del gen *rep*, pero se prefieren promotores inducibles porque la expresión constitutiva del gen *rep* puede tener un impacto negativo sobre la célula hospedadora. Son conocidos en la materia una gran variedad de promotores inducibles que incluyen, a modo de ilustración, promotores inducibles por iones metálicos pesados (tales como promotores de metalotioneína), promotores inducibles por hormona esteroidea (tales como promotor de MMTV o promotores de hormona de crecimiento) y promotores tales como los del fago T7, que son activos en presencia de ARN polimerasa T7. Son una subclase especialmente preferida de promotores inducibles aquellos que se inducen por el virus auxiliar que se usa para complementar la replicación y empaquetamiento del vector de AAVr. Se han descrito también una serie de promotores inducibles por virus auxiliar que incluyen el promotor del gen temprano de adenovirus que es inducible por proteínas de herpesvirus tales como VP16 o 1CP4, así como promotores inducibles por Vaccinia o poxvirus.

35

40

45 **[0072]**

Se han descrito procedimientos para identificar y ensayar promotores inducibles por virus auxiliares en la solicitud en tramitación y de propiedad común con la presente publicada como WO96/17947 por Targeted Genetics Corporation (Allen y col.). Por tanto, se conocen procedimientos en la materia para determinar si los promotores candidatos son inducibles por virus auxiliares o no y si serán útiles o no en la generación de células de empaquetamiento de alta eficacia. Brevemente, uno de dichos procedimientos implica reemplazar el promotor p5 del gen *rep* de AAV por el supuesto promotor inducible por virus auxiliar (conocido en la materia o identificado usando técnicas bien conocidas tales como ligamiento con genes "informadores" sin promotor). Los genes *rep-cap* de AAV (con p5 reemplazado) ligados preferiblemente con un marcador seleccionable positivo tal como un gen de resistencia a antibiótico, se integran entonces establemente en una célula hospedadora adecuada (tal como las células HeLa o A549 ejemplificadas a continuación). Se ensaya entonces en las células que son capaces de crecer relativamente bien en condiciones de selección (por ejemplo, en presencia de antibiótico) su capacidad de expresar los genes *rep* y *cap* tras la adición de un virus auxiliar. Como ensayo inicial para la expresión de *rep* y/o *cap*, las células pueden cribarse fácilmente usando inmunofluorescencia para detectar las proteínas Rep y/o Cap. La confirmación de las capacidades y eficacias de empaquetamiento puede determinarse entonces mediante ensayos funcionales de la replicación y empaquetamiento de vectores de AAVr entrantes. Usando esta metodología, se ha identificado un promotor inducible por virus auxiliar derivado del gen de metalotioneína de ratón como un reemplazo adecuado para el promotor p5, y se ha usado para producir títulos altos de partículas de AAVr (como se describe en el documento WO 96/17947 de Targeted Genetics Corporation).

50

55

60

[0073] Dados los límites de tamaño de encapsidación relativos de los diversos genomas de AAV, la inserción de un polinucleótido heterólogo grande en el genoma requiere la eliminación de una porción de la secuencia de AAV. La eliminación de una o más genes de AAV es en cualquier caso deseable para reducir la probabilidad de

65

generar AAV competentes de replicación (“ACR”). Por consiguiente, se eliminan preferiblemente secuencias de codificación o promotoras de *rep*, *cap* o ambas, puesto que las funciones proporcionadas por estos genes pueden proporcionarse en *trans*.

5 **[0074]** El vector resultante se designa que es “defectivo” de estas funciones. Para replicar y empaquetar el vector, se complementan las funciones faltantes con un gen de empaquetamiento, o una pluralidad de los mismos, que codifican en conjunto las funciones necesarias para los diversos productos génicos *rep* y/o *cap* faltantes. Los genes o módulos génicos de empaquetamiento no están preferiblemente flanqueados por RTI de AAV, y preferiblemente no comparten ninguna homología sustancial con el genoma de AAVr. Por tanto, para minimizar la
10 recombinación homóloga durante la replicación entre la secuencia de vector y los genes de empaquetamiento proporcionados separadamente, es deseable evitar la superposición de las dos secuencias polinucleotídicas. El nivel de homología y la correspondiente frecuencia de recombinación aumentan al aumentar la longitud de las secuencias homólogas y con su nivel de identidad compartida. El nivel de homología que planteará un problema en un sistema dado puede determinarse teóricamente y confirmarse experimentalmente, como es conocido en la materia. Sin
15 embargo, típicamente la recombinación puede reducirse sustancialmente o eliminarse si la secuencia superpuesta es menor que una secuencia de aproximadamente 25 nucleótidos si es al menos un 80% idéntica en toda su longitud, o menor que una secuencia de aproximadamente 50 nucleótidos si es al menos un 70% idéntica en toda su longitud. Por supuesto, son preferibles niveles aún menores de homología, puesto que reducirán adicionalmente la probabilidad de recombinación. Parece que, incluso sin homología de superposición, hay algo de frecuencia residual
20 de generación de ACR. Pueden obtenerse reducciones aún mayores en la frecuencia de generación de ACR (por ejemplo, mediante recombinación no homóloga) “separando” las funciones de replicación y encapsidación de AAV, como se describe por Allen y col. en la solicitud de patente U.S. 08/769.728, presentada el 18 de diciembre de 1996, publicada internacionalmente como WO98/27204 el 25 de junio de 1998 (Targeted Genetics Corporation)).

25 **[0075]** El constructo de vector de AAVr, y los constructos génicos de empaquetamiento complementarios, pueden ponerse en práctica al practicar la presente divulgación que incluye la invención de una serie de formas diferentes. Pueden usarse partículas víricas, plásmidos y células hospedadoras transformadas establemente para introducir dichos constructos en la célula de empaquetamiento, transitoria o establemente.

30 **[0076]** En ciertos casos de esta divulgación, por ejemplo en ciertas realizaciones de esta invención, el vector de AAV y el gen o genes de empaquetamiento complementarios, si los hubiera, se proporcionan en forma de plásmidos bacterianos, partículas de AAV o cualquier combinación de los mismos. En otros casos y realizaciones, se proporcionan la secuencia de vector de AAV, el gen o genes de empaquetamiento o ambos en forma de células eucarióticas alteradas genéticamente (preferiblemente, alteradas hereditariamente). El desarrollo de células
35 hospedadoras alteradas hereditariamente para expresar la secuencia de vector de AAV, los genes de empaquetamiento de AAV o ambos, proporciona una fuente establecida de material que se expresa a un nivel fiable.

[0077] Puede usarse por tanto una variedad de diferentes células alteradas genéticamente en el contexto de esta divulgación que incluye la invención. A modo de ilustración, puede usarse una célula hospedadora de mamífero
40 con al menos una copia intacta de un vector de AAVr integrada establemente. Puede usarse un plásmido de empaquetamiento de AAV que comprende al menos un gen *rep* de AAV ligado operativamente con un promotor para suministrar funciones de replicación (como se describe en la solicitud de propiedad común con la presente de Flotte y col., ahora patente de EE.UU. 5.658.776). Como alternativa, puede usarse una línea celular de mamífero estable con un gen *rep* de AAV ligado operativamente con un promotor para suministrar funciones de replicación (véanse,
45 por ejemplo, Trempe y col., (documentos USSN 08/362.608, de 9 de enero de 1995 y WO95/13392, de 18 de mayo de 1995); Burstein y col., (documentos USSN 08/770.122, presentado el 18 de diciembre de 1996 y WO98/23018, de 25 de junio de 1998) y Johnson y col., (documentos USSN 08/254.358, presentado el 6 de junio de 1994, expedido como U.S. n° 5.656.785 el 19 de agosto de 1997)). El gen *cap* de AAV, que proporciona las proteínas de encapsidación como se describe anteriormente, puede proporcionarse conjuntamente con un gen *rep* de AAV o
50 separadamente (véanse, por ejemplo, las solicitudes y patentes referidas anteriormente así como Allen y col., documento USSN 08/769.728, presentada el 18 de diciembre de 1996 y WO98/27204 el 25 de junio de 1998 (Targeted Genetics Corporation)). Son posibles otras combinaciones y se incluyen dentro del alcance de esta divulgación que incluye la invención.

55 **Introducción de material genético en células**

[0078] Como se describe en la técnica, y se ilustra tanto en la presente memoria como en las referencias citadas anteriormente, el material genético puede introducirse en células (tales como células “productoras” de mamífero para la producción de AAV) usando cualquiera de una variedad de medios para transformar o transducir
60 dichas células. A modo de ilustración, dichas técnicas incluyen, por ejemplo, transfección con plásmidos bacterianos, infección con vectores víricos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio e introducción usando cualquiera de una variedad de composiciones basadas en lípidos (un proceso a menudo designado como “lipofección”). Los procedimientos y composiciones para efectuar estas técnicas se han descrito en la técnica y están ampliamente disponibles.

65 **[0079]** La selección de células alteradas adecuadamente puede realizarse mediante cualquier técnica de la

materia. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas usadas para alterar la célula pueden introducirse simultáneamente a o ligarse operativamente con uno o más marcadores detectables o seleccionables como es conocido en la materia. A modo de ilustración, puede emplearse un gen de resistencia a fármaco como marcador. Las células resistentes a fármaco pueden elegirse entonces, crecer y ensayarse la expresión de la secuencia deseada, concretamente un producto del gen de empaquetamiento o un producto del polinucleótido heterólogo, según sea apropiado. El ensayo de adquisición, localización y/o mantenimiento de un polinucleótido introducido puede efectuarse usando técnicas basadas en hibridación con ADN (tales como transferencia Southern y otros procedimientos como son conocidos en la materia). El ensayo para expresión puede efectuarse fácilmente mediante análisis Northern del ARN extraído de células alteradas genéticamente, o mediante inmunofluorescencia indirecta por el correspondiente producto génico. Puede obtenerse el ensayo y confirmación de las capacidades y eficacias de empaquetamiento introduciendo en la célula los componentes funcionales restantes de AAV y un virus auxiliar, para ensayar la producción de partículas de AAV. Cuando se altera hereditariamente una célula con una pluralidad de constructos polinucleotídicos, es generalmente más conveniente (aunque no esencial) introducirlos en la célula separadamente, y validar cada etapa en serie. Las referencias que describen dichas técnicas incluyen aquellas citadas en la presente memoria.

Selección y preparación de virus auxiliares

[0080] Como se examina anteriormente, el AAV es un parvovirus que es defectivo de autorreplicación, y debe basarse generalmente en un virus auxiliar para suministrar ciertas funciones replicativas. Se han identificado una serie de dichos virus auxiliares, incluyendo adenovirus, herpesvirus (incluyendo pero sin limitación HSV1, citomegalovirus y HHV-6) y poxvirus (particularmente Vaccinia). Puede usarse cualquiera de dichos virus cuando se practica esta divulgación que incluye la invención.

[0081] Frecuentemente, el virus auxiliar será un adenovirus de un tipo y subgrupo que pueda infectar a la célula hospedadora pretendida. Se usan comúnmente adenovirus humanos del subgrupo C, particularmente los serotipos 1, 2, 4, 6 y 7. Se prefiere generalmente el serotipo 5.

[0082] Los rasgos y patrones de crecimiento de los adenovirus son conocidos en la materia. El lector puede remitirse, por ejemplo, a Horowitz, "Adenoviridae and their replication", pág. 771-816 en "Fundamental Virology", Fields y col., eds. El genoma adenovírico empaquetado es una molécula de ADN lineal ligada a través de RTI adenovíricas a los extremos izquierdo y derecho a través de un complejo proteico terminal, formando un círculo. Las regiones de control y codificación para componentes tempranos, intermedios y tardíos se superponen en el genoma. Los genes de la región temprana están implicados en la replicación del genoma adenovírico, y se agrupan dependiendo de su localización en las regiones E1, E2, E3 y E4.

[0083] Aunque no es esencial, en principio es deseable que la cepa del virus auxiliar sea defectiva de replicación en el sujeto que recibe en última instancia la terapia génica. Por tanto, cualquier virus auxiliar residual presente en una preparación de AAVr será incompetente de replicación. Los adenovirus de los que se ha eliminado la región E1A, o tanto E1A como E3, no son infecciosos para la mayoría de células humanas. Pueden replicarse en una línea celular permisiva (por ejemplo, la línea celular 293 humana) que sea capaz de complementar la actividad faltante. Se han identificado y descrito en la materia regiones de adenovirus que parecen estar asociadas con la función auxiliar, así como regiones que no (véanse, por ejemplo, P. Colosi y col., documento WO97/17458 y las referencias citadas en el mismo).

Uso de virus auxiliar condicionalmente sensible

[0084] Como se describe en la presente memoria, puede emplearse un virus auxiliar "condicionalmente sensible" para proporcionar actividad de virus auxiliar. Dicha cepa de virus auxiliar debe tener como mínimo la propiedad de poder apoyar la replicación de AAV en una célula hospedadora bajo al menos un grupo de condiciones en que el mismo no experimente una replicación genómica eficaz. Cuando se suministra la actividad de virus auxiliar como partículas de virus intactas, es también generalmente necesario que el virus sea capaz de replicación en una célula hospedadora bajo un segundo grupo de condiciones. El primer grupo de condiciones diferirá del segundo grupo de condiciones en un rasgo fácilmente controlable, tal como la presencia o ausencia de un cofactor necesario (tal como un catión), la presencia o ausencia de un fármaco inhibidor o un desplazamiento de las condiciones ambientales tales como temperatura. Lo más convenientemente, la diferencia entre las dos condiciones es la temperatura, y dicho virus condicionalmente sensible se designa por tanto como virus auxiliar termosensible (VATs).

[0085] Con los fines de esta divulgación, un virus auxiliar "termosensible" o "ts" es aquel que es capaz de replicar su material genético en una célula eucariótica en un cierto intervalo de temperatura (el intervalo de temperatura "permisiva"), típicamente de aproximadamente 15-35°C y preferiblemente de aproximadamente 20-32°C. Sin embargo, a la temperatura "no permisiva", incluso cuando las demás condiciones se mantengan igual, la velocidad de replicación del material genético es sustancialmente menor, al menos 10 veces menor, habitualmente al menos aproximadamente 100 veces menor y preferiblemente al menos aproximadamente 1000 veces menor. Esta temperatura es típicamente de aproximadamente 35-50°C, generalmente de aproximadamente 42°C. En un ejemplo típico de dicho virus auxiliar ts, el virus es capaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente bajas, tales

como temperaturas de aproximadamente 20-32°C, pero es incapaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente altas tales como temperaturas de aproximadamente 37-42°C. Se entiende que la célula infectada con virus puede exhibir no obstante algunos procesos metabólicos atribuibles al virus a la temperatura no permisiva, incluyendo pero sin limitación la función auxiliar para producción de AAV.

5

[0086] Puede producirse un virus auxiliar termosensible en cantidades grandes cultivando las células infectadas a una temperatura permisiva. El vector de AAV puede producirse entonces cultivando células que comprenden elementos de vector y el virus auxiliar termosensible a una temperatura no permisiva. La preparación de vector estará sustancialmente exenta de componentes de virus auxiliar.

10

[0087] Se han descrito en la materia una gran cantidad de variantes de adenovirus termosensibles; véanse, por ejemplo, las variantes descritas por Ensinger y col. (J. Virol. 10: 328, 1972); Williams y col. (J. Gen. Virol. 11: 95, 1971); Ishibashi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65: 304, 1970); Lundholm y col. (Virology 45: 827, 1971) y Shiroki y col., (Virology 61: 474, 1974) entre otras. El análisis de complementación indica que dichas variantes entran dentro de una pluralidad de diferentes grupos de complementación (Ginsberg y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34: 419, 1974). Esto sugiere que una serie de etapas en el ciclo replicativo de adenovirus pueden volverse termosensibles.

15

[0088] Puesto que la función auxiliar para la replicación de AAV requiere que solo esté intacto parte del ciclo de adenovirus, el ensayo de la función auxiliar de diversos mutantes a la temperatura no permisiva proporciona un medio para cartografiar la función auxiliar. Por ejemplo, Ishibashi y col. (Virology 45: 317, 1971) reseñaron que las variantes de adenovirus aviar termosensibles apoyan la replicación de AAV1 y AAV2. Ito y col. reseñaron que el mutante ts13 termosensible de adenovirus humano 7 (Ad7ts13) ayuda a la replicación del AAV a la temperatura no permisiva tan eficazmente como la cepa silvestre. Drake y col. (Virology 60: 230, 1974) reseñaron la complementación de la síntesis del antígeno de AAV4 por 3 grupos de mutantes termosensibles de herpesvirus simple de tipo 1 (HSV1). Handa y col. (J. Gen. Virol. 29: 239, 1975) reseñaron actividades auxiliares para la producción del virus AAV1 por los mutantes de adenovirus humanos Ad5ts36, Ad5ts125, Ad5ts149, Ad12tsA275, Ad12tsB221 y Ad12tsC295. Ostrove y col. (Virology 104: 502, 1980) reseñaron que los mutantes termosensibles Ad5ts125, Ad5ts135, Ad5ts157, Ad5ts116, y Ad5ts142 y los mutantes del intervalo hospedador hr6, pero no hr3, apoyaban la replicación de AAV. Mayor y col. (J. Gen. Virol. 35: 545, 1977) reseñaron que Ad31ts13, pero no Ad31ts94, apoyaba la producción de AAV1 a la temperatura no permisiva.

20

25

30

[0089] Straus y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 742, 1976) reseñaron que Ad5ts125 apoyaba la replicación de AAV2 en condiciones en que el adenovirus no replicaba por sí mismo. Usaron esta propiedad para estudiar los intermedios de ADN formados durante la replicación de AAV. Myers y col. (J. Virol. 35: 65, 1980) efectuaron un estudio cuantitativo sobre la función auxiliar y mostraron que Ad5ts149 apoyaba la producción de 20.000 partículas de AAV infecciosas por célula a la temperatura no permisiva, mientras que Ad5ts107 producía solo ~100 partículas por célula. Puesto que Ad5ts107 tiene una mutación en la región de codificación de la proteína de unión a ADN de 72 kDa, concluyeron que esta proteína desempeñaba un papel en la expresión de ARN de AAV. Más recientemente, Carter y col. (Virology 191: 473; 1992) propusieron que es necesaria una proteína de 72 kDa totalmente funcional para la expresión postranscripcional cuantitativa de los genes *rep* y *cap* de AAV.

35

40

[0090] Como se expone en la sección de antecedentes, la existencia de adenovirus termosensibles es conocida hace bastante tiempo. Sin embargo, no ha habido enseñanzas ni sugerencias eficaces respecto al uso real de virus auxiliares condicionales en la generación de vectores de AAV recombinante, tales como aquellos que podrían usarse para terapia génica.

45

[0091] Parte de la explicación puede ser por la dificultad en obtener títulos funcionales de AAV cuando se usan vectores recombinantes. Entre otras cosas, las proteínas Rep de AAV aparentemente regulan negativamente su propia expresión a través del promotor p5 (Tratschin y col., Mol. Cell Biol. 6: 2884, 1986). Además, se ha observado que la expresión del gen *rep* en líneas celulares de empaquetamiento tales como aquellas que podrían usarse para la producción de vector de AAV recombinante tiende a inhibir el crecimiento y/o metabolismo de la célula (véase, por ejemplo, Targeted Genetics Corporation. WO96/17947 de Allen y col.).

50

[0092] Las diferencias entre la generación de vectores de AAV de tipo silvestre y AAV recombinante tienden a ser bastante drásticas cuando se consideran en términos de producción. En particular, se ha observado que la producción de vectores de AAV recombinante tiende a ser sustancialmente menor que la producción de partículas de AAV de tipo silvestre, y que la presencia o generación de cantidades incluso pequeñas de AAV de tipo silvestre contaminante tienden a dar como resultado una producción preferida de virus de tipo silvestre que puede superar eventualmente los vectores de AAV recombinantes.

55

60

[0093] Estos fenómenos se ilustran adicionalmente por los resultados descritos en los Ejemplos 1 y 2 de esta divulgación y en la Figura 1. El mutante de adenovirus termosensible ts149 se reseña en otro lugar que apoya la replicación de partículas de AAV (Myers y col. J. Virol. 35: 65, 1980). Sin embargo, el Ejemplo 2 muestra que cuando se usa este mutante para apoyar la producción de un vector de AAV con un promotor heterólogo en condiciones estándar, el nivel de producción es varios órdenes de magnitud menor que el apoyado por adenovirus de tipo

65

silvestre.

[0094] Esta divulgación muestra que los virus auxiliares termosensibles pueden usarse de hecho para preparar vectores de AAV recombinante a títulos funcionales, superando los obstáculos de producción aparentes.

5 Las descripciones siguientes ilustran cómo seleccionar un virus auxiliar termosensible y optimizar las condiciones para proporcionar suficiente AAV con fines de terapia génica.

[0095] En particular, se muestra que alargar el periodo de replicación de AAV cuando se usa tsAd como auxiliar aumenta drásticamente la cantidad de vector de AAV que se produce (Ejemplo 3). Esto es antiintuitivo, porque alargar el periodo de replicación cuando se usa Ad de tipo silvestre reduce del mismo modo la cantidad de vector de AAV en al menos un orden de magnitud. Un profesional de la materia que busque optimizar las condiciones para la producción de AAV iría lógicamente a tiempos de cultivo más cortos y mayores concentraciones de virus auxiliar; se muestra en la presente memoria que ambos son ineficaces.

15 **[0096]** Esta divulgación proporciona adicionalmente procedimientos de cultivo y separación mejorados para preparar cantidades cuantitativas de adenovirus termosensibles. Aunque no se requiere estrictamente para la práctica de ciertos casos de esta divulgación, por ejemplo para la práctica de ciertas realizaciones de esta invención, las preparaciones de adenovirus termosensibles obtenidas mediante estos procedimientos son particularmente adecuadas para la producción de AAV, entre otras cosas, con fines de terapia génica.

20 **[0097]** Las variantes sensibles a las condiciones de la cepa seleccionada de virus auxiliar pueden generarse mediante una estrategia de mutagenización y selección apropiada. Por ejemplo, el virus puede mutagenizarse con nitrosoguanidina, ácido nitroso, hidroxilamina o 5-bromo-2-desoxiuridina. Se seleccionan candidatos que puedan multiplicarse en una célula eucariótica adecuada en las condiciones permisivas deseadas, pero no en las condiciones no permisivas deseadas. Como ilustración, pueden obtenerse mutantes de adenovirus termosensibles que se multiplican, por ejemplo, a 32°C pero no a 39,5°C. Las relaciones de eficacia de siembra en placa a 39,5°C frente a 32°C son preferiblemente menores de 10^{-4} y más preferiblemente menores de 10^{-5} . Puede encontrarse una ilustración adicional de procesos de selección adecuados para adenovirus termosensibles, por ejemplo, en Ensinger y col., *J. Virol.* 10: 328, 1972 y Williams y col., *J. Gen Virol.* 11: 95, 1971. Puede encontrarse la descripción de variantes de adenovirus que no son termosensibles sino sensibles al tipo de hospedador en Harrison y col., *Virology* 77: 319, 1977. Pueden prepararse mutantes termosensibles eficaces para uso en la práctica de esta divulgación que incluye la invención, por ejemplo, a partir de virus auxiliares alternativos como herpes simple 1 (HSV1) o herpes simple 2 (HSV2). Véanse, por ejemplo, Schaffer y col., *Virology* 52: 57, 1973 para HSV1; Esparza y col., *Virology* 57: 554, 1974 para HSV2. Como se indica en la sección de antecedentes, se han descrito un gran número de virus auxiliares sensibles a las condiciones, y pueden obtenerse de los científicos que los desarrollaron o describieron o de un depósito público.

