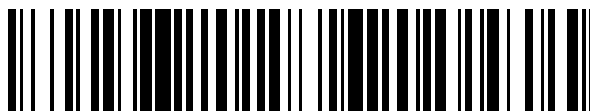


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 682**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C02F 1/42 (2006.01)

B01D 15/00 (2006.01)

B01D 15/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2004 E 10179750 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2277996**

54 Título: **Procedimientos para producir preparaciones de viriones de AAV recombinantes sustancialmente exentas de cápsidas vacías**

30 Prioridad:

21.05.2003 US 472384 P

02.03.2004 US 549756 P

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

13.11.2014

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)

500 Kendall Street

Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

QU, GUANG y

WRIGHT, JOHN FRASER

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 521 682 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 producir preparaciones de viriones de AAV recombinantes sustancialmente exentas de cápsidas vacías

CAMPO TECNICO

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos para purificar viriones de virus adenoasociados (AAV). Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para purificar viriones de AAV recombinantes (rAAV) que contienen genomas empaquetados procedentes de mezclas de viriones de AAV que contienen viriones de rAAV empaquetados y cápsidas vacías de AAV que carecen de dichos genomas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los procedimientos de terapia génica en desarrollo administran de manera segura y persistente cantidades terapéuticamente eficaces de productos génicos a los pacientes. Usando estos procedimientos, se puede introducir directamente una molécula de ácido nucleico en un paciente (terapia génica *in vivo*), o en células aisladas de un paciente o donante, que a continuación se devuelven posteriormente al paciente (terapia génica *ex vivo*). El ácido nucleico introducido dirige a continuación a las propias células del paciente o a las células injertadas para producir el producto terapéutico deseado. La terapia génica permite también a los médicos seleccionar órganos o dianas celulares específicas (por ejemplo, músculos, células sanguíneas, células cerebrales, etc.) para la terapia.

[0003] Se pueden introducir los ácidos nucleicos en las células del paciente de diversas formas, que incluyen la administración génica mediada por virus, la administración de ADN puro, y los procedimientos de transfección. Se ha usado la administración génica mediada por virus en una mayoría de pruebas de terapia génica. C. P. Hodgson *Biotechnology* (1995) 13: 222-225. Los virus recombinantes más frecuentemente usados se basan en retrovirus, adenovirus, virus del herpes, virus de la viruela, y virus adenoasociados (AAV).

[0004] Los vectores de virus adenoasociados recombinantes son prometedores como vectores de administración génica en la terapia génica humana. Sin embargo, un significativo obstáculo para usar dichos vectores como fármacos es el desarrollo de un procedimiento verdaderamente escalable para producir y purificar el vector a niveles comercialmente viables. Para una revisión de los desafíos implicados en la producción de un vector de AAV escalable para uso comercial, véase Qu y Wright, *Cur. Opin. Drug Disc. and Develop.* (2000) 3: 750-755. Recientemente, se han desarrollado algunas técnicas de cromatografía en columna para purificar viriones de rAAV. Aunque estos procedimientos de purificación basados en la cromatografía en columna han demostrado que se pueden purificar viriones de rAAV a gran escala, la preparación de viriones purificados usando la cromatografía en columna contiene una cantidad significativa de cápsidas vacías de AAV. La relación típica de cápsidas vacías a viriones que contienen un gen heterólogo de interés ("partículas de vector de AAV") es aproximadamente de 10 o más, es decir, el 90% de los vectores recuperados son cápsidas vacías.

[0005] La presencia de una gran cantidad de cápsidas vacías puede impedir aplicaciones clínicas