[0098] No todas las variantes sensibles a las condiciones de los virus anteriormente enumerados funcionarán con la presente invención. En particular, la cepa debe volverse sensible a la condición en una etapa de su ciclo replicativo tal que la función que se bloquee en condiciones no permisivas no sea una necesaria para la replicación con alta eficacia de AAV. La elección de cuál cepa de virus auxiliar usar puede realizarse con referencia a la biología conocida del virus auxiliar y a los requisitos replicativos del AAV.

[0099] Es un virus auxiliar ejemplar para uso en la práctica de la presente divulgación que incluye la presente invención el adenovirus ts149 termosensible de serotipo Ad5 (Ad5ts149). Como se muestra en la sección de ejemplos, en condiciones optimizadas esta cepa puede usarse para producir AAVr a niveles que igualan o superan los apoyados por Ad5 de tipo silvestre. El ts149 tiene una sola transición de C-G a A-T en posición 7563 (Roovers y col., *Virus Genes* 4: 53, 1990). Esto da como resultado un cambio del aminoácido leucina en el residuo 411 de la ADN polimerasa a fenilalanina. La ADN polimerasa está contenida en la unidad de transcripción E2 del adenovirus. Sin embargo, otros mutantes de ts que se cartografiaban en esta región son menos adecuados. En particular, la unidad de transcripción E2 comprende también la región de codificación de la proteína de unión a ADN de 72 kDa (DBP). Una cepa que no produce DBP no detectable (Add/802) apoya la replicación de AAV, pero a un nivel que está reducido en un orden de magnitud (Carter y col., *Virology* 191: 473, 1992). Adts125, que comprende también una mutación que se cartografía en la región que codifica DBP, apoya la replicación de AAV (Straus y col., *J. Virol.* 17: 140, 1976), aunque los niveles son generalmente mucho menores que con Ad5 de tipo silvestre (Myers y col., *J. Virol.* 35: 65, 1980). Por consiguiente, los vectores de adenovirus termosensibles adecuados para uso en la práctica de la presente divulgación que incluye la presente invención incluyen aquellos para los que la sensibilidad se cartografía en la región E2A del genoma, preferiblemente en la región que codifica ADN polimerasa.

60 **[0100]** El experto puede determinar fácilmente cuáles cepas víricas son adecuadas para uso como virus auxiliar al realizar un ensayo de replicación de AAVr usando un panel de cepas de virus auxiliar candidatas en una célula candidata en condiciones que sean no permisivas para la autorreplicación del auxiliar. Para variantes termosensibles, se realiza el cribado a la temperatura no permisiva según las propiedades conocidas de la cepa. Las temperaturas no permisivas son generalmente mayores que las temperaturas permisivas, típicamente de aproximadamente 35-50°C, preferiblemente de 38-45°C, más preferiblemente de aproximadamente 39,5°C. Se prefieren las variantes que apoyan la replicación de AAV a un nivel que está dentro de un orden de magnitud del

apoyado por el correspondiente virus de tipo silvestre. Al realizar el cribado, el experto deberá incorporar las demás enseñanzas de esta divulgación. En particular, el cribado por cultivo durante tiempos que procuran una replicación de AAV máxima con virus de tipo silvestre es insuficiente. Debe establecerse una matriz cinética en que se usan los virus auxiliares candidatos durante periodos más largos y compararse entonces con el virus de tipo silvestre en el momento de recolección máxima. Se proporciona una ilustración más detallada de este análisis en el Ejemplo 3 de esta divulgación.

[0101] Una vez se ha seleccionado una cepa de virus auxiliar adecuada, puede aplicarse en esta invención en una serie de formas diferentes. Pueden usarse partículas víricas, plásmidos víricos y células hospedadoras transformadas establemente.

[0102] En una realización, se introduce el genoma del virus auxiliar (o de forma mínima, las regiones del genoma del virus auxiliar que codifican la función auxiliar) en la célula hospedadora a usar para replicación del vector de AAVr en forma de un plásmido de ADN o una pluralidad de plásmidos que proporcionan funciones complementarias. Los procedimientos para la manipulación experimental de adenovirus son conocidos en la materia. El lector se remite a Graham y col., "Manipulation of adenovirus vectors" en: Murray EJ, ed. "Methods in molecular biology: Gene transfer and expression protocols", vol 7. Clifton, NJ: The Human Press, 1991:109-128, que proporciona protocolos detallados para la propagación, titulación y purificación de adenovirus, la contransfección y recombinación *in vivo*. Los plásmidos adenovíricos están disponibles comercialmente en Microbix Biosystems Inc., Toronto, Canadá.

[0103] En otra realización, se transfecta establemente la célula hospedadora con genes adenovíricos, o se altera genéticamente para proporcionar las funciones necesarias para replicación de AAVr. Como alternativa, la célula hospedadora puede alterarse genéticamente con solo una porción del genoma adenovírico, y se infecta o transfecta posteriormente con una partícula o plásmido adenovírico. Las solicitudes de patente WO 95/27071 y WO 95/34671 describen células hospedadoras alteradas hereditariamente para proporcionar una función adenovírica que complementa la propiedad replicativa de diversos constructos adenovíricos defectivos.

[0104] En aún otra realización, se infecta la célula hospedadora usada para replicación de AAV con un virus auxiliar que es capaz de autorreplicación, pero no en condiciones no permisivas. Puede usarse cualquier preparación de la cepa necesaria que proporcione una MOI suficiente. Para satisfacer las BPF y otros requisitos regulatorios, y para facilitar el aumento de escala con fines comerciales, las preparaciones de virus auxiliar comprenden preferiblemente una alta densidad de partículas infecciosas y están sustancialmente exentas de desechos celulares y otros contaminantes. Las propiedades deseables incluyen las siguientes:

- Una densidad de al menos 10^6 , preferiblemente de al menos aproximadamente 10^8 , más preferiblemente de al menos aproximadamente 10^{10} UI/ml, determinada en un ensayo de TCID₅₀.
- Una relación de ADN adenovírico a proteína total o hexon adenovírico que indica que al menos un 10%, preferiblemente al menos aproximadamente un 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% de las partículas víricas contienen ADN adenovírico.
- Menos de un 20%, preferiblemente menos de aproximadamente un 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente un 1% de contaminación por material no adenovírico a nivel de proteína o ADN, detectado por geles de SDS teñidos por proteína o geles de agarosa de digestiones con nucleasa de restricción teñidos con bromuro de etidio.
- Un total de al menos 10^9 , preferiblemente al menos aproximadamente 10^{11} , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{13} UI por lote de producción.

[0105] Puede prepararse virus auxiliar en cualquier célula que sea permisiva de replicación vírica. Para adenovirus, las células preferidas incluyen células 293 y células HeLa. Tradicionalmente, cuando estas células se han usado para replicación de adenovirus, se han usado en cultivos en placa. Sin embargo, como se muestra en el Ejemplo 4, estos procedimientos apoyan generalmente la replicación de adenovirus termosensibles a niveles que son una o dos unidades logarítmicas menores que para adenovirus de tipo silvestre.

[0106] Por consiguiente, es preferible emplear técnicas de cultivo que permitan un aumento de la densidad de siembra. Están disponibles células 293 y variantes de células HeLa que se han adaptado al cultivo en suspensión. HeLa es preferible por razones de crecimiento celular, viabilidad y morfología en suspensión. Como se muestra en el Ejemplo 5, estas células pueden crecer a suficiente densidad (2×10^6 por ml) para compensar la menor tasa de replicación de la cepa de adenovirus termosensible. Una vez establecidas, se infectan las células con el virus y se cultivan a la temperatura permisiva durante un periodo suficiente, generalmente de 3-7 días y típicamente de aproximadamente 5 días.

[0107] La filtración por flujo tangencial es una técnica usada en la materia para procesar grandes volúmenes de células de mamífero con el fin de perfundirlas, concentrarlas y recolectarlas. Véanse, por ejemplo, Dorin y col.,

Biotechnol. Prog. 6: 494, 1990; Maiorella y col., Biotechnol. Bioeng. 37: 121, 1991. Se recomienda usar esta técnica con cultivos en suspensión para la preparación de virus auxiliar para uso en la práctica de la presente divulgación que incluye la presente invención. El Ejemplo 5 demuestra que las células HeLa soportan fuerzas de cizalladura de 750-1500 s^{-1} , permitiendo la concentración de las células y la diafiltración de los medios agotados.

5

[0108] Se recolecta el virus del cultivo desde los medios agotados o mediante microfluidificación de las células. El nivel de virus auxiliar producido en el cultivo es típicamente de al menos 10^7 UI/ml, y preferiblemente de al menos aproximadamente 3×10^7 UI/ml.

- 10 **[0109]** El virus auxiliar preparado según la descripción anterior puede usarse directamente para infectar células hospedadoras usadas para replicación de AAVr. Más habitualmente, el virus se aísla y concentra antes del uso. Los procedimientos actuales para purificar y concentrar virus auxiliares implican típicamente gradientes isopícnicos de CsCl. Este procedimiento consume tiempo y trabajo, requiere numerosas etapas de procesamiento abierto y es difícil de aumentar de escala. En lugar de ello, se recomienda la purificación por cromatografía. El lector se remite en general a Prior y col., Pharmaceut. Technol. 19: 30, 1995 y Huyghe y col., Human Gene Therapy 6: 1403, 1995. Se prefiere particularmente para el aislamiento de cepas termosensibles de adenovirus la cromatografía de intercambio aniónico, especialmente en una resina de polietilenimina usando un gradiente continuo de NaCl a pH 7,4. Se proporciona en el Ejemplo 6 una ilustración detallada del procedimiento de separación con polietilenimina.

20 **Provisión de una célula hospedadora que comprende virus auxiliar y AAV**

- [0110]** Varios criterios influyen en la selección de las células para uso en la producción de partículas de AAVr como se describen en la presente memoria. Como cuestión inicial, la célula debe ser permisiva de replicación y empaquetamiento del vector de AAVr cuando se usa el virus auxiliar seleccionado. Sin embargo, puesto que la mayoría de células de mamífero pueden infectarse productivamente por AAV, y muchas pueden infectarse también por virus auxiliares tales como adenovirus, resulta evidente que una gran variedad de células de mamífero y líneas celulares satisfacen eficazmente estos criterios. Entre estas, las células y líneas celulares más preferidas son aquellas que pueden crecer fácilmente en cultivo para facilitar la producción de gran escala de preparaciones de vector de AAV recombinante. Sin embargo, de nuevo muchas de dichas células satisfacen eficazmente este criterio. Cuando se desea una producción a gran escala, la elección del procedimiento de producción influirá también en la selección de la célula hospedadora. Por ejemplo, como se describe con más detalle a continuación y en la materia, algunas técnicas de producción y recipientes o cámaras de cultivo están diseñados para el crecimiento de células adherentes o unidas, mientras que otros están diseñados para el crecimiento de células en suspensión. En el último caso, la célula hospedadora sería por tanto preferiblemente adaptada o adaptable al crecimiento en suspensión. Sin embargo, incluso en el caso de células y líneas celulares que se consideran adherentes o dependientes del anclaje, es posible (como se describe a continuación) derivar variantes adaptadas a la suspensión de una línea parental dependiente del anclaje mediante la selección en serie de células capaces de crecimiento en suspensión.

- [0111]** Cuando se usa un virus auxiliar termosensible, la célula debe ser capaz de replicar eficazmente el vector de AAVr en condiciones que sean no permisivas de replicación del virus auxiliar. A modo de ilustración, cuando se usa el adenovirus ts149 como virus auxiliar ts (como se describe e ilustra a continuación), la célula debe ser capaz de apoyar la replicación y empaquetamiento de AAVr a temperaturas bien por encima de 32°C, preferiblemente de aproximadamente 39,5°C. Las células 293 humanas son un ejemplo de línea celular que satisface estos criterios, pero numerosas otras células y líneas celulares son capaces de replicar AAVr a esta temperatura relativamente elevada.

- [0112]** En última instancia, el virus auxiliar, la secuencia del vector de AAVr y todas las secuencias de AAV necesarias para replicación y empaquetamiento deben estar presentes en la misma célula. Cuando se proporcionan separadamente del vector uno o más genes de empaquetamiento de AAV, se proporciona una célula hospedadora que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en los que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un polinucleótido heterólogo introducido en dicha célula hospedadora usando un vector o provector de AAVr, en el que dicho vector o provector de AAVr comprende dicho polinucleótido heterólogo flanqueado por al menos una RTI de AAV y es deficiente de dicho gen o genes de empaquetamiento de AAV y (iii) un virus auxiliar o secuencias que codifican las funciones de virus auxiliar necesarias. Debe observarse, sin embargo, que uno o más de estos elementos pueden combinarse en un solo replicón. A modo de ilustración, un virus auxiliar puede comprender también un provector de AAVr o un gen de empaquetamiento de AAV.

- [0113]** El virus auxiliar se introduce preferiblemente en el cultivo celular a un nivel suficiente para infectar la mayoría de células en cultivo, pero puede mantenerse por otro lado a un mínimo para limitar la cantidad de virus auxiliar presente en la preparación resultante. Puede usarse una multiplicidad de infección o "MOI" de 1-100, pero es típicamente adecuada una MOI de 5-10.

- [0114]** De forma similar, si el vector de AAV y/o genes de empaquetamiento se introducen transitoriamente en la célula de empaquetamiento (en contraposición a introducirse establemente), se introducen preferiblemente a un nivel suficiente para alterar genéticamente la mayoría de las células en cultivo. Las cantidades requeridas

generalmente son del orden de 10^6 μg por 10^6 células, si se suministran como plásmido bacteriano, o de 10^8 partículas por 10^5 células si se suministran como partícula de AAV. La determinación de la cantidad óptima es un ejercicio de titulación rutinaria que está dentro de las habilidades del experto.

5 **[0115]** Estos elementos pueden introducirse en la célula simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Cuando la célula se altera hereditariamente por cualquiera de los elementos, la célula puede seleccionarse y dejarse proliferar antes de introducir el siguiente elemento.

10 **[0116]** En un caso preferido, por ejemplo en una realización preferida, se introduce el virus auxiliar al final en la célula para recuperar y empaquetar un vector de AAV residente. La célula estará generalmente ya suplementada en la medida necesaria con genes de empaquetamiento de AAV. Preferiblemente, el vector de AAV o los genes de empaquetamiento, y más preferiblemente ambos, se integran establemente en la célula. Se aprecia fácilmente que son posibles otras combinaciones. Dichas combinaciones están incluidas dentro del alcance de la invención.

15 **[0117]** Una vez se proporciona a la célula hospedadora los elementos necesarios, se cultiva la célula en condiciones que sean permisivas de replicación de AAV, para permitir la replicación y empaquetamiento del vector de AAV. El tiempo de cultivo se ajusta preferiblemente para corresponder a los niveles de producción máximos, y es típicamente de 3-6 días. Preferiblemente, se producen al menos 100 partículas víricas por célula; más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 por célula, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 20 10.000 por célula. Preferiblemente, se producen al menos $0,5 \times 10^6$, más preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^6 , incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 2×10^6 UR/ml de vectores de AAV por 2×10^5 células durante el periodo de cultivo. Opcionalmente, pueden usarse procedimientos de producción a gran escala tales como cultivo en suspensión y filtración por flujo tangencial. Se recolectan entonces las partículas de AAV y se aíslan de las células usadas para prepararlas.

25 **[0118]** Las preparaciones de partículas de AAV de la presente divulgación comprenden preferiblemente una alta densidad de partículas de AAV infecciosas y están sustancialmente exentas de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar y desechos celulares y otros contaminantes. Las propiedades deseables incluyen las siguientes:

30 • Una concentración de al menos 10^7 , preferiblemente de al menos aproximadamente 10^8 , más preferiblemente de al menos aproximadamente 10^{10} UR/ml, determinada en un ensayo de replicación o comparación de hibridación cuantitativa con un patrón conocido.

35 • No más de 10^3 , preferiblemente no más de aproximadamente 10^2 , más preferiblemente no más de aproximadamente 10 partículas infecciosas de virus auxiliar por 10^8 UR de partículas de AAV.

40 • Menos de un 5%, preferiblemente menos de aproximadamente un 1%, más preferiblemente menos de aproximadamente un 0,01%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente un 0,001% de contaminación por virus auxiliar basada en proteína (p/p), detectada por análisis densitométricos de geles de SDS o por inmunoensayo de proteína específica de virus auxiliar (tal como fibra de hexón o pentón de adenovirus).

45 • Menos de un 5%, preferiblemente menos de aproximadamente un 1%, más preferiblemente menos de aproximadamente un 0,01%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente un 0,001% de contaminación por virus auxiliar o proteína celular (p/p), detectada por análisis densitométricos de geles de SDS o por inmunoensayo para virus auxiliares o proteínas específicas celulares.

• Preferiblemente, la preparación está también sustancialmente exenta de otros componentes celulares potenciales tales como lípidos, carbohidratos y/o ácidos nucleicos celulares.

50 **[0119]** Los procedimientos exhibidos en esta divulgación son adecuados para preparar lotes experimentales pequeños o lotes preparativos de 10-100 l o más. Para preparaciones de lotes a gran escala, también es deseable la siguiente propiedad:

55 • Un total de al menos 10^{10} , preferiblemente 10^{12} y más preferiblemente 10^{14} UR de partículas de vector de AAV en la preparación.

[0120] Opcionalmente, los vectores de AAV pueden procesarse adicionalmente para enriquecer en partículas de AAV, agotar las partículas de virus auxiliar o volverlos de otro modo adecuados para administración a un sujeto. Las técnicas de purificación pueden incluir centrifugación en gradiente isopícnico y técnicas cromatográficas. La 60 reducción de la actividad del virus auxiliar infeccioso puede incluir la inactivación por tratamiento térmico o mediante tratamiento con pH como es conocido en la materia. Otros procesos pueden incluir concentración, filtración, diafiltración o mezclado con un tampón o excipiente farmacéutico adecuado. Las preparaciones pueden dividirse en alícuotas de dosis unitaria y dosis múltiple para distribución, que retendrán las características esenciales del lote, tales como la homogeneidad del contenido antigénico y genético, y la proporción relativa de virus auxiliar 65 contaminante.

[0121] Se proporcionan en las siguientes secciones y ejemplos posteriores técnicas ejemplares para generar preparaciones de virus auxiliares y AAV que exhiben diversas propiedades deseables como se describen anteriormente.

5 **[0122]** Son conocidos en la materia diversos procedimientos para la determinación del título infeccioso de una preparación vírica. Sin embargo, es un procedimiento preferido para la determinación del título un ensayo de titulación de alto rendimiento como se proporciona en la presente memoria. En un ensayo de titulación de alto rendimiento ejemplar, se establece una serie de pocillos de cultivo que comprenden cada uno una alícuota de células de mamífero y una alícuota de preparación vírica (así como pocillos de control que comprenden, por ejemplo, 10 células solas, virus solo y nada). La serie de pocillos de cultivo puede estar, por ejemplo, en forma de un recipiente de microtitulación. Típicamente, se añaden a las células alícuotas (por ejemplo, alícuotas diluidas en serie) de la preparación vírica a titular, y entonces se incuban las células y virus en condiciones que permitan la replicación del virus (típicamente, condiciones de crecimiento adecuadas para la célula hospedadora de mamífero). Después de la replicación del virus, se libera generalmente el ácido nucleico vírico mediante la lisis de las células de mamífero (usando condiciones o agentes que promuevan la lisis según sea necesario). En casos preferidos, el ácido nucleico (incluyendo ácido nucleico vírico) en la multiplicidad de lisados se transfiere y fija a una membrana en condiciones de unión del ácido nucleico (lavando según sea apropiado para retirar las proteínas y otros contaminantes). La membrana es preferiblemente un duplicado o imagen especular de la serie de cultivos en que los pocillos individuales de la serie original se representan posteriormente por “conjuntos” de ácido nucleico (del lisado de cada 20 pocillo de cultivo) que se unen en las correspondientes posiciones en la membrana. Puede usarse entonces la hibridación de la membrana con una sonda marcada específica de virus (o específica de inserto vírico) para identificar y cuantificar la cantidad relativa de ácido nucleico específico vírico en cada uno de los puntos de la serie, y en correspondencia, en cada uno de los pocillos de cultivo originales. Las condiciones y materiales para transferencia, unión, lavado e hibridación de ácido nucleico pueden adaptarse a partir de técnicas de biología 25 molecular rutinarias tales como hibridación “de transferencia puntual” (como se describe en la materia, véanse por ejemplo las técnicas biológicas moleculares en Sambrook y col., supra y Ausubel y col., supra). Se presentan a continuación aplicaciones ilustrativas de estas técnicas.

[0123] Estos procedimientos proporcionan por tanto un ensayo de infectividad de alto rendimiento que puede usarse en la determinación del título infeccioso de una preparación vírica. Como se muestra en el Ejemplo 4, los títulos víricos determinados mediante este procedimiento rápido y cuantitativo se corresponden estrechamente con los títulos determinados mediante técnicas más clásicas. Sin embargo, además este procedimiento de alto rendimiento permite el procesamiento y análisis simultáneo de muchas reacciones de replicación vírica y por tanto tiene muchos otros usos incluyendo, por ejemplo, el cribado de líneas celulares permisivas o no permisivas de 35 replicación e infectividad vírica, así como el cribado de agentes que afectan a la replicación vírica, como se examina adicionalmente a continuación.

Técnicas de producción y purificación de virus auxiliares preferidas para uso en la presente invención

40 **[0124]** En diversos aspectos preferidos de la presente divulgación, se emplean procedimientos de producción y purificación para la generación de virus auxiliares adecuados para uso en la producción de vectores de AAVr como se describen en la presente memoria. Es un virus auxiliar usado habitualmente para la producción de AAV el adenovirus, típicamente Ad5, aunque pueden emplearse también otros virus auxiliares como se examinan en la presente memoria y en la materia.

45 **[0125]** Con fines de ilustración, es conveniente dividir el examen de la producción y purificación de virus en las fases “anterior” y “posterior”. El proceso “anterior” designa generalmente la producción del virus en células hospedadoras adecuadas y la liberación o retirada del virus de las células para producir una preparación de virus “bruta” tal como un lisado. El procesamiento “posterior” puede emplearse para purificar la preparación de virus bruta 50 (por ejemplo, para aislarlo de proteínas celulares y/u otros contaminantes).

[0126] Son conocidas una variedad de técnicas para la producción y el procesamiento de virus auxiliares, incluyendo adenovirus (por ejemplo, centrifugación en CsCl, así como otras técnicas tales como las descritas en el documento WO 96/27677). El virus auxiliar producido usando dichas técnicas puede emplearse entonces en la 55 producción de vectores de AAVr como se describe en la presente memoria.

[0127] Las siguientes secciones describen, con fines de ilustración, técnicas que pueden emplearse para la producción de adenovirus, aunque son conocidas en la materia otras técnicas y pueden emplearse en la presente memoria.

60 (i) Virus auxiliares anteriores

[0128] El virus auxiliar, tal como Ad5, puede producirse fácilmente infectando células de mamífero (por ejemplo, células humanas). En los ejemplos ilustrativos descritos a continuación, las células crecen en medios y recipientes de cultivo adecuados para el crecimiento de la célula hospedadora, se concentran antes de la infección y se infectan entonces con virus auxiliar (por ejemplo, a una MOI de 1-5) con agitación suave. Después de la 65

infección, las células pueden resuspenderse en medio reciente e incubarse durante un periodo de tiempo adicional (típicamente aproximadamente 2 días) para permitir la replicación y empaquetamiento del virus auxiliar. Después de la incubación, las células pueden recolectarse y lisarse para liberar el virus auxiliar. Después de la lisis, se trata preferiblemente el lisado celular con una nucleasa para degradar el ácido nucleico libre (por ejemplo, ácido nucleico celular) sin degradar el ácido nucleico que está encapsidado en partículas víricas. El lisado puede clarificarse (por ejemplo, mediante filtración y/o centrifugación) y puede someterse también a técnicas de purificación adicionales para purificar y concentrar el virus auxiliar en la preparación como se describe e ilustra a continuación.

[0129] Como ejemplo ilustrativo de dicho proceso, las células pueden crecer en medios a una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ml en un recipiente tal como un matraz de agitación. Después de la incubación, las células pueden concentrarse entonces a aproximadamente 10^7 células/ml e infectarse con Ad5 a 1-2 unidades infecciosas/célula con agitación suave. Las células pueden resuspenderse entonces en medio a aproximadamente 10^6 células/ml y dejarse producir virus durante un periodo de incubación de aproximadamente 2 días. Las células pueden recolectarse entonces, resuspenderse en medio o tampón (por ejemplo, a aproximadamente 5×10^6 células/ml) y disgregarse entonces, por ejemplo mediante lisis mecánica tal como pasando a través de un microfluidificador a 55,16 MPa o técnica equivalente (por ejemplo, liofilización o sonicación). El lisado puede tratarse con una nucleasa (por ejemplo, benzonasa) durante 1 hora a 37°C. El lisado puede clarificarse a través de un filtro, tal como un filtro de 1,0 μm , o mediante centrifugación. Se describen adicionalmente a continuación técnicas análogas y modificaciones de las mismas.

(ii) Virus auxiliares posteriores

[0130] Las técnicas preferidas para el procesamiento posterior de virus auxiliares, tales como adenovirus, emplean procedimientos cromatográficos de intercambio iónico para la purificación de virus auxiliar.

[0131] A modo de ilustración, puede cargarse el filtrado de adenovirus como se describe anteriormente en una resina de intercambio aniónico, tal como una resina de amino o imino N-cargada (por ejemplo, POROS 50 PI, o cualquier resina basada en DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria o PEI) en una columna de cromatografía equilibrada con tampón (tal como TMEG, también designado en la presente memoria como tampón de cromatografía A: Tris 50 mM (pH 8,0), MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, 5% de glicerol).

[0132] La columna puede lavarse entonces con múltiples volúmenes de columna de TMEG (por ejemplo, 5-6 volúmenes), seguido de múltiples volúmenes de lavado salino (por ejemplo, 5-6 volúmenes de TMEG con NaCl 800 mM (tampón de cromatografía B: 60% de TMEG y 40% de TMEG con NaCl 2 M). El adenovirus puede eluirse con TMEG con NaCl 1300 mM (35% de tampón de cromatografía A y 65% de tampón de cromatografía B).

[0133] El pico de adenovirus puede identificarse en las fracciones mediante un ensayo de infectividad o mediante una hibridación de ácido nucleico o inmunoensayo, como se ha descrito en la materia. El pico puede esterilizarse por filtración a través de un filtro estéril de 0,2 μm . Opcionalmente, el pico puede concentrarse mediante filtración por flujo tangencial, por ejemplo en una unidad Filtron Ultrasette o Millipore Pellicon. El pico o concentrado puede diafiltrarse en este sistema en un tampón adecuado tal como PBS + 5% de sacarosa. Como alternativa, el adenovirus puede dejarse en el tampón de elución. El producto adenovirico final puede esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,2 μm y almacenarse para uso. Como se describe e ilustra en la presente memoria, puede emplearse también un virus auxiliar termosensible (tal como un adenovirus termosensible).

[0134] Se proporcionan a continuación con fines de ilustración adicional ejemplos que describen la preparación y uso de dichos virus auxiliares.

Técnicas de producción y purificación de AAV preferidas para uso en la presente invención

[0135] Como con los virus auxiliares, es conveniente con fines de ilustración dividir el examen de la producción y purificación de AAV en fases de proceso "anteriores" y "posteriores", designando el proceso "anterior" generalmente la producción de AAV en células hospedadoras adecuadas y la liberación o retirada del virus de las células para producir una preparación de AAV "bruta". El procesamiento "posterior" puede emplearse para purificar la preparación de AAV (por ejemplo, para aislar el AAV de proteínas celulares y/u otros contaminantes).

[0136] En aspectos preferidos de la presente divulgación, por ejemplo en aspectos preferidos de la presente invención, se realiza el procesamiento anterior y posterior de AAV de una manera diseñada para reducir sustancialmente y/o eliminar las proteínas celulares contaminantes, así como cualquier virus auxiliar contaminante (por ejemplo Ad) o proteínas de virus auxiliar, cualquiera de las cuales podría contribuir al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria si estuvieran presentes a niveles sustanciales en la preparación de vector de AAVr final a usar para transferencia génica.

[0137] Las siguientes secciones describen, con fines de ilustración, técnicas que pueden emplearse para la producción de AAV.

(i) Procesamiento anterior de AAV

- [0138]** El vector de AAV puede producirse a partir de una línea celular de mamífero que contiene los genes de empaquetamiento de AAV necesarios (por ejemplo, un gen *rep* y *cap* de AAV), un provector de AAV recombinante (AAVr) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (RTI) de AAV y un virus auxiliar de AAV (por ejemplo, un adenovirus). Estos componentes pueden introducirse en la célula en una variedad de configuraciones, como se describe anteriormente y se ilustra a continuación. Puesto que el AAV puede replicarse y empaquetarse en una variedad de células de mamífero, hay un gran número de líneas celulares que pueden modificarse y emplearse para la producción de AAV.
- [0139]** A modo de ilustración, el vector de AAV puede producirse a partir de una línea celular tal como "C12" (como se describe por K.R. Clark y col., Gene Therapy, 3: 1124-1132, 1996) o la línea "C137.5" (descrita en una solicitud en tramitación y de propiedad común con la presente de Targeted Genetics Corporation, J. Allen y col.. WO 96/17947), que se ha modificado por ingeniería genética para contener un constructo de *rep* y/o *cap*, así como un constructo de vector. Opcionalmente, puede transfectarse una línea celular tal como C12 o c137 que contiene un constructo de *rep* y/o *cap* con un plásmido que contiene un constructo de vector tal como ptgAAV-CF. O puede transfectarse una célula con un plásmido que contiene *rep* y *cap*, tal como pRS5, así como un plásmido que contiene un constructo de vector. La célula puede infectarse con adenovirus o transfectarse con ADN que contiene genes adenovíricos.
- [0140]** Puede generarse una variedad de dichas células "productoras" de AAV, como se describe en las referencias citadas en la presente memoria y en la materia.
- [0141]** Las células productoras de AAV pueden crecer en condiciones (incluyendo medios, temperatura y similares) que son generalmente adecuadas para el crecimiento de células de mamífero, y que son generalmente también permisivas de replicación de AAV. Por ejemplo, se prefiere el medio de suspensión DMEM/F12 para el crecimiento de células y se prefiere el medio DMEM solo para la producción de vector de AAV. Como es conocido en la materia, algunos tipos celulares y líneas celulares tienden a ser dependientes de unión, mientras que otros son capaces de crecimiento en suspensión y muchas células dependientes de unión pueden "adaptarse" también al crecimiento en suspensión mediante ciclado de las células en condiciones de suspensión como medio para enriquecer en y seleccionar en última instancia variantes que sean capaces de crecimiento en suspensión. Por consiguiente, el crecimiento de células para la producción de AAV puede realizarse en cualquiera de una variedad de recipientes, dependiendo en parte de si la línea productora seleccionada es relativamente dependiente de unión o está adaptada a suspensión. Dichos recipientes para el crecimiento de células dependientes de unión incluyen, por ejemplo, matraces de cultivo de tejido, frascos giratorios, microportadores y biorreactores (tales como biorreactores de fibra hueca, de lecho empaquetado o lecho fluidificado). Los recipientes para líneas celulares de mamíferos adaptadas a suspensión incluyen, por ejemplo, matraces de agitación, reactores en tanque y fermentadores de agitación de aire.
- [0142]** La replicación de AAV transcurre durante un periodo de tiempo así como en un punto del ciclo de crecimiento en que la producción vírica es óptima, preferiblemente en el crecimiento logarítmico de medio a tardío (típicamente de uno a tres días), después de cuyo tiempo las células pueden recolectarse y lisarse para liberar el virus de progenie. Por ejemplo, las células pueden resuspenderse en medios de crecimiento a aproximadamente $1-10 \times 10^6$ células/ml y dejarse producir durante 48 horas. Pueden recolectarse entonces las células (por ejemplo, mediante centrifugación) y resuspenderse en tampón (por ejemplo, TMEG (o "tampón de cromatografía A"): Tris 50 mM, pH 8, $MgCl_2$ 0,5 mM, EDTA 1 mM, 5% de glicerol) a aproximadamente $1-10 \times 10^6$ células/ml.
- [0143]** El AAV puede replicar a un alto número de copias (por ejemplo, 10^5-10^6 genomas/célula) en células transducidas si las proteínas Rep de AAV y funciones de virus auxiliar necesarias se proporcionan con relativa simultaneidad. Si se proporcionan también proteínas Cap, las partículas de AAV se ensamblan en el núcleo de las células infectadas, donde tienden a ensamblarse en series cristalinas. La primera etapa en la recuperación de producto es por lo tanto la disgregación celular. Aunque pueden usarse liofilización y/o sonicación para disgregar las células (como con adenovirus), dichas técnicas no son muy adecuadas para la preparación a gran escala. Es por tanto preferible a este respecto la lisis mecánica, usando técnicas tales como microfluidificación. Pueden emplearse también detergentes y otros agentes químicos para mediar o facilitar la lisis. El tratamiento de lisados con nucleasas (tales como benzonasa) se ha encontrado que es provechoso para reducir la viscosidad y mejorar la filtrabilidad. La clarificación, por ejemplo mediante microfiltración para separar el vector de al menos una porción del desecho celular, es también provechosa para promover la recuperación y purificación.
- [0144]** A modo de ilustración, las células pueden lisarse mecánicamente después del periodo de incubación mediante pasada secuencial a través de un microfluidificador (típicamente aproximadamente a 55,16 MPa usando dos pasadas). Otras técnicas empleadas comúnmente incluyen ciclado por liofilización y sonicación, como es conocido en la materia. El lisado puede tratarse también con una nucleasa para degradar el ácido nucleico (tal como ácido nucleico celular o vírico) que no está eficazmente "protegido" por estar empaquetado en una partícula vírica. Se emplea típicamente digestión con benzonasa durante aproximadamente 1 hora a 37°C. El lisado puede clarificarse también. Los procedimientos para clarificación incluyen pasada a través de un filtro, tal como un filtro de

1,0 µm, y centrifugación.

5 **[0145]** La filtración por flujo tangencial (FFT) puede emplearse beneficiosamente para procesar y recolectar grandes volúmenes de células. La FFT puede usarse para perfundir, concentrar y recolectar células animales. Por ejemplo, la FFT puede usarse para procesar células en condiciones de flujo laminar a tasas de cizallamiento de pared medias de hasta 3000 por segundo (véase, por ejemplo, Maiorella, B., y col., Bioengineering, 37: 121-126, 1991). La concentración a gran escala de virus usando ultrafiltración con FFT se ha descrito por R. Paul y col. Human Gene Therapy, 4: 609-615, 1993.

10

[0146] Se describen a continuación rutinas de producción ilustrativas que emplean dichas técnicas.

(ii) Procesamiento anterior de AAV

15 **[0147]** Como se describe anteriormente, sería particularmente ventajoso obtener preparaciones de AAV que estuvieran sustancialmente exentas de partículas de virus auxiliar (tales como partículas de Ad). Además, las preparaciones de vector de AAV estarán también preferiblemente exentas de proteínas de virus auxiliares y celulares (que también pueden ser inmunogénicas). Sin embargo, hay un grupo adicional de limitaciones que influyen en la idoneidad de las técnicas para la producción de AAV. A saber, para que sean particularmente útiles
20 para la producción de AAV para terapia génica, lo más deseable es que las técnicas sean “escalables”, concretamente aplicables junto con dispositivos y procedimientos de fabricación a gran escala. Este último grupo de limitaciones reduce o elimina eficazmente la utilidad de las técnicas estándares disponibles tales como separación con cloruro de cesio (que no es bien adecuada para procedimientos de preparación a gran escala).

25 **[0148]** Se ha descubierto una combinación de procedimientos que son tanto escalables como notablemente eficaces para la generación de preparaciones de AAV que están sustancialmente exentas de partículas de virus auxiliares, así como de proteínas de virus auxiliares y celulares y otros de dichos contaminantes. La combinación preferida de procedimientos emplea procedimientos cromatográficos de intercambio iónico, lo que contrasta con los diversos procedimientos mencionados en la materia para la purificación potencial de, por ejemplo, AAV o Ad. En
30 particular, dichos procedimientos como se describen en la materia emplean típicamente un solo tipo de separación iónica, a veces en combinación con otras clases de procedimientos cromatográficos (véanse, por ejemplo, K. Tamayose y col., Human Gene Therapy 7: 507-513 (1996) y WO96/27677, 12 de septiembre de 1996). Sin embargo, en el caso de la producción de AAV, se ha encontrado que una combinación de cromatografía de intercambio iónico secuencial opuesta es particularmente eficaz para la generación de preparaciones de AAV que están
35 sustancialmente exentas de partículas y proteínas de virus auxiliares, así como de proteínas celulares.

[0149] A la vista de estos descubrimientos, parece que el AAV no solo está “adaptado” tanto a la cromatografía de intercambio aniónico como catiónico, sino que dicha combinación de ambos intercambios iónicos opuestos es particularmente eficaz para eliminar todos los contaminantes de partículas y proteínas que aparecen
40 típicamente en la generación de preparaciones de vector de AAV. Puede emplearse cualquiera de una variedad de resinas de intercambio catiónico y aniónico junto con estos procedimientos, cuyas propiedades fundamentales son la disponibilidad de grupos cargados negativa y positivamente, respectivamente, con los que el AAV puede unirse al menos en cierto grado (lo más preferiblemente en un grado que difiere sustancialmente de la afinidad de unión relativa de uno o más de los contaminantes designados anteriormente, concretamente partículas y proteínas de Ad,
45 así como proteínas celulares de mamífero). Sin desear ligarse a teoría alguna, se cree que la etapa de intercambio aniónico es particularmente eficaz para separar el AAV del adenovirus, mientras que se cree que ambas etapas (pero especialmente la etapa de intercambio catiónico) es particularmente eficaz para separar el AAV de las proteínas celulares. Se ha empleado también intercambio aniónico seguido de filtración por flujo tangencial, como se describe e ilustra a continuación. Como se describe adicionalmente a continuación, se ha encontrado que las
50 preparaciones de AAV pueden concentrarse en gran medida mediante cromatografía en sulfato de heparina.

[0150] A modo de ilustración, puede cargarse un lisado de AAV clarificado, como se describe anteriormente, en una columna de intercambio aniónico cargada positivamente tal como una resina de amino o imino N-cargada (por ejemplo, POROS 50 PI o cualquier resina basada en DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria o PEI) o una
55 columna de intercambio catiónico cargada negativamente (tal como HS, SP, CM o cualquier resina catiónica basada en azufre, fósforo o carboxilo). La columna puede lavarse con un tampón (tal como el tampón de cromatografía A/TMEG). La columna puede eluirse con un gradiente de concentración creciente de NaCl y las fracciones pueden recogerse y ensayarse la presencia de AAV y/o contaminantes.

60 **[0151]** Pueden usarse otros procedimientos en lugar de, o preferiblemente además de, los procedimientos de intercambio aniónico y catiónico anteriormente descritos, basados en asociaciones intermoleculares mediadas por rasgos distintos de la carga como son conocidos en la materia. Dichos otros procedimientos incluyen asociaciones intermoleculares basadas en pares de ligando-receptor (tales como interacciones anticuerpo-antígeno o lectina-carbohidrato), así como separaciones basadas en otros atributos de las moléculas, tales como cromatografía de
65 tamizado molecular basado en tamaño y/o forma. Para tomar solo un ejemplo, puede cargarse una preparación de AAV filtrada o parcialmente purificada en una columna que contiene un anticuerpo específico de AAV. Esta columna

puede unirse a AAV. La columna puede aclararse con tampón para retirar las proteínas recombinantes y eluirse entonces con un gradiente o etapa de concentración creciente de NaCl, y pueden recogerse las fracciones. Como alternativa, dicha columna puede eluirse con un tampón de pH diferente que el del tampón de carga.

5 **[0152]** Los picos de AAV y adenovirus pueden identificarse en las fracciones mediante ensayos de infectividad o mediante una hibridación de ácido nucleico o inmunoensayos. Los picos pueden agruparse y el conjunto puede diluirse o dializarse o diafiltrarse con un tampón (por ejemplo, TMEG o equivalente) para reducir la concentración salina.

10 **[0153]** Este conjunto puede inyectarse en una columna de intercambio aniónico cargada positivamente y/o una columna de intercambio catiónico cargada negativamente (tales como las designadas anteriormente). La columna puede lavarse con un tampón (tal como tampón de cromatografía A/TMEG). La columna puede eluirse con un gradiente de concentración creciente de NaCl y pueden recogerse las fracciones. Los picos de AAV y adenovirus pueden identificarse en las fracciones mediante un ensayo de infectividad o mediante una hibridación de ácido
15 nucleico o inmunoensayo. Los picos pueden agruparse basándose en los resultados de cualquiera de estos ensayos.

[0154] El conjunto de fracciones que contienen AAV eluidas de una columna de intercambio aniónico como se describe anteriormente puede concentrarse y purificarse mediante filtración por flujo tangencial (FFT), por ejemplo,
20 en una unidad Filtron Ultrasette o Millipore Pellicon. Una membrana de corte de peso molecular adecuado (tal como un corte de 100.000 o 300.000) está compuesta típicamente por un polímero tal como una celulosa regenerada o polietersulfona. La preparación se filtra a través de la membrana y se retiene el producto. El material retenido puede diafiltrarse usando la membrana con lavados sucesivos con un tampón adecuado tal como disolución salina equilibrada de Ringer + 5% de glicerol. La muestra final está altamente enriquecida en el producto y puede
25 esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,2 µm y almacenarse para uso.

[0155] En la purificación y concentración de AAV por filtración por flujo tangencial de material post-columna de intercambio aniónico, la membrana de corte de peso molecular de 300.000 ha dado como resultado mayores rendimientos de unidades replicativas que la membrana de corte de peso molecular de 100.000.

30 **[0156]** Una etapa adicional que puede emplearse para la retirada del adenovirus, si se desea, implica tratar el conjunto de eluyentes con una etapa de inactivación térmica (como se describe en la presente memoria) y entonces filtración (por ejemplo, antes de someter la preparación a FFT). Sin embargo, se ha encontrado que el procedimiento de "intercambio aniónico a FFT" descrito anteriormente daba como resultado una preparación de AAV que estaba
35 exenta de adenovirus detectables y daba como resultado mejores rendimientos de AAV purificado.

[0157] Se describen a continuación rutinas de producción ilustrativas que emplean dichas técnicas.

40 **Alteración de las condiciones de crecimiento de las células productoras de AAV para potenciar la producción**

[0158] Durante el transcurso de los ensayos de producción con AAV en diversos medios y recipientes de cultivo, se monitorizaron típicamente los cultivos con respecto a diversos parámetros de crecimiento y/o metabólicos tales como densidad celular, disponibilidad de glucosa y aminoácidos y producción de subproductos metabólicos
45 tales como amoníaco y ácido láctico. Dichos componentes pueden monitorizarse fácilmente usando técnicas estándares tales como HPLC y ensayos enzimáticos, como se describen en la materia.

[0159] Como se describe en los ejemplos siguientes, se descubrió que ciertos aminoácidos, particularmente aspartato y glutamato, se agotaban rápidamente tanto en cultivos en lotes como de perfusión. Es más, en diversos
50 experimentos en lotes y de perfusión se observó que se elimina sustancialmente de 90 a 99% del asp y glu disponibles después de 24 a 48 horas en dichos cultivos. Puesto que los niveles de asp y glu parecían ser subóptimos en dichos medios, se proporcionaron por lo tanto cantidades adicionales de cualquiera o ambos aminoácidos. Se han aplicado rutinariamente técnicas de mantenimiento y optimización de cultivos tales como estas en el contexto de bioproducción a gran escala (véanse, por ejemplo, Glacken, M.W. y col., Biotecnology and
55 Bioengineering, 28: 1376-1389, 1986; Glacken, M.W., Bio/Technology 6: 1041-1050, 1988; Bibila, T.A., y col., Biotechnol. Prog., 10: 87-96, 1994 y Borys, M.C., y col., Biotecnology and Bioengineering, 43: 505-514, 1994).

[0160] Sorprendentemente, el reemplazo de estos aminoácidos agotados dio como resultado una brusca caída de la producción de AAV. Por ejemplo, en los experimentos descritos a continuación, suplementar el medio
60 estándar (DMEM) con asp y glu adicionales reducía la eficacia de producción en más de un orden de magnitud (de aproximadamente 1800 partículas resistentes a ADNasa (PRA) por célula a aproximadamente 140 PRA por célula), aunque se potenciaba ligeramente la viabilidad.

[0161] Otro componente común de los medios para el crecimiento de células productoras de mamífero es el
65 componente sérico, tal como suero fetal bovino (FBS), que se incluye típicamente en los medios a un nivel de aproximadamente un 10%. Como se describe a continuación, cuando se aumentaba el nivel sérico para la

producción de AAV (al 20%), la producción de vector de AAV caía más de 2 veces. En contraposición, cuando las células se sometían a niveles crecientemente menores de suero, la producción de vector de AAV aumentaba drásticamente. Por ejemplo, cuando los niveles de suero se reducían a un décimo de los niveles de partida normales (concretamente al 1%), la producción de vector aumentaba en más de 4 veces.

5

[0162] Sin desear ligarse a teoría alguna, parece ahora que estresar las células productoras, metabólicamente o por otros medios como se describen a continuación, puede potenciar drásticamente la producción de vector de AAV.

10 **[0163]** El estrés puede caracterizarse eficazmente, y ensayarse, basándose en el efecto negativo de la condición estresante o agente estresante sobre el crecimiento y/o metabolismo celular. En efecto, puede conseguirse estrés mediante la introducción de cualquier condición o agente que inhiba el crecimiento y/o metabolismo celular, o alterando el nivel de una condición o agente preexistente de tal modo que se vuelva subóptimo con respecto al crecimiento y/o metabolismo celular. Son conocidas y/o evidentes una gran variedad de
15 dichas condiciones incluyendo estrés nutricional (uno o más nutrientes presentes a niveles subóptimos para el crecimiento y/o metabolismo), estrés térmico (temperatura subóptima, que puede incluir el crecimiento de células a temperaturas menores o mayores, o someter las células a choques térmicos temporales tales como un choque frío o choque caliente), estrés osmótico (nivel osmótico subóptimo, que puede ser hipoosmótico o hiperosmótico), estrés de pH (pH subóptimo que puede ser ácido o alcalino), estrés de aireación (por ejemplo, niveles subóptimos de
20 oxígeno o intercambio de gas), estrés mecánico (por ejemplo, estrés de cizallamiento como ocurre en el mezclado de cultivo), estrés de radiación y estrés tóxico (presencia de uno o más productos químicos u otros agentes que inhiben el crecimiento y/o metabolismo). Con la mayoría, si no todos dichos agentes y condiciones, es posible someter las células a estrés continua o temporalmente. A modo de ilustración, en el caso de estrés térmico, las células pueden crecer a temperaturas que están por encima o por debajo del óptimo (típicamente, el óptimo es
25 aproximadamente la temperatura corporal normal del animal del que derivan las células), o las células pueden someterse a un choque térmico temporal, tal como un choque frío o un choque caliente. Los ejemplos actualmente preferidos de dichas condiciones de estrés incluyen: estreses nutricionales tales como limitación de aminoácidos o suero, alteración de los niveles de aireación y agitación, alteración de los niveles osmóticos (por ejemplo, usando carbohidratos no metabolizables tales como sorbitol) e inclusión de agentes químicos tales como ácidos carboxílicos
30 alifáticos saturados (por ejemplo, ácidos propiónico, butírico, isobutírico, valérico y caproico y sus sales con bases orgánicas o inorgánicas), diaminas *N,N*-diaciladas (tales como pentametilénbisacetamida, hexametilénbisacetamida y heptametilénbisacetamida), compuestos sulfurados orgánicos (tales como dimetilsulfóxido) y glucocorticoides (tales como hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, aldosterona, triamcinolona y cortexolona). Otros de dichos agentes incluyen agentes genotóxicos tales como carcinógenos químicos, UV, choque caliente, inhibidores
35 metabólicos de la síntesis de ADN (por ejemplo, hidroxiaurea, metotrexato, afidicolina, fármacos que afectan a las topoisomerasas (por ejemplo, amsacrina, camptecina, etopósido y novobiocina).

[0164] Como se observa anteriormente, las células productoras pueden someterse también a estrés subletal alterando el pH. Como se ejemplifica a continuación, se encontró que el estrés de pH inducido elevando el pH del
40 medio no solo aumentaba el AAV, sino que causaba también un drástico desplazamiento de las proporciones relativas de AAV que se liberaban al medio de cultivo. Como se describe adicionalmente a continuación, esta técnica puede usarse por tanto para facilitar la purificación de AAV así como para potenciar la producción.

[0165] Se proporcionan a continuación procedimientos ilustrativos para optimizar la producción de AAV empleando diversas condiciones de estrés, ya que son resultados que demuestran que puede usarse la aplicación
45 de una variedad de diferentes condiciones de estrés para potenciar eficazmente los niveles de producción de AAV.

[0166] Los procedimientos de la presente invención que implican incubar una célula productora de AAV en condiciones que sean permisivas de replicación de AAV y que comprenden inducir un estrés subletal en el AAV de la
50 presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Uso de AAVr para terapia génica

[0167] Se describen en la presente memoria composiciones de vector que comprenden polinucleótidos con
55 una secuencia genética terapéuticamente relevante. Los vectores víricos de AAV de esta divulgación pueden usarse para administración a un individuo con fines de terapia génica. Las enfermedades adecuadas para terapia génica incluyen, pero sin limitación, aquellas inducidas por infecciones víricas, bacterianas o parasitarias, diversas malignidades y afecciones hiperproliferativas, afecciones autoinmunitarias y deficiencias congénitas.

60 **[0168]** La terapia génica puede realizarse para potenciar el nivel de expresión de una proteína particular dentro de o secretada por la célula. Los vectores de esta divulgación pueden usarse para alterar genéticamente las células para marcaje génico, reemplazo de un gen faltante o defectivo o inserción de un gen terapéutico. Como alternativa, puede proporcionarse un polinucleótido a la célula que reduzca el nivel de expresión. Este puede usarse para la supresión de un fenotipo indeseable, tal como el producto de un gen amplificado o sobreexpresado durante
65 el transcurso de una malignidad, o un gen introducido o sobreexpresado durante el transcurso de una infección microbiana. Los niveles de expresión pueden reducirse suministrando un polinucleótido terapéutico que comprenda

una secuencia capaz de formar, por ejemplo, un híbrido estable con el gen diana o transcrito de ARN (terapia anticodificante), capaz de actuar como ribozima para escindir el ARNm relevante o capaz de actuar como reclamo de un producto del gen diana.

5 **[0169]** Es de particular interés la corrección del defecto genético de la fibrosis quística suministrando un regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) apropiadamente funcional al epitelio respiratorio. Afione y col. (*J. Virol.* 70: 3235, 1996) y Conrad et. al. (*Gene Therapy*: en prensa. 1996) han mostrado una transferencia génica *in vivo* estable de CFTR a pulmón de primate usando vectores de AAV monodosis. Existe una variedad de polipéptidos de CFTR que son capaces de reconstruir las deficiencias funcionales de CFTR en
10 células derivadas de pacientes de fibrosis quística. Rich y col., *Science*, 253: 205 (1991) describieron un derivado de CFTR en que faltaban los residuos aminoacídicos 708-835 que era capaz de transportar cloruro y capaz de corregir un defecto de CFTR de origen natural. Egan y col., *Nature*, 358:581 (1992) describieron otro derivado de CFTR (que comprende aproximadamente 25 aminoácidos de una proteína no relacionada seguidos de la secuencia de CFTR nativa partiendo del residuo 119) que también era capaz de restaurar las características electrofisiológicas del CFTR
15 normal. Arispe y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1539 (1992) mostraron que un fragmento de CFTR que comprende los residuos 433-586 era suficiente para reconstituir un canal de cloruro correcto en bicapas lipídicas. Sheppard y col., *Cell* 76: 1091 (1994) mostraron que un polipéptido de CFTR truncado en el residuo 836 a aproximadamente la mitad de su longitud seguía siendo capaz de formar un canal de cloruro regulado. Por tanto, los vectores de AAV con secuencias de codificación de proteína CFTR nativa y los mutantes y fragmentos de la misma
20 son todos casos preferidos de esta divulgación.

[0170] Es también de interés particular la corrección del gen supresor tumoral p53, localmente defectivo en ciertos tipos de tumor, suministrando un gen p53 apropiadamente funcional al sitio tumoral (Huyghe y col., *Human Gene Therapy* 6: 1403,1995).

25 **[0171]** Las composiciones de esta divulgación pueden usarse *in vivo* así como *ex vivo*. La terapia génica *in vivo* comprende administrar los vectores de esta divulgación directamente a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse como disoluciones líquidas o suspensiones, como emulsiones o como formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes del uso. Para administración al tracto respiratorio,
30 es un modo preferido de administración mediante aerosol, usando una composición que proporciona un aerosol sólido o líquido cuando se usa con un dispositivo aerosolizador apropiado. Otro modo preferido de administración al tracto respiratorio es usando un broncoscopio de fibra óptica flexible para instilar los vectores. Típicamente, los vectores víricos están en un tampón exento de pirógenos farmacéuticamente aceptable tal como disolución salina equilibrada de Ringer (pH 7,4). Aunque no es necesario, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse
35 opcionalmente en forma de dosificación unitaria adecuada para la administración de una cantidad precisa.

[0172] Se administra una cantidad eficaz de virus dependiendo de los objetivos del tratamiento. Puede procurarse una dosis eficaz en dosis única o divididas. Cuando un bajo porcentaje de transducción puede curar una deficiencia genética, entonces el objetivo del tratamiento es generalmente satisfacer o superar este nivel de
40 transducción. En algunos casos, este nivel de transducción puede conseguirse mediante la transducción de solo aproximadamente 1 a 5% de las células diana, pero es más típicamente un 20% de las células del tipo de tejido deseado, habitualmente al menos aproximadamente un 50%, preferiblemente al menos aproximadamente un 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 99% de las células del tipo de tejido deseado. Como guía, el número de partículas de vector presentes en una
45 dosis única procurada por broncoscopio será generalmente de al menos aproximadamente 1×10^8 , y es más típicamente de 5×10^8 , 1×10^{10} y en algunas ocasiones 1×10^{11} partículas, incluyendo tanto partículas resistentes a ADNasa como sensibles a ADNasa. En términos de partículas resistentes a ADNasa, la dosis será generalmente entre 1×10^6 y 1×10^{14} partículas, más generalmente entre aproximadamente 1×10^8 y 1×10^{12} partículas. El tratamiento puede repetirse tan a menudo como cada dos o tres semanas, según sea necesario, aunque puede ser
50 suficiente un tratamiento una vez cada 180 días.

[0173] La eficacia de la alteración genética puede monitorizarse mediante varios criterios. Las muestras retiradas por biopsia o extirpación quirúrgica pueden analizarse mediante hibridación *in situ*, amplificación por PCR usando sondas específicas de vector, protección de ARNasa, inmunohistología o recuento celular por
55 inmunofluorescencia. Cuando el vector se administra mediante broncoscopia, pueden efectuarse ensayos de la función pulmonar, y puede valorarse en el lavado bronquial la presencia de citocinas inflamatorias. En el sujeto tratado pueden monitorizarse también los rasgos clínicos, y determinar si las células expresan la función que se pretende transmitir por el polinucleótido terapéutico.

60 **[0174]** La decisión de si usar terapia *in vivo* o *ex vivo*, y la selección de una composición, dosis y vía de administración particular dependerá de una serie de diferentes factores incluyendo, pero sin limitación, los rasgos de la afección y el sujeto que se está tratando. La valoración de dichos rasgos y el diseño de un régimen terapéutico apropiado son en última instancia responsabilidad del facultativo que prescribe.

65 **[0175]** La descripción anterior proporciona, entre otros, procedimientos para generar preparaciones de título alto de vectores de AAV recombinante que están sustancialmente exentas de virus auxiliares (por ejemplo

adenovirus) y proteínas celulares.

[0176] Los ejemplos presentados a continuación se proporcionan como guía adicional para un experto en la materia y no se pretende que sean limitantes en modo alguno.

5

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

10 Producción ilustrativa de vector de AAV recombinante usando un virus auxiliar de tipo silvestre (Ad5) y un virus auxiliar termosensible (Ad TS149)

[0177] Este ejemplo ilustra el uso de un virus auxiliar de tipo silvestre (Ad5) y un virus auxiliar termosensible (Ad ts149) para proporcionar funciones auxiliares para la replicación de una partícula de vector de AAV recombinante que comprende un gen terapéutico modelo.

[0178] El plásmido ptgAAVCF consiste en la RTI de AAV2 izquierda, un ADNc de regulador transmembrana de fibrosis quística completo, una secuencia de poliadenilación sintética basada en la secuencia de poliadenilación de β -globina de ratón, secuencias de AAV2 en dirección 3' de las secuencias de codificación de *cap* y la RTI de AAV2 derecha en un esqueleto de plásmido pBR322 (Afione y col., 1996). El plásmido de empaquetamiento pGEM-RSS derivaba del plásmido pHIVrep (Antoni y col., 1991) y consiste en las regiones U3 y R de LTR de VIH-1, incluyendo las regiones *rep* y *cap* de AAV2 los promotores p19 y p40, secuencias de plásmidos pBR322 y pGEM para replicación y selección bacteriana y una pequeña región de ADN celular repetitivo Alu humano en dirección 5' de la LTR de VIH.

25

[0179] El adenovirus de tipo 5 creció a partir de una disolución madre obtenida de la American Type Culture Collection (Rockville, Md). Se obtuvo Ad5ts149 (Ensinger y col., J. Virol. 10: 328, 1972) de Harold S. Ginsberg.

[0180] Se produjeron disoluciones madre de trabajo de Ad5 y Ad5ts149 (ts149) a 37°C y 32°C, respectivamente, infectando células 293-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y 1, respectivamente. Después de 4 horas, se volvieron a alimentar los cultivos con medio reciente y se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con 10% de CO₂. Después de 72 horas, se retiraron las células, se sedimentaron a 1000 g a 15°C y se resuspendieron en PBS que contenía MgCl₂ 0,1 g/l y CaCl₂ 0,1 g/l. Se congeló y descongeló entonces la suspensión celular tres veces, se cizalló tres veces a través de una aguja de calibre 18 y se clarificó mediante centrifugación a 1000 g a 15°C. Se trató entonces el lisado clarificado con ADNasa I a una concentración final de 2 mg/ml durante 30 minutos a 37°C. Se extendió el lisado tratado en capas sobre un gradiente de etapa discontinua de CsCl en agua que comprendía 4,0 ml de CsCl (1,25 g/cm³) extendido en capas sobre 2,0 ml de CsCl (1,40 g/cm³) en agua y se centrifugó a 35.000 rpm durante 1 a 2 horas en un rotor Beckman SW41. Se retiró la banda de adenovirus de cada tubo, se agrupó, se diluyó en CsCl a 1,35 g/cm³ en agua y se centrifugó durante una noche a 35.000 rpm en un rotor Beckman SW55. Se agrupó la banda de adenovirus, se ajustó a 10% de glicerol y se dializó extensamente frente a tampón Tris 10 mM a pH 7,5 suplementado con MgCl₂ 1,0 mM y 10% de glicerol.

35

40

[0181] Se mantuvieron células 293-1 (ATCC CRL 1573) en frascos T en un incubador humidificado con 10% de CO₂ en medio DMEM rico en glucosa (JRH) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Hyclone). Para este ejemplo, se inocularon las células 293-1 a 4,4 x 10⁴ células/cm² en matraces de cultivo de tejido con DMEM suplementado con 10% de FBS y L-glutamina 2,0 mM y se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador humidificado con 10% de CO₂.

45

[0182] Se infectaron entonces las células (aproximadamente 10⁷ células por matraz) con disoluciones madre de trabajo de Ad5 o ts149 durante 1 hora a una MOI de 5, seguido de la transfección transitoria de vector y plásmidos de empaquetamiento. Se efectuó la cotransfección transitoria de plásmido del vector ptgAAVCF y plásmido del auxiliar pGEM-RS5 usando LIPOFECTAMINE™ (Gibco). En ese proceso, se mezclaron 37,5 μ g de cada plásmido junto con 150 μ l de LIPOFECTAMINE™ y se diluyeron en 4,75 ml de MEM exento de suero. Se retiró el inóculo de adenovirus y se añadió la mezcla de plásmido-LIPOFECTAMINE™ a las células y se incubó durante 4 horas en un incubador con 5% de CO₂ a la temperatura apropiada. Se retiró la mezcla de plásmido-LIPOFECTAMINE™ del cultivo después de 4 horas y se reemplazó por medio reciente.

55

[0183] Se cultivaron células infectadas con virus de tipo silvestre a 37°C y se incubaron células infectadas con Adts149 a 39,5°C. Después de 72 horas, se recolectaron las células, se sedimentaron y se resuspendieron en Tris 10 mM a pH 7,5. Se lisó entonces la suspensión mediante sonicación en un baño de agua y hielo usando un sonicador de copa y husillo de Branson que utiliza 4 pulsos de 15 segundos y se ensayó el AAVCFr y la producción de adenovirus.

60

Ejemplo 2**Cuantificación de los títulos de AAVr y adenovirus en preparaciones de vector**

[0184] Se ensayó en lisados celulares del ejemplo precedente la producción del vector AAVCFr mediante el ensayo de replicación de C37 y se analizó la producción de adenovirus mediante hibridación de transferencia por ranuras.

[0185] Se construyó C37 de HeLa para permitir la expresión inducible de proteínas Rep de AAV para la replicación de vector de AAVr. Brevemente, se construyó un módulo de expresión de Rep/Cap de AAV consistente en el promotor de metalotioneína I de ratón, los genes *rep* y *cap* de AAV2 y el sitio de terminación de la transcripción de AAV. Se incluyó también en el plásmido un gen de resistencia a neomicina bajo el control del promotor temprano de SV40, el intrón T pequeño de SV40 y la señal de poliadenilación de SV40. Se transfectaron células HeLa con el plásmido y se seleccionaron los clones en G418. Se cribó un panel de clones mediante un ensayo de amplificación de vector de AAVr. Un clon, C37, demostró una amplificación consistente y dependiente de la dosis de vector de AAVr después de la transducción e infección con adenovirus.

[0186] La detección del vector replicante se logra mediante aislamiento de ADN seguido de hibridación con una sonda de CFTR. Detalladamente, se inocularon células C37 de HeLa a $4,4 \times 10^4$ células/cm² en matraces de cultivo de tejido con DMEM suplementado con 10% de FBS y L-glutamina 2,0 mM y se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Se inocularon entonces las células con adenovirus (MOI= 5) y diluciones de muestra de AAVCFr durante 72 horas. Se recolectaron las células mediante raspado y se prepararon para análisis de transferencia Southern. Se preparó el ADN celular total, se digirió con EcoRI, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se transfirió a una membrana de nailon 66, seguido de hibridación con un fragmento de restricción de ADNc de CFTR humano marcado con ³²P. Esta sonda detecta un fragmento de aproximadamente 1,5 kb del vector de AAVCF (correspondiente al fragmento EcoRI predicho de 1,488 kb). Se cuantificó la replicación de vector respecto a una banda de CFTR genómico endógeno y se expresa como unidades de replicación. Se define una unidad de replicación (UR) como una intensidad de señal equivalente a la banda de CFTR genómico endógeno que es de aproximadamente 1,8 kb. En algunos experimentos, se usó la regresión lineal de patrones de vector conocidos diluidos en serie para extrapolar y calcular la concentración de vector en las muestras.

[0187] Se realizó el ensayo de transferencia por ranuras de ADN adenovirico como sigue. Se desnaturalizaron alícuotas de muestras en NaOH 0,4 M, EDTA 10 mM con ADN de esperma de salmón 1,0 µg/ml a 65°C. Se diluyeron muestras y patrones de adenovirus y se filtraron por membranas de nailon usando un colector de transferencia por ranuras y se lavaron con NaOH 0,4 M. Se hibridó el filtro con una sonda marcada con ³²P correspondiente a la secuencia del gen E1A de adenovirus. El genoma de Ad5 completo está disponible en Genbank con el número de acceso X02996. Se usó un fragmento de SspI-XbaI de 1 kb (correspondiente a los nucleótidos 339-1339) y se analizaron las transferencias en un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Se consideró que un equivalente genómico era equivalente a una partícula adenovirica.

[0188] La **Figura 1** muestra los resultados del ensayo de replicación del vector de AAVCFr en lisados preparados con Ad5 o ts149 a temperaturas permisivas (37°C) y no permisivas (39,5°C). La producción de vector recombinante se apoyó por ts149 a 39,5°C, pero la productividad era aproximadamente de 2 a 3 veces menores que con Ad5.

[0189] La **Figura 2** muestra los resultados del ensayo de transferencia por ranuras para determinar la cantidad de adenovirus. La producción de genomas adenoviricos se redujo 3-4 unidades logarítmicas por el uso de mutante termosensible en comparación con el de tipo silvestre.

Ejemplo 3**Optimización de la función auxiliar para mejorar la producción de AAVr**

[0190] Este ejemplo ilustra diversos intentos de mejorar el nivel de AAVr obtenido cuando se usan virus auxiliares termosensibles. Aumentar los niveles de infección del virus auxiliar no era provechoso, pero ajustar la cinética era sorprendentemente eficaz.

[0191] Se evaluaron primero los efectos de aumentar la multiplicidad de infección sobre la producción de vector. Se infectaron células 293-1 con Ad5 a una MOI de 5 o con ts149 a diversas MOI, seguido de cotransfección transitoria con plásmidos de vector y empaquetamiento. Después de 72 horas, se lisaron las células y se ensayó la producción de vector de AAVCFr mediante el ensayo de replicación de vector de C37 y se analizó la producción de adenovirus mediante hibridación de transferencia por ranuras. Se recogió en un punto temporal adicional a las 96 horas para las células infectadas con ts149 a una MOI de 5.

[0192] La **Figura 3** muestra los resultados del ensayo de replicación de AAVCFr realizado en lisados celulares

preparados con ts149 a diversas MOI. Aumentar la MOI de ts149 no restauraba la productividad del vector a los niveles observados con Ad5 (como se muestra por la intensidad de la banda de hibridación de 1,4 kb). Sin embargo, se observó un mayor nivel de producción de vector en el punto temporal de 96 horas. La concentración de ts149 en el lisado detectada por el análisis de transferencia por ranuras aumentaba al aumentar la MOI, pero seguía siendo de 3 a 4 unidades logarítmicas menor en comparación con Ad5.

[0193] Después de la observación de la productividad de vector aumentada con ts149 a las 96 horas en el experimento previo, se efectuó un estudio del transcurso temporal y cinética de producción. Se infectaron células 293-1 con Ad5 o ts149 a una MOI de 5 seguido de cotransfección transitoria con plásmidos de vector y empaquetamiento. Se cultivaron las células infectadas con Ad5 y ts149 a 37°C y 39,5°C, respectivamente, durante 6 días. Se ensayó en los lisados de los días 3, 4, 5, y 6 la producción de vector mediante un ensayo de replicación de vector y se analizaron los adenovirus por hibridación de transferencia por ranuras.

[0194] La **Figura 4** ilustra la cinética de la producción de vector. Las barras negras representan lisados producidos usando Ad5 de tipo silvestre como auxiliar; las barras rayadas representan lisados producidos usando ts149 como auxiliar. La producción máxima de vector cuando se usaba Ad5 era $\sim 2,0 \times 10^6$ UR/ml, siendo máxima el día 4. En este punto temporal, la producción de vector obtenida usando ts149 era menor de $\sim 0,3 \times 10^6$ UR/ml. Sin embargo, el día 5, hubo una alteración drástica de la eficacia relativa de los dos virus auxiliares. La producción de vector apoyada por Ad5 cayó a menos de $0,3 \times 10^6$ UR/ml. En contraposición, la producción de vector apoyada por ts149 subió a más de 2×10^6 UR/ml. Los niveles de genoma adenovirico observados cuando se usa ts149 fueron significativamente menores que con Ad5.

Ejemplo 4

25 Ensayo de los títulos víricos y técnicas de ensayo de alto rendimiento

[0195] Se produjeron las disoluciones madre de adenovirus termosensibles y de tipo silvestre usadas en los ejemplos precedentes en células 293-1 en matraces de cultivo de tejido. En este ejemplo, se cuantificaron los niveles de adenovirus que se están produciendo por células 293-1 mediante el ensayo de criterio de valoración por TCID₅₀ o ensayo de infectividad.

[0196] Se realizó el ensayo de TCID₅₀ como sigue: se sembraron $1,0 \times 10^3$ células 293-1 en placas de microtitulación de 96 pocillos, se infectaron con diluciones en serie de disolución madre de adenovirus y se dejaron incubar a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Se inocularon 8 duplicados de 100 µl de cada dilución en las células. 3 días después de la infección, se fijaron las células con metanol, se lavaron con PBS y se tiñeron con anticuerpo anti-hexón conjugado con FITC (Biosign) seguido de tinción con yoduro de propidio para visualizar los núcleos celulares. Después de aclarar con PBS, se examinó la placa con microscopio fluorescente y se puntuó la presencia de células que contienen hexones. Se calculó el título en el criterio de valoración usando una distribución de Poisson. Una dilución de virus que proporciona un 50% de muestras de duplicados positivos de hexones tiene 0,5 UI/100 µl de inóculo. El título infeccioso es el producto de la inversa de esta dilución, 0,5 UI/100 µl y 10 (factor de conversión en ml), dando el título infeccioso final por ml.

[0197] Se realizó un ensayo de infectividad por microtitulación de alto rendimiento para medir los virus infecciosos como sigue. Se inocularon alícuotas (10 µl) de sobrenadantes exentos de células diluidos en serie en células HeLa crecidas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 3 días, se trataron las células infectadas y se lisaron con una disolución de desnaturalización (adición de un décimo de volumen de NaOH 4,0 M, ADN de esperma de salmón 10 µg/ml y EDTA 100 mM). Se transfirió el lisado a una placa Silent Monitor BiondyeB plate (Pall) y se filtró a vacío en membrana de nailon. Se lavó la membrana, se desnaturalizó, se hibridó con un fragmento de restricción de ADNc de E1A de adenovirus marcado con ³²P y se analizó en un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Se usó el análisis de regresión lineal de patrones de adenovirus diluidos en serie para calcular los títulos de adenovirus infecciosos en las muestras, usando patrones de adenovirus titulados por el ensayo de TCID₅₀.

[0198] Se calculó la productividad vírica específica normalizando los títulos de virus infecciosos en el lisado a los números de células en el momento de infección. Los resultados se muestran en la Tabla 1:

TABLA 1: Producción de adenovirus			
Adenovirus	Línea celular	Productividad específica (UI/célula)	Ensayo
Ad5	293-1	125	TCID ₅₀
	S3 de HeLa	400	TCID ₅₀
Ad5ts149	293-1	10	TCID ₅₀
	293-1	16	Microtitulación de infectividad
	293-1	15	Microtitulación de infectividad
	293-1	10	Microtitulación de infectividad

[0199] Estos resultados muestran que la producción específica de Adts149 en células 293-1 era de una a dos unidades logarítmicas menor que la de Ad5.

[0200] Una preparación de virus Ad5 de título conocido mostró un intervalo lineal que se extendía de 12,5 a 500 UI/pocillo basándose en la regresión lineal en el ensayo de microtitulación de infectividad.

[0201] Combinar un ensayo de infectividad vírica con un formato de serie de microtitulación como se describe anteriormente dio como resultado una técnica que es tanto rápida como cuantitativa, y que es altamente adecuada para automatización.

10

[0202] El ensayo de infectividad de alto rendimiento descrito anteriormente puede aplicarse también al ensayo de otros virus (por ejemplo, AAVr y AAVwt). El ensayo puede efectuarse esencialmente como se describe anteriormente usando células de mamífero apropiadas (por ejemplo, células C37 de HeLa para AAVr o células 293 para AAVwt) y en condiciones permisivas de replicación del virus a ensayar (por ejemplo, en presencia de virus auxiliar de AAVr y AAVwt), y entonces pueden prepararse los lisados y pueden transferirse los ácidos nucleicos en dichos lisados a una membrana como se describe anteriormente. La hibridación de la membrana que contiene la serie de conjuntos de ácidos nucleicos unidos (estando liberado cada conjunto de las células del correspondiente pocillo de cultivo) se efectúa típicamente con una sonda específica de virus adecuada (por ejemplo, una sonda específica de *rep* y/o *cap* de AAV podría usarse para detectar AAVwt, o una sonda específica de un transgén insertado podría usarse en el caso de un vector de AAV recombinante).

[0203] El ensayo de infectividad de alto rendimiento anteriormente descrito exhibía una respuesta lineal en la determinación de los títulos de AAVr en un intervalo relativamente amplio de concentraciones. Por ejemplo, cuando se diluyó en serie 1:2 una preparación vírica de título conocido (determinado mediante un ensayo de centro infeccioso modificado), partiendo de 2400 unidades infecciosas o "UI/pocillo", y se usó como patrón para la determinación del título de dos preparaciones de tgAAVCF purificado de título desconocido, cada una de las cuales estaba diluida en serie 1:5, el ensayo de microtitulación mostró un intervalo lineal que se extendía de 75 a 600 UI/pocillo basándose en la regresión lineal. La determinación del título de AAVwt empleaba preferiblemente un formato de dilución limitante (por ejemplo, cuando se ensayaron 8 diluciones limitantes en serie de una preparación de AAVwt de título conocido, el título determinado por el ensayo de microtitulación era esencialmente el mismo que el determinado por el ensayo de TCID₅₀ estándar, 3×10^9 UI/ml).

[0204] Por dilución limitante o por comparación con un patrón conocido, puede determinarse el título de virus infeccioso, que corresponde a los títulos determinados mediante técnicas más clásicas (por ejemplo, el ensayo de centro infeccioso o el análisis de criterio de valoración del 50% TCID₅₀). Además de su uso en la determinación de títulos víricos, este ensayo de infectividad de alto rendimiento tiene muchos otros usos incluyendo, pero sin limitación, el cribado de líneas celulares permisivas o no permisivas de replicación e infectividad vírica (por ejemplo, incluyendo diversas células de mamífero o variantes de las mismas en diferentes pocillos de una serie de microtitulación), así como el cribado de agentes que afectan a la replicación vírica (por ejemplo, incluyendo diversos agentes en diferentes pocillos de una serie de microtitulación como se describe anteriormente y determinando el efecto de los agentes sobre el título infeccioso de virus). Entre otras cosas, la capacidad de cribar rápidamente agentes o condiciones que potencien la infectividad y/o replicación vírica es particularmente útil en el contexto de desarrollar u optimizar la producción de vectores víricos. A la inversa, la capacidad de cribar rápidamente agentes o condiciones que repriman la infectividad/replicación vírica es bastante útil en el contexto de identificación de productos terapéuticos antivíricos.

Ejemplo 5

Desarrollo de cultivos de suspensión para producir virus auxiliares

50

[0205] El ejemplo precedente muestra que los niveles de adenovirus termosensibles producidos por técnicas de cultivo convencionales son bajos. Esto limita la capacidad de usar adenovirus termosensibles como auxiliares en la producción de vectores de AAV. El presente ejemplo proporciona un procedimiento mejorado que permite la producción de adenovirus termosensibles en cantidades mucho mayores. Es crucial para la mejora el uso de células hospederas cultivadas en cultivo en suspensión.

[0206] N3S de 293 y S3 de HeLa son variantes en suspensión de las líneas celulares de riñón embrionario humano 293-1 y carcinoma epitelioide humano HeLa respectivamente. Se efectuó el cultivo en suspensión en matraces de agitación de 500 ml (Bellco) con volúmenes de trabajo de 250 a 300 ml. Las células S3 de HeLa (ATCC 2.2-CCL) se mantuvieron en DMEM/F-12 con HEPES 15 mM suplementado con 7,5% de FBS y L-glutamina 2,0 mM. Las N3S de 293-1 (Microbix Biosystems Inc.) se sometieron a pases con Joklik MEM suplementado con 7,5% de FBS y L-glutamina 2,0 mM. Se agitaron los matraces de agitación a 50-65 rpm.

[0207] Se evaluó el rendimiento del crecimiento en el siguiente experimento. Se sometieron a pases en serie N3S de 293 y S3 de HeLa en suspensión en matraces de agitación de 500 ml duplicados y se monitorizó el crecimiento y viabilidad celular. Se inocularon los matraces a densidades celulares de 2 a 5×10^5 células/ml y se

65

cultivaron entonces durante 2 a 3 días. Para controlar las diferencias de densidad de siembra, se compararon los niveles de duplicación de población (NDP) para los cultivos duplicados. El NDP medio fue de $2,0 \pm 0,49$ (media de 6 DE) y de $1,1 \pm 0,62$ para S3 de HeLa y N3S de 293, respectivamente ($n= 14$). Las duplicaciones celulares mayores se observaron consistentemente con las células S3 de HeLa. La morfología celular en suspensión era drásticamente diferente para las dos líneas. Las células HeLa crecían como células individuales o agregados pequeños. En contraposición, las células N3S de 293 formaban agregados grandes de 50 a 100 células cada uno. Se observaron números significativos de células no viables en el centro de grandes agrupaciones. Se subcultivaron las disoluciones madre mediante centrifugación seguida de disgregación suave con una pipeta, liberando las células no viables de los agregados. Las viabilidades de cultivo iniciales de N3S de 293 eran consistentemente menores en comparación con S3 de HeLa.

[0208] Basándose en el crecimiento, viabilidad y morfología celular en suspensión, se seleccionó la línea celular S3 de HeLa para un desarrollo adicional del proceso. Se evaluaron crecimiento y viabilidad a temperaturas permisivas. Se sembraron células S3 de HeLa en matraces de agitación de 500 ml a 5×10^5 células/ml y se monitorizaron diariamente durante 7 días.

[0209] La **Figura 5** muestra la densidad de células viables (DCV) de células S3 de HeLa, crecidas a 32°C (cuadrados) y 37°C (círculos). Las barras alrededor de los puntos temporales a 32°C indican el intervalo de valores observados en matraces de agitación de 500 ml duplicados. Las células crecidas a 37°C alcanzaban el máximo de $2,5 \times 10^6$ células/ml el día 5, mientras que las células crecidas a 32°C alcanzaban el máximo de 2×10^6 células/ml el día 6. La viabilidad (determinada mediante exclusión con azul de tripano) era al menos aproximadamente de un 90% en total.

[0210] La filtración por flujo tangencial o flujo cruzado es una técnica versátil para una amplia variedad de aplicaciones biofarmacéuticas a gran escala, incluyendo la concentración o retirada de células, la concentración de macromoléculas e intercambio de medios/tampón. El procesamiento por flujo tangencial es necesario para concentrar células para infección y para recolectar células infectadas a gran escala.

[0211] Se evaluó el efecto del cizallamiento laminar sobre la viabilidad celular en filtración por flujo tangencial concentrando y diafiltrando las células S3 de HeLa. Se inocularon las células HeLa S3 a una densidad de 4×10^5 células/ml en biorreactores Applilon de 3 l y se cultivaron a 2×10^6 células/ml en DMEM/F-12 con HEPES 15 mM (JRH) suplementado con 7,5% de FBS, glutamina 2,0 mM, 1 x aminoácidos MEM, 1 x aminoácidos no esenciales MEM, 0,1% de poliol Pluronic F-68 y glucosa 2 g/l. El volumen de trabajo del biorreactor era de 2 l. Se controlaron el oxígeno disuelto, pH, temperatura y agitación a 60% (respecto a la saturación del aire), 7,2, 37°C y 100 rpm, respectivamente, usando el sistema controlador FERMCÓN™ (Scius Corporation).

[0212] Se efectuaron los experimentos de flujo tangencial con membranas de fibra hueca de celulosa mixta (Microgon). El tamaño de poro y área superficial eran de $0,2 \mu\text{m}$ y 725 cm^2 , respectivamente. Se seleccionó un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ para retener las células dejando pasar los medios agotados. Se bombearon las células (Cole Palmer) a través del diámetro interno de las fibras huecas. Se ajustaron las velocidades de recirculación para proporcionar tasas de cizallamiento de pared medias de 750 y 1500 s^{-1} . Una vez establecido el flujo cruzado, se consiguió un control de flujo permeado de 30 y 90 ml/min, respectivamente, con una bomba (Cole Palmer) localizada en la línea de permeado. Durante la concentración celular, continuó la extracción de permeado hasta que se alcanzó la concentración deseada en veces. Durante la diafiltración, se activó la alimentación de medios que entran en el biorreactor hasta que se alcanzó el intercambio de medio deseado en veces. Se contaron las células viables antes y después de cada tratamiento.

[0213] La **Figura 6** muestra las curvas de crecimiento de células S3 de HeLa antes y después del procesamiento por flujo tangencial en un experimento ejemplar. Se cultivaron 2 l de células en biorreactores de 3 l. El día 3 (flecha), se concentraron las células 7 veces a partir del volumen de trabajo de 2 l diafiltrado frente a 6 volúmenes de medio de crecimiento y se llevaron al volumen de trabajo original. Los resultados muestran que las células no se dañaron por un cizallamiento de pared de 750 s^{-1} (cuadrados) ni 1500 s^{-1} (círculos) y siguieron creciendo a altas densidades celulares.

[0214] Se ensayaron entonces los cultivos en suspensión de células S3 de HeLa como células hospedadoras para la producción de ts149, o se investigó su capacidad en cultivo en suspensión de 300 ml. Se centrifugaron células S3 de HeLa de cultivo en suspensión de 300 ml (1×10^6 células/ml), se concentraron y se infectaron con ts149 (MOI = 3). Después de 1 hora, se transfirió el cultivo a un matraz de agitación, se resuspendió en medios y se cultivo durante 7 días a 32°C. Las células S3 de HeLa siguieron creciendo desde aproximadamente 1×10^6 células/ml en el momento de infección hasta aproximadamente 2×10^6 células/ml el día 5. La viabilidad se redujo a ~60% el día 7.

[0215] La **Figura 7** muestra la producción de ts149 por cultivos de células S3 de HeLa. Se muestreó diariamente el cultivo y se prepararon lisados mediante liofilización para análisis de la producción vírica por el ensayo de infectividad de adenovirus. La producción de virus alcanzó $\sim 4,5 \times 10^7$ UI/ml de cultivo aproximadamente el día 3-5. El día 7, se recogieron las células mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón TMEG y se

lisaron mediante microfluidificación (MF). El título infeccioso del lisado microfluidificado era comparable con los de la muestra de lisado liofilizada, indicando que la recuperación mediante microfluidificación era comparable con los procedimientos de liofilización.

5 Ejemplo 6

Procedimiento de purificación mejorado para la producción de un virus auxiliar termosensible (Ad ts149)

10 [0216] A purificación usando gradientes de CsCl es costosa para la producción a gran escala. Este ejemplo ilustra la purificación de ts149 mediante cromatografía de intercambio iónico.

15 [0217] Se efectuó la cromatografía en una estación de trabajo de cromatografía Perseptive Biosystem BIOCAD™. La resina usada era un intercambiador aniónico débil de polietilenimina (PI) (POROS™ 50 PI). Se equilibró la columna con TMEG (Tris 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, 5% de glicerol). Se monitorizó la cromatografía en línea para pH, conductividad y densidad óptica a 280 nm.

20 [0218] Se recolectó la suspensión de S3 de HeLa infectadas con ts149 a una MOI de 2 y se centrifugó. Se resuspendió el sedimento en TMEG y se lisó mediante cavitación a 20,7 MPa usando un microfluidificador (Microfluidics). Se clarificó el lisado mediante filtración a través de un filtro de jeringuilla de 5 µm (Millex SV) seguido de un filtro de jeringuilla de 0,45 µm (Acrodisc). Se cargó el lisado clarificado en una columna de intercambio aniónico POROS™ 50 PI de 1,6 ml procesada a 1 ml/min. Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de TMEG con NaCl 900 mM y se eluyó el ts149 con un gradiente lineal de NaCl 900 a 1300 mM. Se recogieron las fracciones de 0,5 ml y se ensayó mediante el ensayo de infectividad y transferencia por ranuras la presencia de adenovirus.

25 [0219] La **Figura 8** muestra los resultados del ensayo de infectividad realizado en fracciones de columna consecutivas. La mayoría del adenovirus infeccioso se encontró en las fracciones 26 a 28, coincidentes con el pico de absorbancia que eluye a aproximadamente 100 ms aproximadamente a los 25 minutos. El ts149 eluyó justo antes del pico grande a mayor concentración salina. Los ensayos de infectividad y transferencia por ranuras realizados en paralelo confirmaron que las partículas y virus infecciosos estaban en las mismas fracciones de pico.

30 [0220] Se ensayó también en lisado y fracciones de pico de PI la proteína total mediante el procedimiento de Bradford. La concentración de proteína era de 1,8 mg/ml en el lisado y de menos de 30.0 µg/ml en el conjunto de PI. Se separaron los viriones de la mayoría de la proteína celular en una sola etapa y se eluyeron como un solo pico. Los viriones mostraron una afinidad muy alta por la matriz de PI, como se evidencia por la concentración salina relativamente alta necesaria para eluirlos de la columna.

40 [0221] Los procedimientos a gran escala para virus auxiliares termosensibles pueden incorporar todas las mejoras descritas en estos ejemplos. En una ilustración, la producción de virus comprendería las siguientes etapas:

- Cultivo celular en un biorreactor en suspensión
- Concentración/intercambio de medio
- Infección con virus auxiliar
- Producción de virus
- 45 • Recolección: concentración/diafiltración
- Lisis por microfluidificación
- Cromatografía de intercambio iónico en PI
- Concentración/diafiltración
- Esterilización por filtración

50 [0222] Este tipo de enfoque es inherentemente escalable y susceptible de las Buenas Prácticas de Fabricación actuales.

55 [0223] Se proporcionan a continuación ilustraciones ejemplares adicionales de dichas técnicas.

Ejemplo 7

Comparación de procesos de primera y segunda generación para la producción de virus auxiliares

60 A. Producción y procesamiento ilustrativos de primera generación de virus auxiliar

65 [0224] En un proceso ejemplar "de primera generación" para la producción de virus auxiliar, crecieron células de mamífero en 40 matraces T225 y se infectaron entonces con Ad5 a una MOI de aproximadamente 1. Después de incubar, se recolectaron las células mediante centrifugación y se lisaron mediante liofilización y pase a través de una aguja. Se sometió el lisado a tratamiento con ADNasa I y se procesó entonces en un gradiente de etapas de CsCl y un gradiente isopícnico. Se dializó el material purificado y se esterilizó por filtración.

[0225] Usando este proceso de primera generación, se obtuvieron aproximadamente 1×10^{12} partículas (o aprox. 1×10^{11} unidades infecciosas) a partir de 4×10^8 células.

5 B. Producción y procesamiento ilustrativos de segunda generación de virus auxiliar

[0226] En un proceso ejemplar “de segunda generación” para la producción de virus auxiliar, crecieron células de mamífero (S3 de HeLa) en biorreactores de 10 l y se infectaron entonces con Ad5 (de ATCC, purificado en placa posteriormente en células 293, propagados en serie en células HeLa S3 y purificados doblemente por centrifugación en gradiente de CsCl) a una MOI de aproximadamente 1. Después de incubar, se concentraron las células, se recolectaron mediante diafiltración y se lisaron mediante microfluidificación. Se sometió el lisado a tratamiento con benzonasa (nucleasa) y entonces se filtró. Se procesó entonces el filtrado en una columna de intercambio aniónico (PI), se concentró, se diafiltró y finalmente se esterilizó por filtración.

15 [0227] Usando este proceso de segunda generación, se obtuvieron aproximadamente 1×10^{14} partículas (o aprox. 5×10^{12} unidades infecciosas) a partir de 1×10^{10} células.

[0228] La **Figura 9** ilustra los resultados del procesamiento posterior de virus auxiliar usando cromatografía de intercambio aniónico como se describe anteriormente. Barras: actividad vírica medida en un ensayo de infectividad, línea continua: A_{280} , línea de puntos: conductividad del tampón (ms).

[0229] Como resulta evidente de la comparación del fraccionamiento de la actividad vírica frente a la absorbancia A_{280} , estos procedimientos de procesamiento daban como resultado una separación sustancial del virus auxiliar del grueso de los materiales contaminantes que se esperaba que contuviesen proteínas y ácidos nucleicos celulares.

Ejemplo 8

30 Comparación de los procesos de primera y segunda generación para la producción de vectores de AAV recombinantes

A. Producción y procesamiento de AAVr ilustrativos de primera generación

[0230] En un proceso ejemplar “de primera generación” para la producción de vector de AAVr, crecieron células de mamífero en 40 matraces T225 y se infectaron entonces con Ad5 a una MOI de aproximadamente 5. Después de incubar, se recolectaron las células mediante centrifugación y se lisaron mediante sonicación. Se sometió el lisado a tratamiento con ADNasa 1 y se procesó entonces en una serie de dos gradientes de CsCl. Se dializó el material purificado y se esterilizó por filtración. Usando este proceso de primera generación, se obtuvieron aproximadamente 5×10^6 unidades replicativas UR a partir de 4×10^8 células.

B. Producción y procesamiento de AAVr ilustrativos de segunda generación

[0231] En un proceso ejemplar “de segunda generación” para la producción de vector de AAVr, crecieron células de mamífero en biorreactores de 10 l y se infectaron entonces con Ad5 a una MOI de aproximadamente 5. Después de incubar, se concentraron las células, se recolectaron mediante diafiltración y se lisaron mediante microfluidificación. Se sometió el lisado a tratamiento con benzonasa (nucleasa) y entonces se filtró. Se procesó entonces el filtrado en una columna de intercambio aniónico, seguida de una columna de intercambio catiónico. Se agruparon las fracciones de eluyente que contenían AAV, se concentraron, se diafiltraron y finalmente se esterilizaron por filtración. Este proceso de segunda generación se espera que proporcione más de 1×10^{11} unidades replicativas UR a partir de 1×10^{10} células.

[0232] La **Figura 10** muestra los resultados del fraccionamiento secuencial en columnas de intercambio iónico: en primer lugar, en una matriz de intercambio aniónico (panel superior) y entonces en una matriz de intercambio catiónico (panel inferior). Barras: actividad vírica medida en un ensayo de infectividad para adenovirus o AAV, línea continua: A_{280} (una medida de la proteína total), línea de puntos: conductividad del tampón (ms). Como resulta evidente por las fracciones analizadas, es posible obtener niveles extremadamente altos de separación entre AAV y adenovirus, así como entre AAV y material absorbente de A_{280} (mayormente proteínas) usando las técnicas de la presente invención. En particular, los resultados revelaron que los vectores de AAV pueden retenerse tanto en columnas de intercambio aniónico como catiónico y que la elución diferencial de AAV usando intercambio tanto aniónico como catiónico daba como resultado una capacidad potenciada drásticamente de separar AAV de todos los contaminantes principales de interés (incluyendo adenovirus así como proteínas celulares).

[0233] En otro proceso ejemplar de segunda generación para la producción de vector de AAVr, se preparó el filtrado como se describe anteriormente y se procesó entonces en una columna de intercambio aniónico, seguida de agrupamiento de las fracciones eluyentes que contienen AAV, y se sometieron entonces los eluyentes de intercambio aniónico agrupados a filtración por flujo tangencial (FFT). Como se describe a continuación, se encontró

que este procedimiento de intercambio aniónico a FFT daba como resultado una preparación altamente concentrada y purificada de AAV.

[0234] Un análisis detallado del AAV obtenido usando dicha tecnología de segunda generación, usando técnicas como se describen anteriormente y en la materia (incluyendo ensayos de infectividad, análisis de transferencia por ranuras y electroforesis en gel con SDS) proporcionó la confirmación adicional de que el material era de alta calidad y estaba sustancialmente exento de partículas adenovíricas contaminantes (y proteína y ADN adenovíricos) y también sustancialmente exento de proteínas y ADN celulares contaminantes. Los gels de SDS revelaron la presencia de bandas correspondientes a VP1, VP2 y VP3 (concretamente, las proteínas de cápsida de AAV). No eran visibles otras bandas después de tinción con Coomassie. Estos datos son consistentes con los resultados de los análisis de fraccionamiento de columna como se exhiben en las Figuras 10-11.

[0235] Como procedimiento de intercambio aniónico a FFT ilustrativo, el siguiente es un proceso de purificación y concentración ejemplar que parte de 1 l de fracciones agrupadas de cromatografía de intercambio aniónico. Si se desea (como se observa anteriormente), este conjunto puede someterse a inactivación térmica seguida de una etapa de filtración (usando, por ejemplo, un filtro de 0,22 µm). Para la filtración por flujo tangencial (FFT), se empleó un sistema Pellicon XL esterilizado equipado con una membrana de corte de peso molecular de 300.000 que funcionaba a 40/0 para presiones de entrada y salida. Se cargó 1 l de material agrupado en el sistema a un volumen de 500 ml y se concentró entonces a 250 ml. Se efectuó la diafiltración con 5 diavolúmenes (1250 ml) de disolución de Ringer modificada + 5% de glicerol. Después de la diafiltración, se concentró el retenido a un volumen final de 14 ml. El tiempo de proceso total era de aproximadamente 3,25 horas (no incluyendo el tiempo de esterilización). Los gels de SDS teñidos con plata, las transferencias por ranuras y los ensayos de infectividad confirmaron que la preparación de AAV (que contenía aproximadamente 10^{10} unidades replicativas) estaba sustancialmente exenta de adenovirus contaminantes así como de proteínas adenovíricas y celulares.

[0236] Los siguientes son resultados de dicho procedimiento que muestran el título vírico infeccioso y total como UR (unidades replicativas) y PRA (partículas resistentes a ADNasa) respectivamente:

FFT de 300 K	Volumen	UR totales	PRA totales	P/I	% de UR	% de PRA
Conjunto de entrada	1000 ml	$8,9 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{14}$	3483	100	100
Producto bruto purificado	12,5 ml	$7,3 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{14}$	3103	82	74

[0237] Los datos presentados en la Figura 12 ilustran los resultados de una rutina de producción de AAV que usa filtración por flujo tangencial después de una columna de intercambio aniónico. Se concentró material purificado en la columna POROS 50 PI usando una membrana de corte de peso molecular de 300.000 (Millipore Pellicon XL). Se diafiltró el material concentrado con 5 volúmenes sucesivos de disolución salina equilibrada de Ringer + 5% de glicerol. Se concentró entonces el material en la membrana 10 veces. La Figura 12, una reproducción semitónica de un gel de poliacrilamida-SDS teñido con una tinción de plata, muestra las proteínas de cápsida de AAV altamente purificadas VP1 (85 kDa), VP2 (72 kDa) y VP3 (62 kDa) en un material bruto purificado final.

[0238] Como resulta evidente por los datos presentados en la presente memoria, estas técnicas de segunda generación para la preparación y purificación de AAV dan como resultado procedimientos sustancialmente mejorados en comparación con los descritos anteriormente.

[0239] Se detallan en la siguiente tabla los medios ejemplares para el crecimiento de auxiliar de adenovirus y para preparar AAVr:

[0240]

TABLA 2:

	Medio de Ad	Medio de AAVr
SALES INORGÁNICAS		
CaCl	116,61	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00125	0,00125
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,05	0,05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,417	0,417
KCl	311,8	311,8
MgCl ₂	28,61	
MgSO ₄	48,84	
NaCl	*	*
NaHCO ₃	2200	2200
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	62,5	62,5
Na ₂ HPO ₄	71,02	71,02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,4315	0,4315
OTROS COMPONENTES		
glucosa	4500	4500
HEPES	3575	3575
hipozantina de Na	2,39	2,39
ácido linoleico	0,042	0,042
ácido lipoico	0,105	0,105
sal de sodio de rojo fenol		
OTROS COMPONENTES		
putrescina·2HCl	0,081	0,081
piruvato de sodio	55	55
poliol Pluronic F-68	100	100
AMINOÁCIDOS		
L-alanina	4,455	4,455
L-arginina·HCl	273,9	273,9
L-asparagina·H ₂ O	22,5	22,5
L-ácido aspártico	19,95	19,95
L-cisteína·HCl·H ₂ O	17,56	17,56
L-cistina·2HCl	52,29	52,29
L-ácido glutámico	22,05	22,05
L-glutamina	657	657
glicina	26,25	26,25
L-histidina·HCl·H ₂ O	73,48	73,48
L-isoleucina	106,97	106,97
L-leucina	111,45	111,45
L-lisina·HCl	163,75	163,75
L-metionina	32,34	32,34
L-fenilalanina	68,48	68,48
L-prolina	17,25	17,25
L-serina	36,75	36,75
L-treonina	101,05	101,05
L-triptófano	19,22	19,22
L-tirosina	91,79	91,79
L-valina	99,65	99,65
VITAMINAS		
d-biotina	0,00365	0,00365
D-pantotenato de Ca	2,24	1,00
cloruro de colina	8,98	8,98
ácido fólico	2,65	2,65
miocinositol	12,6	12,6
niacianamida	2,0185	2,0185
piridoxal·HCl	2	2
piridoxina·HCl	0,031	0,031
riboflavina	0,219	0,219
tiamina·HCl	2,17	2,17
timidina	0,365	0,365
vitamina B12	0,68	0,68

*añadir una cantidad apropiada de NaCl para osmolalidad a 300 mOsm (\pm 20 mOsm)

C. Purificación de vector de AAV usando cromatografía de sulfato de heparina

[0241] Como se examina anteriormente, las técnicas cromatográficas pueden emplearse para purificar
5 adicionalmente y concentrar preparaciones de AAV de acuerdo con la presente divulgación que incluye la presente
invención. A modo de ilustración, una preparación de AAV que está en forma bruta (por ejemplo lisado) o que se ha
eluido de una columna de intercambio aniónico o intercambio catiónico y/o concentrado mediante filtración por flujo
tangencial puede purificarse mediante unión con una columna que comprende sulfato de heparina. El AAV puede
10 eluirse entonces de dicha columna usando un tampón que contiene una sal (por ejemplo, un gradiente lineal de
NaCl).

[0242] Como ilustración del uso de cromatografía de sulfato de heparina, se concentró el AAV obtenido de un
conjunto de "PI" (como se describe a continuación en el Ejemplo 9) en primer lugar cuatro veces y se diafiltró con
TMEG + NaCl 100 mM usando una membrana de filtración por flujo tangencial de 300K. Se inyectó entonces el
15 concentrado en una columna de sulfato de heparina de 1 ml (columna de Pharmacia "Hi-Trap Heparin") y se eluyó
usando un gradiente lineal de NaCl.

[0243] La **Figura 13** es un cromatograma que muestra la concentración resultante de AAV en la columna de
sulfato de heparina. El pico estrecho de absorbancia a 280 nm (eje izquierdo) a aproximadamente 18 minutos de
20 tiempo de elución representa la fracción de AAV eluida de sulfato de heparina con un gradiente lineal de NaCl 0 a 1
M (la conductividad se muestra en ms en el eje derecho).

Ejemplo 9

25 Producción y ensayo de vector de AAV recombinante

[0244] En otro grupo de rutinas de producción, se usaron $3-4 \times 10^9$ células crecidas en un Cell Factory,
usando DMEM + 10% FBS como medio de crecimiento. Se infectaron las células con Ad a una MOI de
aproximadamente 20 y se recolectaron a las 72 horas después de la infección. Se suspendieron las células
30 recolectadas en TMEG + NaCl a una concentración de aproximadamente 5×10^6 células/ml. Después de lisis
mecánica (microfluidificación, 2 pases a 55,16 MPa), se trataron los lisados con benzonasa (25 unidades/ml, 37°C, 1
hora) y se filtraron entonces a través de un filtro de 5 μ m (Pall Profile II).

[0245] Como columna de intercambio aniónico ejemplar, se empleó la columna POROS 50 PI (disponible en
35 Perseptive Biosystems). Brevemente, se cargó el filtrado en la columna en aproximadamente 100 ml y se eluyó
entonces con un gradiente de NaCl 500 mM. Se recogieron las fracciones que se determinó que contenían (por
ensayo de infectividad) la mayoría del AAV y se agruparon (designado como "conjunto de PI").

[0246] Se diluyó entonces el conjunto de PI aproximadamente a 1:7 con TMEG, se cargó en una columna
40 Toso Haas SP650C y se eluyó con un gradiente de NaCl 500 mM. Se recogieron las fracciones que se determinó
que contenían (por ensayo de infectividad) la mayoría del AAV y se agruparon (designado como "conjunto de SP").
Se concentró el conjunto de SP usando un filtro Centriprep 10K y se esterilizó entonces por pasada a través de un
filtro de 0,2 μ m.

[0247] Los resultados revelaron que el AAV recombinante estaba esencialmente exento de adenovirus
45 infecciosos detectables (determinado por el análisis de límite de detección con amplificación en serie de células 293
y el ensayo de TCID₅₀). La preparación estaba también esencialmente exenta de ADN adenovírico (determinado por
análisis de transferencia por ranuras), esencialmente exenta de proteínas celulares (determinado por análisis de gel
de PAGE-SDS), de ADN celular (determinado por análisis de PCR) y que estaba también esencialmente exenta de
50 AAV de tipo fenotípicamente silvestre (determinado mediante amplificación en serie y análisis Southern).

Ejemplo 10

55 Potenciación de la producción de AAV por estrés nutricional

[0248] Como se examina anteriormente, se cree que la producción de AAV puede potenciarse usando
cualquiera de una variedad de agentes y/o condiciones que estresan eficazmente (o desoptimizan) el crecimiento o
metabolismo de células productoras de AAV. En este ejemplo, se muestra que el agotamiento de ciertos
aminoácidos que ocurre durante el cultivo está asociado a una potenciación relativa de la producción de AAV y, a la
60 inversa, que los suplementos de medios para retirar el estrés nutricional dan como resultado realmente una drástica
reducción del rendimiento de vector.

(a) Estrés nutricional durante el cultivo por lotes y por perfusión

[0249] Se inocularon células JL14 a aproximadamente 4×10^5 células/ml en biorreactores de 2 l y crecieron en el medio de AAVr mostrado en la Tabla 2 en modo por lotes o por perfusión (usando filtración por filtro tangencial, día 1 a 0,4 volúmenes/día, días 2-3 a 1-2 vol./día, día 4 a 2 vol./día y día 5 a 4 vol./día). Se monitorizaron en los cultivos la densidad celular, glucosa, lactato y aminoácidos usando técnicas estándares.

5

[0250] Los análisis revelaron que la densidad celular alcanzaba un máximo en el cultivo por lotes de 1×10^6 células/ml el día 2 y en el cultivo por perfusión de 8×10^6 células/ml el día 6. La glucosa no era limitante en ningún caso (>1 g/l) y el lactato no era inhibidor.

10 **[0251]** Sin embargo, el análisis de aminoácidos reveló que tanto glutamato como aspartato se agotaban rápidamente en ambos cultivos por lotes y por perfusión, como se muestra en las siguientes tablas:

TABLA 3:

Análisis de aminoácidos del medio de cultivo por LOTES (transcurso temporal- $\mu\text{mol/l}$)						
	PM	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Ácido aspártico	133	96	10	4	9	7
Treonina	119	687	644	606	552	533
Serina	105	271	230	157	117	98
Asparagina	132	130	113	96	68	69
Ácido glutámico	147	90	2	1	1	1
Glutamina	146	3424	2987	2450	1989	1843
Prolina	115	135	143	162	164	185
Glicina	75	288	241	194	151	130
Alanina	89	189	306	438	644	681
Valina	117	692	631	518	417	342
Cistina	121	143	133	120	107	99
Metionina	149	160	132	100	74	58
Isoleucina	131	617	531	383	264	182
Leucina	131	645	538	374	248	161
Tirosina	181	407	379	355	329	315
Fenilalanina	165	323	289	259	231	214
Triptófano	204	47	41	33	28	26
Amoniaco	17	760	816	941	1021	1033
Ornitina		71	89	110	128	144
Lisina HCl		572	521	463	415	384
Histidina	155	276	257	243	229	211
Arginina	174	1020	943	870	791	747

15

TABLA 4:

Análisis de aminoácidos del medio de cultivo por PERFUSIÓN (curso temporal- $\mu\text{mol/l}$)								
	PM	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Ácido aspártico	133	95	12	5	10	10	10	10
Treonina	119	709	691	560	596	651	641	657
Serina	105	281	264	147	156	180	199	185
Asparagina	132	130	124	75	78	109	119	119
Ácido glutámico	147	88	1	0	1	1	1	0
Glutamina	146	3525	3299	2517	2640	2906	2986	3082
Prolina	115	145	165	163	174	177	157	171
Glicina	75	304	267	189	205	217	227	230
Alanina	89	190	340	341	384	423	333	330
Valina	117	678	635	485	500	532	551	561
Cistina	121	141	136	112	118	123	119	118
Metionina	149	157	133	91	99	107	108	107
Isoleucina	131	616	543	369	401	430	432	442
Leucina	131	649	554	364	400	430	438	444
Tirosina	181	413	398	328	355	379	373	386
Fenilalanina	165	336	16	244	268	291	287	292
Triptófano	204	58	47	36	41	48	44	47
Amoniaco	17	831	1182	956	1202	1219	931	990
Ornitina		42	97	74	115	112	56	44
Lisina·HCl		718	651	528	594	643	617	628
Histidina	155	284	310	223	243	262	266	265
Arginina	174	1058	948	826	901	978	974	1016

(b) Estrés nutricional asociado a una producción potenciada de AAV

5

[0252] Se efectuaron estudios de seguimiento para confirmar la importancia de la escasez relativa de glutamato y aspartato en los medio de cultivo. Se tomaron células JL 14 de un matraz de agitación y se dividieron en dos grupos. Se inoculó cada grupo con 3×10^9 unidades infecciosas de 170-37 Ad5. Se resuspendió un grupo de células a 10^6 células/ml en medio de AAVr (Tabla 2) que contenía 10% de FBS y 1% de L-glutamina (300 ml). Se resuspendió el otro en medio de AAVr que contenía 10% de FBS, 1% de L-glutamina, ácido aspártico 10 mg/l y ácido glutámico 110 mg/l.

10

[0253] Se incubó cada grupo a 37°C durante 72 horas en un matraz de agitación. Se recolectaron las células, se microfluidificaron dos veces a 55,16 MPa, se sometieron a benzonasa, se sembraron en un ensayo de infectividad, se recolectaron y sondearon.

15

[0254] Los resultados mostraron que el matriz de agitación de control producía 6,2 UR por célula. El matraz de agitación suplementado con ácidos aspártico y glutámico producía 0,94 UR por célula.

20 **[0255]**

Esto indica que cuando se evita el agotamiento de los ácidos aspártico y glutámico proporcionando estos aminoácidos en exceso, se compromete la producción de AAVr debido a la incapacidad de someter las células a estrés nutricional.

25 **[0256]**

Se efectuaron ensayos adicionales usando una línea celular D6 derivada de HeLa que tiene un vector de AAVr integrado (RTI)-(promotor de CMV)-(gen informador de β -gal)-RTI), así como copias de los genes *rep* y *cap* de AAV de tipo silvestre.

30 **[0257]**

Se sembraron las células a 5×10^6 células por matraz T-225 en 30 ml de DMEM completo (10% de FBS, L-glutamina 2 mM) y se incubaron a 37°C en 10% de CO_2 durante 2 días, tras de lo cual las células alcanzaron una densidad de 2×10^7 células por matraz. Se infectaron células en dos matraces duplicados con Ad5 a una MOI de 10. Un matraz contenía DMEM completo, el otro contenía DMEM completo suplementado con 5 x ácido aspártico y ácido glutámico. Se recolectaron las células y se contaron después de 72 horas de cultivo.

35 **[0258]**

El DMEM completo proporcionó $2,6 \times 10^7$ células con 88% de viabilidad. El medio suplementado con aspartato/glutamato proporcionó $3,8 \times 10^7$ células con 91% de viabilidad. Se resuspendieron las células, se sometieron a sonicación, se trataron con benzonasa (25 U/ml), se clarificaron y se ensayaron mediante análisis de transferencia por ranuras.

40 **[0259]**

Los resultados fueron los siguientes: se produjo virus D6 en DMEM completo (no suplementado) a $1,8 \times 10^{10}$ PRA/ml (1800 PRA por célula). Se produjo virus D6 en DMEM suplementado con aspartato/glutamato a $1,4 \times 10^9$ PRA/ml (140 PRA/célula).

Ejemplo 11

Producción de vector de AAV recombinante bajo estrés sérico

5 **[0260]** Como ejemplo de la producción de AAVr bajo condiciones de estrés, se ha usado el estrés por suero reducido junto con técnicas como se describen anteriormente. Brevemente, crecieron células JL 14 en matraces de agitación en DMEM modificado + 10% de FBS en modo de cultivo en serie continuo, y se dividieron cada 3-4 días. Se dispusieron las células del cultivo en suspensión en 16 dispositivos Cell Factory de Nunc de 10 apilamientos, a 3 x 10⁸ células/dispositivo Factory en una rotación de 3 a 4 días. El medio usado para crecimiento tenía una reducción de 10 veces del suero (concretamente, DMEM + 1% de FBS), colocando así a las células bajo estrés sérico.

15 **[0261]** A las 24 horas después de la siembra, se retiró el medio en los dispositivos y se añadió medio reciente que contenía 3 x 10⁹ unidades de Ad/ml. Después de 72 horas de cultivo a 37°C, se desalojaron las células de los dispositivos Factory mediante golpeteo suave, se recolectó el medio que contenía células y se sedimentaron las células, se resuspendieron en TMEG + NaCl 100 mM y se lisaron entonces mediante pase a través de un microfluidificador a 55,16 MPa. Se clarificó el lisado a través de un filtro de 5 µm y se cargó el lisado clarificado en una columna de intercambio aniónico de PI de 500 m. Se eluyó la columna con un gradiente creciente de NaCl (hasta 500 mM) en tampón TMEG. Se recogieron las fracciones y se ensayaron usando un ensayo de clon 37 como se describe por Allen y col. (WO96/17947, supra). Se agruparon entonces las fracciones que contenían la mayoría del vector de AAV y se concentraron 10 veces usando un concentrado centrífugo Centriprep a 1000 x g durante 30 minutos. Se dializó el material concentrado frente a disolución salina equilibrada de Ringer con 5% de glicerol y se almacenó a -70°C. Se ensayó el AAV mediante el ensayo de clon 37, así como mediante transferencia por ranuras y PAGE-SDS. En el material puede ensayarse también la presencia de adenovirus, proteínas adenovíricas y ADN celular, así como otros contaminantes potenciales.

30 **[0262]** La **Figura 11** muestra los resultados obtenidos usando células productoras GAK-0003 establecidas en matraces T-225 a 10⁷ células por matraz e inoculadas el día 2 con adenovirus DAB-003 a una MOI de 10. Se cultivaron diferentes matraces durante 72 horas a 37°C en DMEM reciente que contenía un porcentaje diferente de FBS, como se muestra en la figura. El día 5, se recolectó cada matraz, se contaron las células, se resuspendieron, se sometieron a sonicación, a benzonasa y se sembraron para medir la producción de vector como anteriormente.

35 **[0263]** Se observó una producción óptima de vector a un porcentaje de FBS de 1%. Por consiguiente, se prefiere medio que sea deficiente en FBS (menos de 2,5%, preferiblemente menos de 2%, pero más de 0%) como condición para someter las células productoras a estrés sérico.

Ejemplo 12

Producción de vector de AAV recombinante bajo estrés de pH

40 **[0264]** Como ejemplo adicional de la producción de AAVr bajo condiciones de estrés, se usó el estrés de pH junto con técnicas como se describen anteriormente. Brevemente, crecieron células productoras de AAV en biorreactores como se describe anteriormente. Se infectaron entonces las células con Ad5 a una MOI de 10 y se inocularon en medios bajos en suero (como en el Ejemplo 11) en suspensión en biorreactores de 1,5 l. Se mantuvieron los cultivos a niveles de pH elevados (de 7,2 a 8,0). Se monitorizaron entonces en los cultivos diariamente el número de células, viabilidad, consumo de glucosa, producción de lactato, pH, osmolaridad y producción de AAV. Como se muestra a continuación, hubo un aumento de la producción de AAV cuando el pH se elevó a 7,4, acoplado con un aumento aún más drástico del número de partículas de AAV liberadas al sobrenadante (que aumentaba a medida que se elevaba el pH):

50

pH de cultivo	Partículas asociadas a célula	Partículas sobrenadante	en Partículas totales	% de asociadas	% de células sobrenadante
7,2	4,70 x 10 ¹²	1,90 x 10 ⁹	4,70 x 10 ¹²	100%	0%
7,4	6,50 x 10 ¹²	1,30 x 10 ¹³	1,95 x 10 ¹³	33	67%
7,6	3,40 x 10 ¹²	1,50 x 10 ¹³	1,84 x 10 ¹³	18%	82%
8,0	1,30 x 10 ¹²	1,50 x 10 ¹³	1,63 x 10 ¹³	8%	92%

55 **[0265]** En suma, a medida que crecía el pH se observó un fuerte aumento del número de partículas de AAV liberadas al sobrenadante y un desplazamiento del porcentaje de partículas en sobrenadante: asociadas a célula (de casi todas asociadas a célula a pH 7,2 a mayoritariamente en sobrenadante (92%) a pH 8,0). La capacidad de recuperar las partículas de AAV directamente del sobrenadante sin necesidad de lisar las células productoras representa una poderosa ventaja en términos de producción y purificación de AAV. El AAV aislado del sobrenadante usando estrés de pH puede concentrarse fácilmente y purificarse usando técnicas como se describen en la presente memoria (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y/o filtración por flujo tangencial).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de generación de una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr) que comprende las etapas de:
- 5 (a) incubar la célula productora de AAV en condiciones que sean permisivas para la replicación de AAV y que comprenden inducir un estrés subletal en la célula productora de AAV para potenciar el nivel de producción de AAV, en el que la célula productora de AAV es una célula de mamífero, y en el que dicha célula comprende:
- 10 (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en el que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV;
- (ii) un provector de AAV recombinante (AAVr) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (RTI); y
- 15 (iii) un virus auxiliar de AAV,
- (b) lisar la célula productora después de la incubación de la etapa a) para producir un lisado de célula productora de AAV; y
- 20 (c) purificar el lisado de célula productora de AAV para generar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (AAVr),
- en el que el estrés subletal se selecciona de:
- 25 (I) un estrés nutricional impuesto por uno o más de los siguientes:
- (i) cultivar la célula productora en un medio que sea deficiente en uno o más aminoácidos, opcionalmente ácido aspártico o ácido glutámico;
- 30 (ii) cultivar la célula productora en un medio que contenga menos de 10 $\mu\text{mol/l}$ de ácido aspártico;
- (iii) cultivar la célula productora en un medio que contenga menos de 2 $\mu\text{mol/l}$ de ácido glutámico; o
- 35 (iv) cultivar la célula productora en un medio que sea deficiente en suero; o
- (II) un estrés térmico impuesto al cultivar la célula productora durante 3-6 días a:
- (i) una temperatura menor que la temperatura de crecimiento óptima de la célula productora; o
- 40 (ii) una temperatura mayor que la temperatura de crecimiento óptima de la célula productora; o
- (III) un estrés osmótico impuesto:
- 45 (i) al cultivar la célula productora en un medio hipoosmótico; o
- (ii) al cultivar la célula productora en un medio hiperosmótico; o
- (IV) un estrés de pH, en el que el estrés de pH comprende someter la célula productora a un pH de
- 50 aproximadamente pH 7,2 continuamente durante el cultivo; o
- (V) un estrés tóxico, en el que el estrés tóxico comprende exponer la célula productora a un agente genotóxico seleccionado de un carcinógeno químico, radiación, UV, un inhibidor metabólico de la síntesis de ADN y un fármaco que afecte a las topoisomerasas.
- 55 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el estrés subletal es un estrés tóxico y el agente genotóxico es un inhibido metabólico de la síntesis de ADN seleccionado de hidroxurea, metotrexato y afidocolina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el estrés subletal es un estrés tóxico y el agente
- 60 genotóxico es un fármaco que afecta a topoisomerasas seleccionado de amsacrina, camptotecina, etopósido y novobiocina.
4. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las
- 65 reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa de purificación c) comprende someter a cromatografía el lisado de célula productora de AAV de la etapa b) mediante una pluralidad de cromatografías de intercambio iónico que comprenden al menos una cromatografía de intercambio aniónico cargada positivamente y al menos una

cromatografía de intercambio catiónico cargada negativamente, o someter a cromatografía el lisado de célula productora de AAV de la etapa b) mediante una cromatografía de intercambio aniónico seguida de filtración por filtro tangencial para generar una población purificada de partículas de vector de AAVr.

- 5 5. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho lisado de célula productora de AAV se purifica también por afinidad en una resina que tiene un ligando que es específico de una o más moléculas de superficie presentes en AAV, y en el que la purificación por afinidad se realiza opcionalmente después de una cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico y dicho ligando es opcionalmente un anticuerpo que es específico de una molécula de superficie presente en AAV.
- 10 6. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula productora de AAV de la etapa a) se concentra antes de la lisis, opcionalmente mediante centrifugación o mediante filtración por flujo tangencial.
- 15 7. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa de lisis de la célula productora de AAV se realiza sometiendo la célula a una técnica lítica seleccionada de microfluidificación, sonicación y liofilización.
- 20 8. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el lisado de célula productora de AAV de la etapa b):
- (i) se trata con una nucleasa, opcionalmente benzonasa, antes de la cromatografía; y/o
- 25 (ii) se clarifica antes de la cromatografía, opcionalmente mediante filtración o centrifugación.
9. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula productora de AAV se concentra antes de la lisis, se resuspende en un tampón que comprende disolución salina a una fuerza iónica de al menos una disolución de NaCl 50 mM, se lisa y se clarifica entonces mediante filtración antes de la cromatografía.
- 30 10. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 4 o cualquier reivindicación dependiente de la misma, en el que las fracciones cromatográficas que contienen partículas de AAVr se concentran mediante filtración o centrifugación después de elución de una cromatografía de intercambio iónico.
- 35 11. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 4 o cualquier reivindicación dependiente de la misma, en el que las fracciones cromatográficas que contienen partículas de AAVr se concentran mediante filtración por flujo tangencial después de elución de una cromatografía de intercambio iónico.
- 40 12. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 4 o cualquier reivindicación dependiente de la misma, en el que dicha cromatografía de intercambio aniónico se efectúa en una resina amino o imino N-cargada, opcionalmente seleccionada de una resina POROS 50 PI, una resina de dietilaminoetilo (DEAE), una resina de trimetilaminoetilo (TMAE), una resina de amina cuaternaria y una resina de polietilenoimina (PEI).
- 45 13. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 4 o cualquier reivindicación dependiente de la misma, en el que dicha cromatografía de intercambio catiónico se efectúa en una resina catiónica basada en azufre, fósforo o carboxilo, opcionalmente seleccionada de una resina de sulfato de heparina (HS), una resina de sulfopropilo (SP) y una resina de carboximetilo (CM).
- 50 14. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa a) de incubación de la célula productora se realiza en un recipiente seleccionado de un matraz de cultivo de tejido, un frasco giratorio, un matraz de agitación, un reactor en tanque, un fermentador tal como un fermentador de agitación de aire, un biorreactor tal como un biorreactor de fibra hueca, de lecho empaquetado o lecho fluidificado o un biorreactor multilecho en el que en el biorreactor multilecho se aíslan al menos 10^6 unidades replicativas de AAVr por litro de volumen de biorreactor.
- 55 15. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa a) de incubación de la célula productora se realiza usando un microportador.
- 60 16. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa a) de incubación de la célula productora se realiza durante al menos 5 días.
- 65

17. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 4 o cualquier reivindicación dependiente de la misma, en el que dicha población purificada de partículas de vector de AAVr contiene:
- 5
- menos de 1 AAV competente de replicación por 10^4 partículas de AAV;
 - no más de 10^3 partículas infecciosas de virus auxiliar por 10^8 unidades replicativas de partículas de AAVr;
- 10 - menos de un 5% de contaminación por virus auxiliar basada en proteína (p/p), detectada por análisis densitométricos de geles de SDS o mediante inmunoensayo de proteína específica de virus auxiliares, y
- menos de un % de contaminación por virus auxiliar o proteína celular (p/p), detectada por análisis densitométricos de geles de SDS o mediante inmunoensayo de virus auxiliares o proteínas específicas celulares.
- 15
18. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 4 o cualquier reivindicación dependiente de la misma, en que la elución de la cromatografía de intercambio aniónico y/o intercambio catiónico se realiza aumentando la concentración salina y los eluyentes cromatográficos que comprenden las partículas de AAVr se tratan posteriormente para reducir la concentración salina eficaz mediante
- 20 dilución, diálisis, diafiltración o concentración.
19. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente la etapa de someter una fracción que comprende partículas de AAV a cromatografía de sulfato de heparina.
- 25
20. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho provector de AAVr comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (RTI) de AAV.
- 30
21. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha célula productora de AAV comprende al menos un gen de empaquetamiento de AAV que se integra establemente en el genoma de dicha célula productora de AAV, preferiblemente un gen rep de AAV y un gen cap de AAV.
- 35
22. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha célula productora se proporciona mediante un proceso que comprende:
- 40
- (i) introducir el virus auxiliar en la célula productora en que ya se ha introducido el gen o genes de empaquetamiento de AAV y el provector de AAVr;
 - (ii) introducir el provector de AAVr y el virus auxiliar simultánea o secuencialmente en la célula productora en que ya se ha introducido el gen o genes de empaquetamiento de AAV; o
- 45
- (iii) introducir el gen o genes de empaquetamiento de AAV y el provector de AAVr simultánea o secuencialmente en la célula hospedadora en que ya se ha introducido el virus auxiliar.
23. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula productora se proporciona mediante un proceso que comprende
- 50 introducir en la célula productora al menos un gen de división-empaquetamiento de AAV.
24. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho virus auxiliar es un adenovirus, un adenovirus termosensible o adenovirus Ad-ts149.
- 55
25. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho virus auxiliar es un virus auxiliar termosensible y dicha etapa de incubación de la célula productora se realiza a una temperatura que es permisiva de replicación de AAV pero no permisiva de replicación del virus auxiliar termosensible.
- 60
26. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula productora es una línea celular de mamífero dependiente de unión, una línea celular de mamífero adaptada a suspensión, una célula N3S de 293 o una célula S3 de HeLa.
- 65
27. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de purificación c) comprende una combinación de una cromatografía de intercambio aniónico

cargada positivamente y una cromatografía de intercambio catiónico cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de AAVr.

28. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 27, en el que dicha cromatografía de intercambio aniónico cargada positivamente se efectúa antes de dicha cromatografía de intercambio catiónico cargada negativamente.

29. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 27, en el que dicha cromatografía de intercambio catiónico cargada negativamente se efectúa antes de dicha cromatografía de intercambio aniónico cargada positivamente.

30. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, que comprende adicionalmente la etapa de someter a cromatografía el lisado que contiene partículas de AAVr en sulfato de heparina, efectuándose dicha etapa después de dicha cromatografía de intercambio aniónico cargada positivamente y de dicha cromatografía de intercambio catiónico cargada negativamente.

31. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, que comprende adicionalmente la etapa de someter la célula productora a filtración por flujo tangencial.

32. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 31, en el que la filtración por flujo tangencial se efectúa antes de la cromatografía.

33. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según la reivindicación 31, en el que dicha filtración por flujo tangencial se efectúa después de la cromatografía.

34. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, en el que dicha cromatografía de intercambio aniónico se efectúa en una resina de amino o imino N-cargada, opcionalmente seleccionada de una resina POROS 50 PI, una resina de dietilaminoetilo (DEAE), una resina de trimetilaminoetilo (TMAE), una resina de amina cuaternaria y una resina de polietilenimina (PEI).

35. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, en el que dicha cromatografía de intercambio catiónico se efectúa en una resina catiónica basada en azufre, fósforo o carboxilo, opcionalmente seleccionada de una resina de sulfato de heparina (HS), una resina de sulfopropilo (SP) y una resina de carboximetilo (CM).

36. Un procedimiento de generación de una población de partículas de AAVr según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 35, en el que la célula productora se cultiva en condiciones de suspensión.

Figura 1

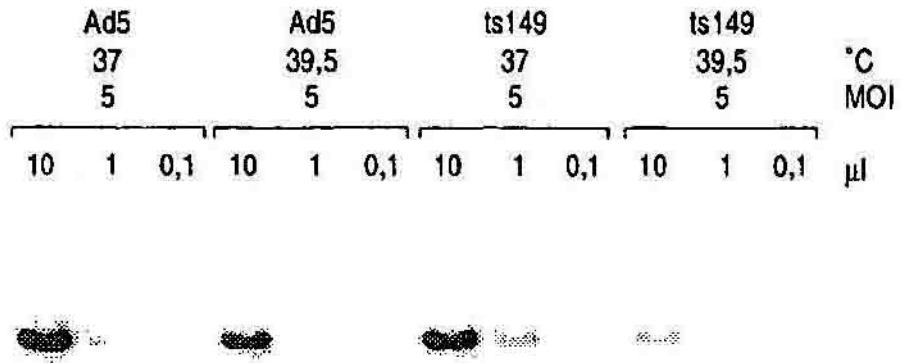


Figura 2

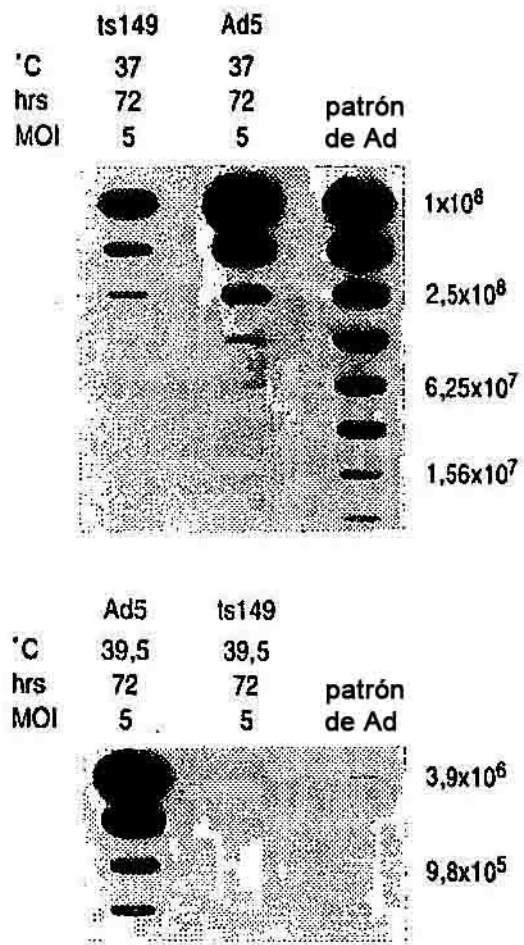


Figura 3

ts149				Ad5	ts149		°C hrs	MOI
39,5				37	39,5	96		
72					72	96		
5	10	20	40		5	5		

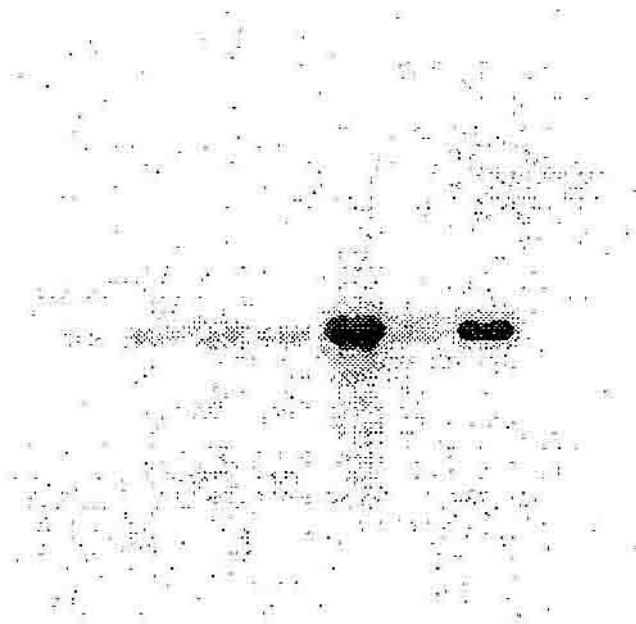


Figura 4

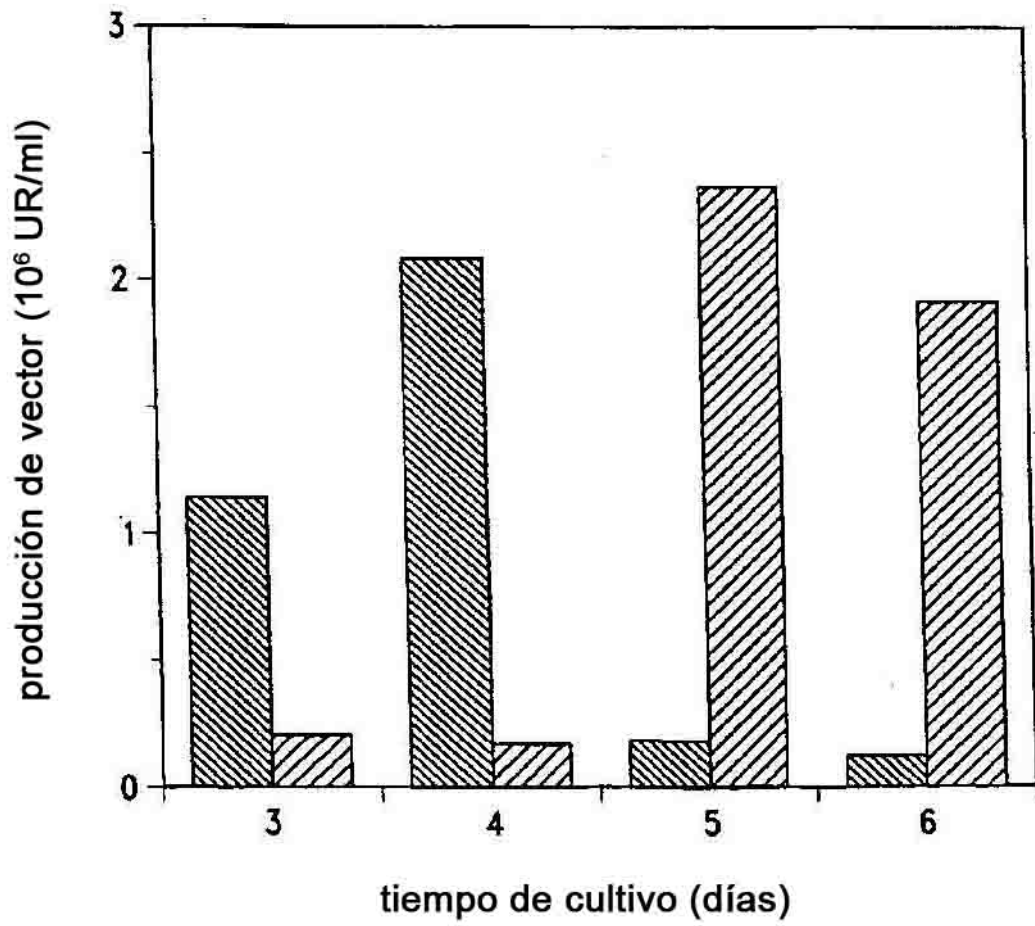


Figura 5

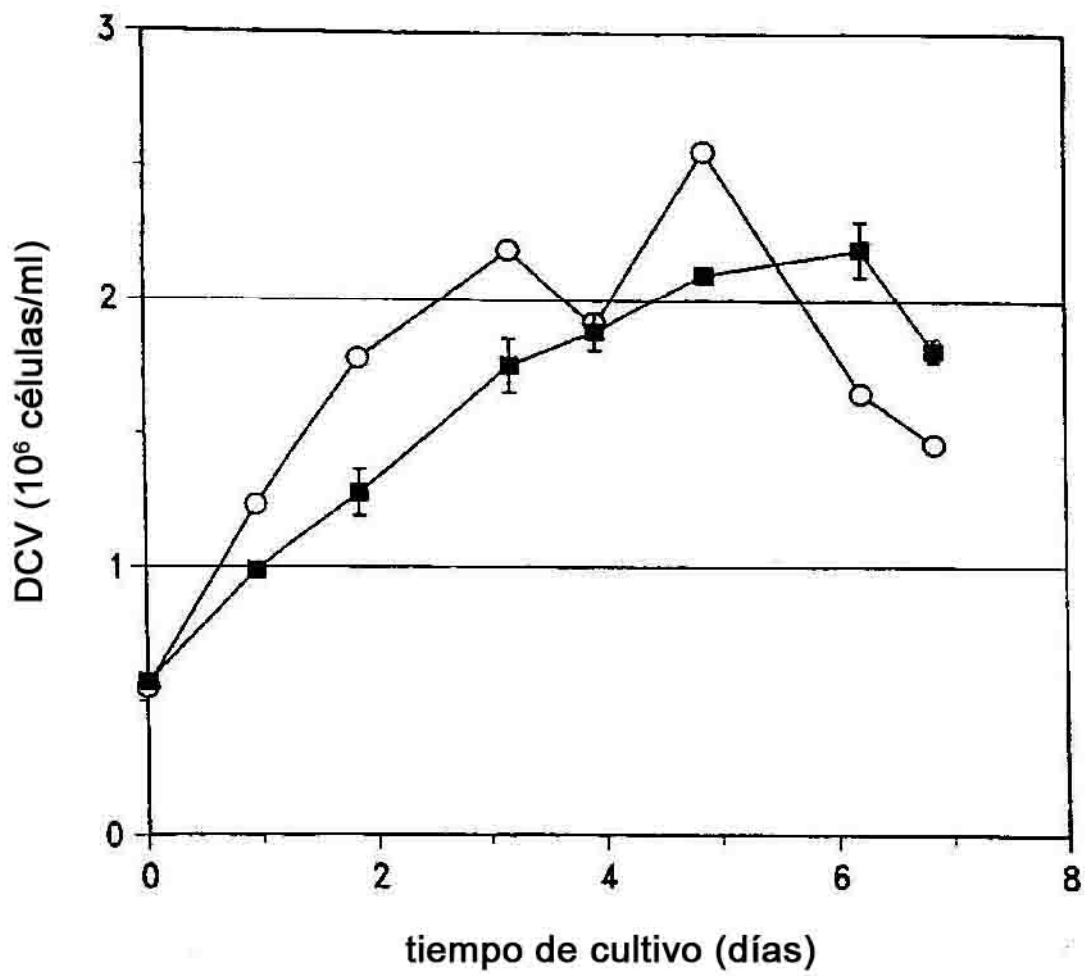


Figura 6

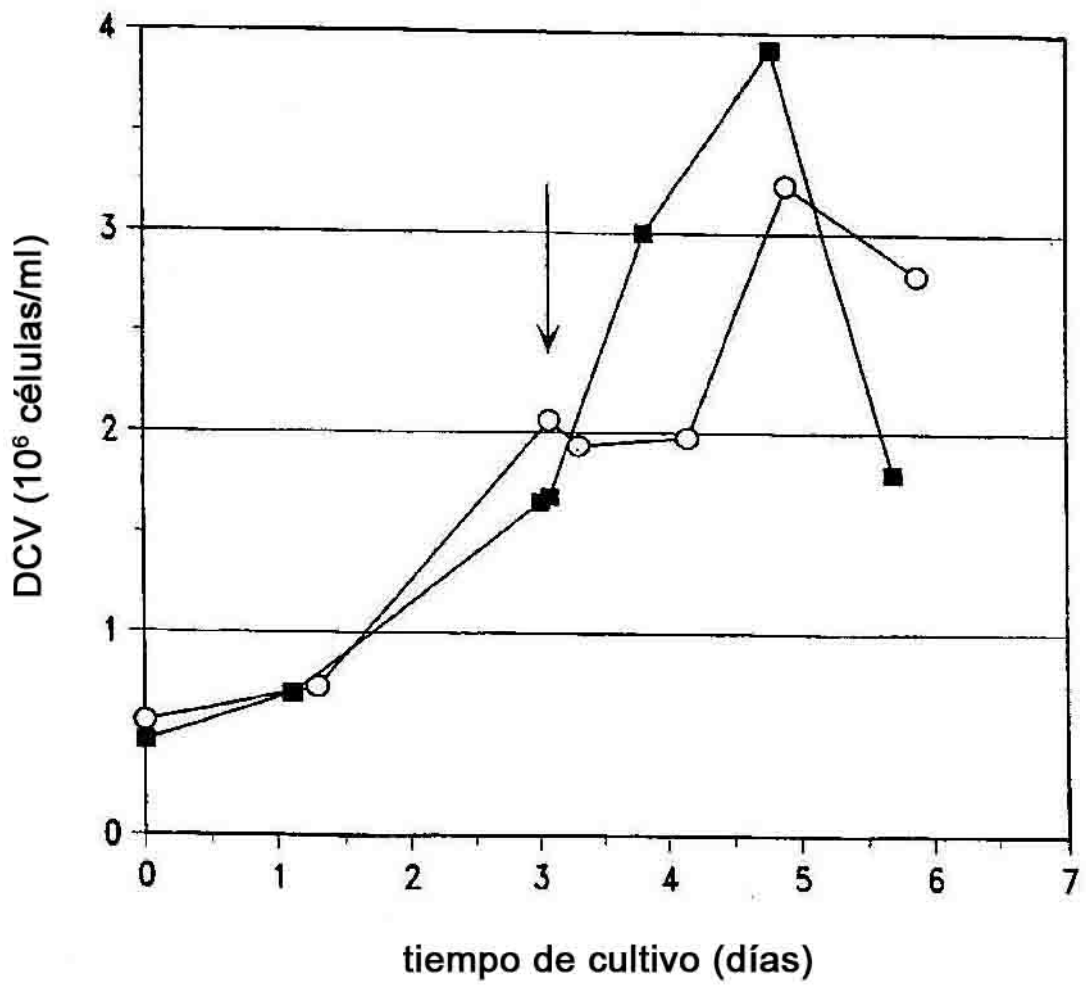


Figura 7

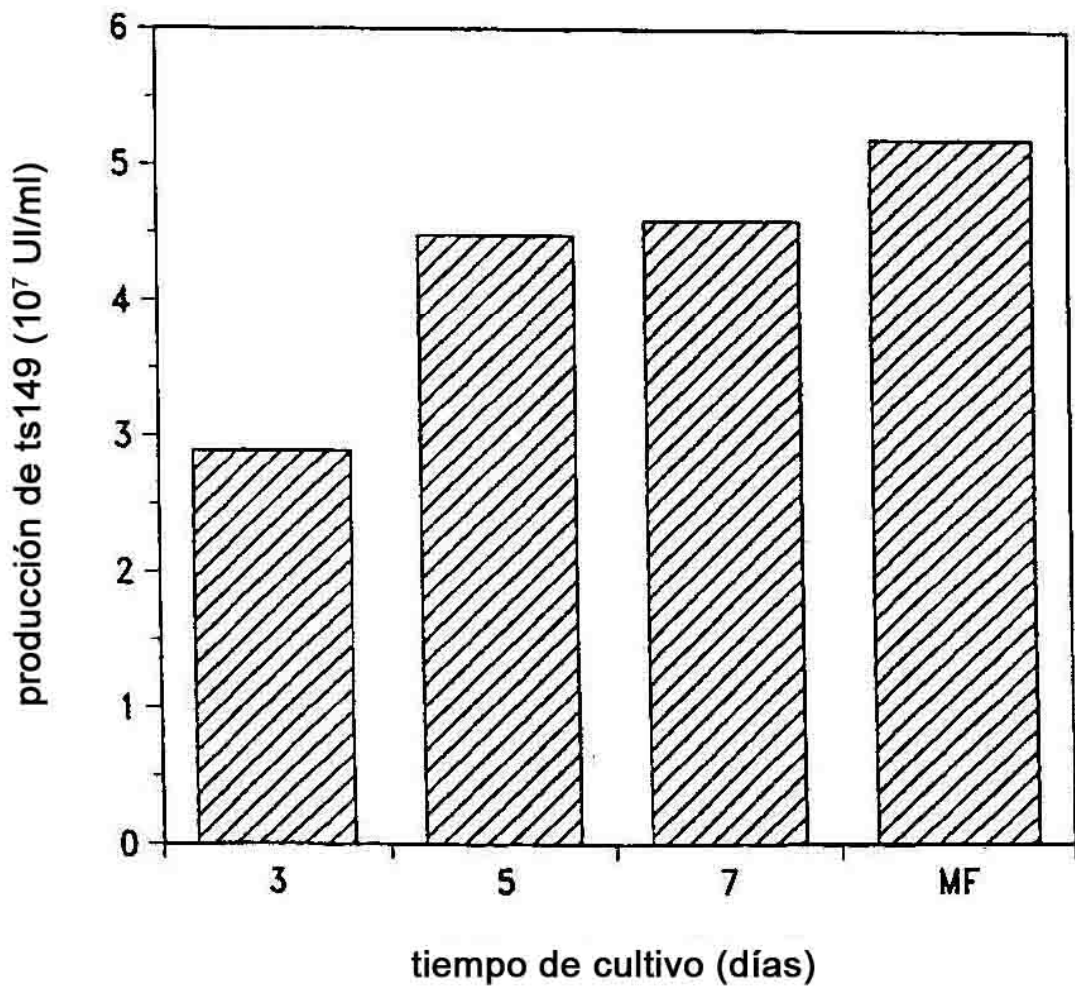


Figura 8A

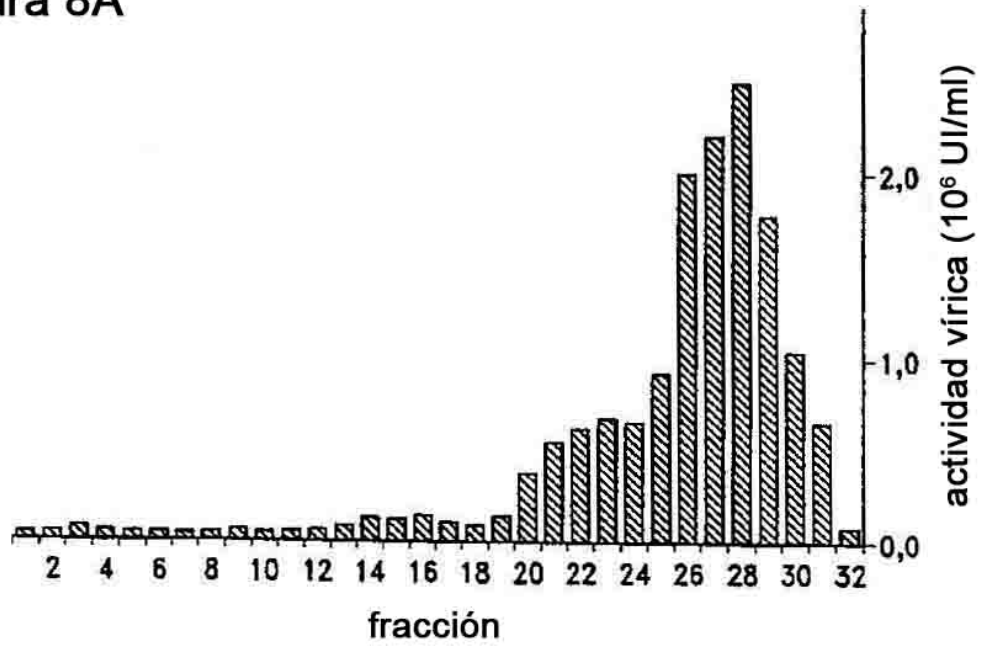


Figura 8B

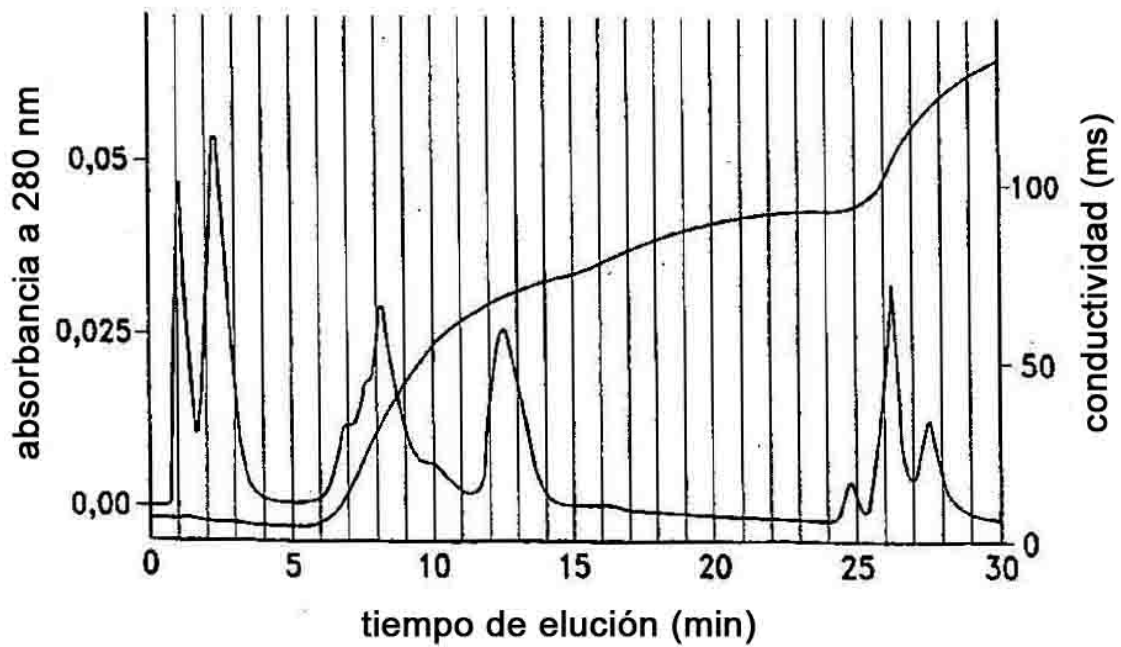


Figura 9

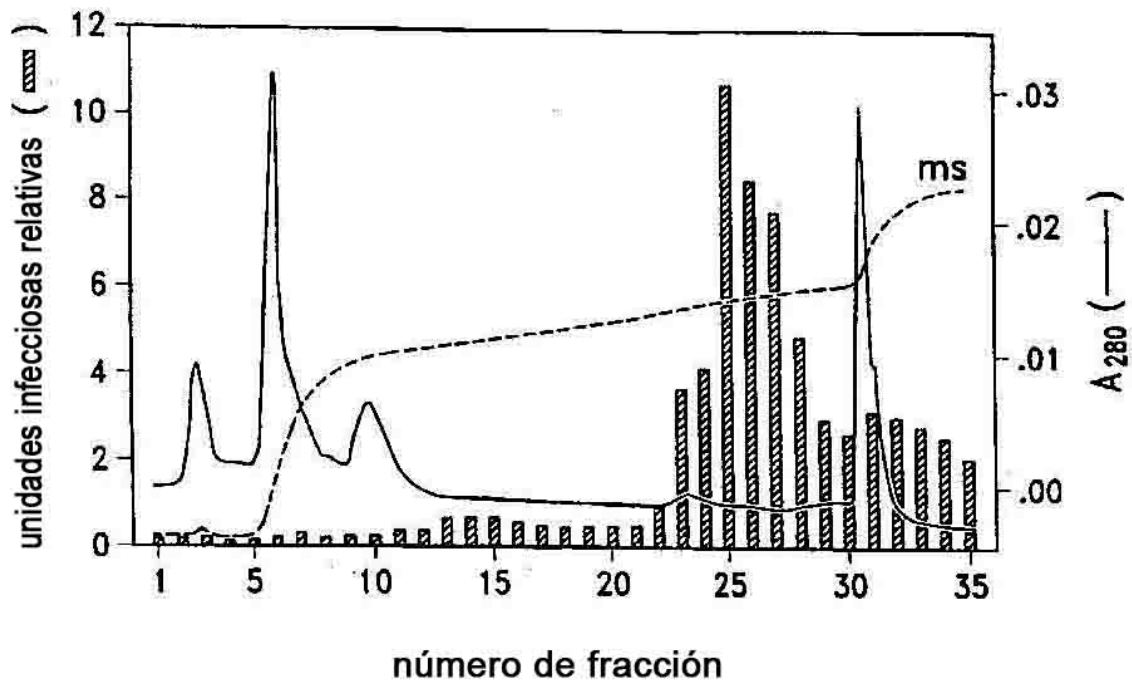


Figura 10A

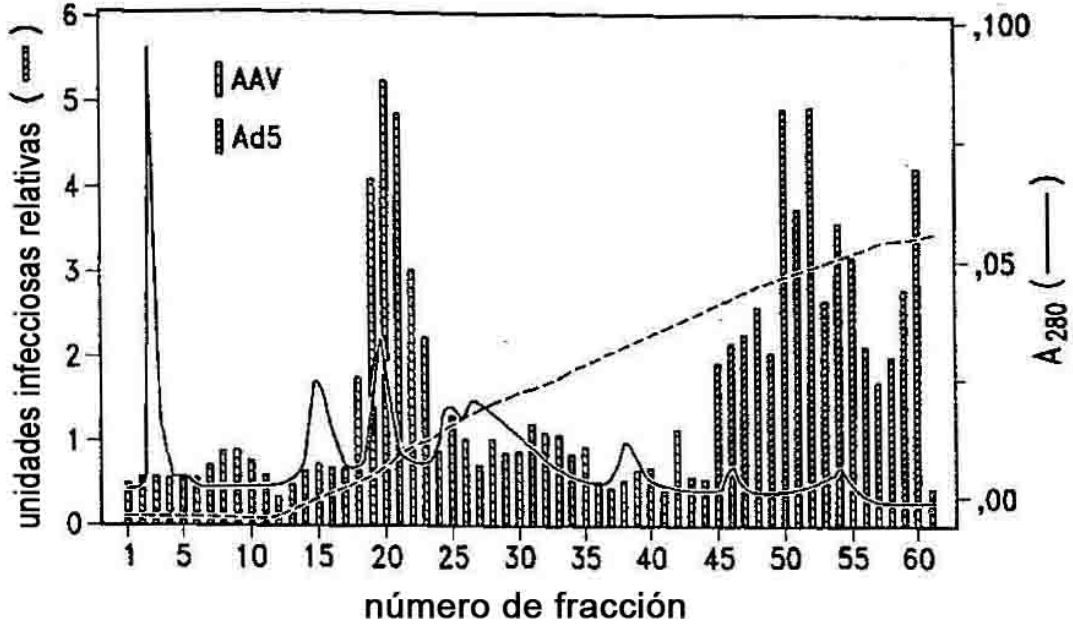


Figura 10B

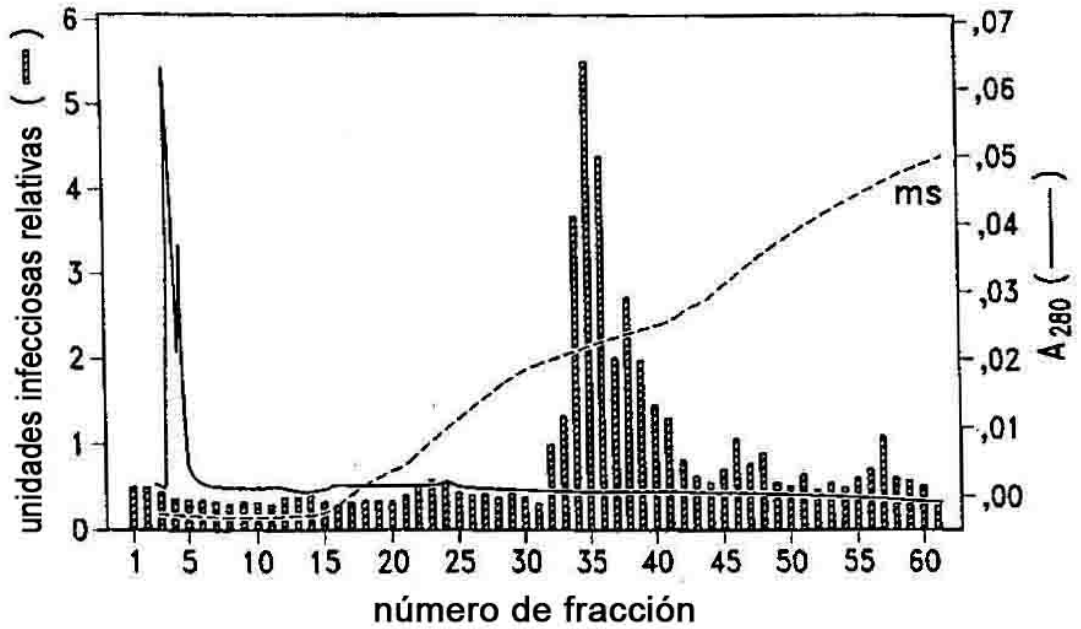


Figura 11A

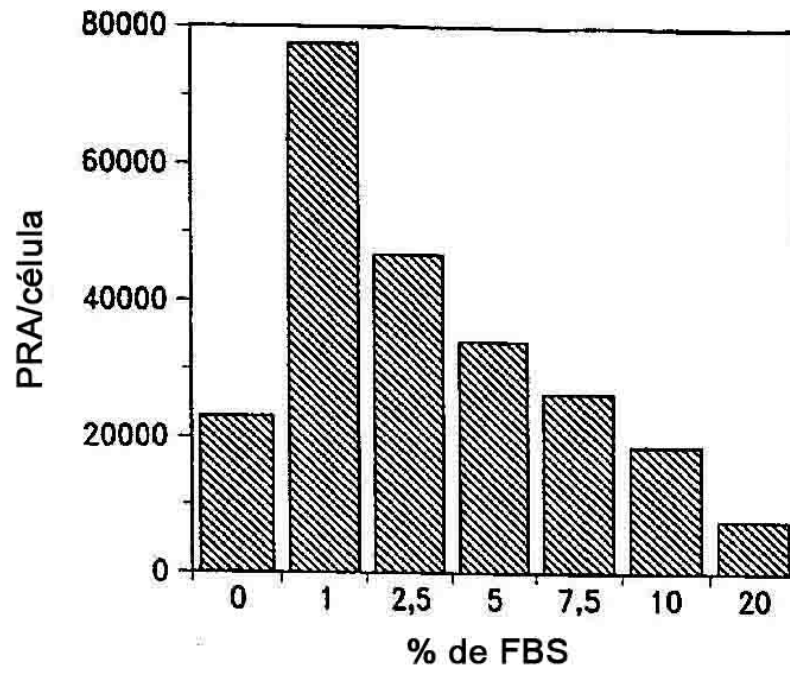


Figura 11B

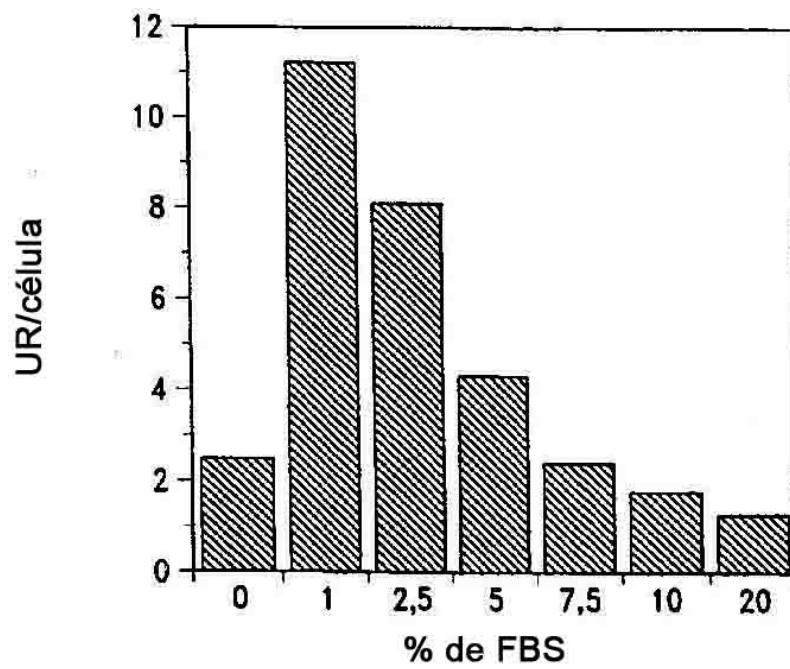


Figura 12

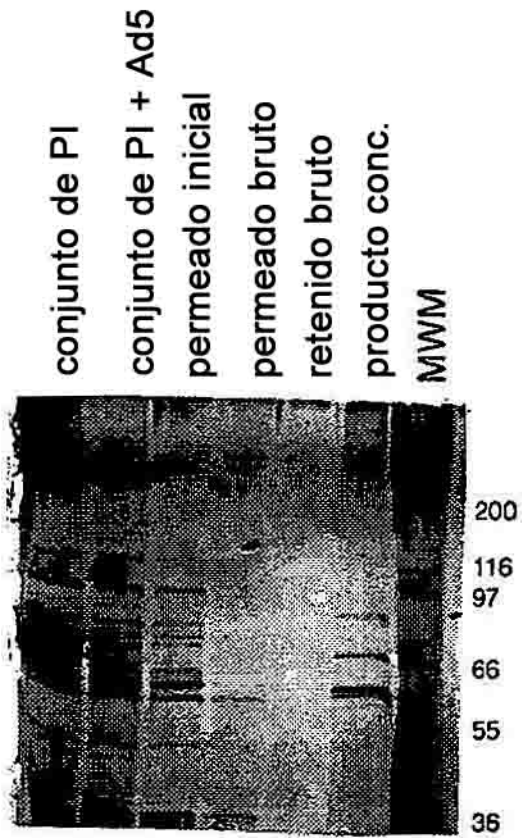


Figura 13

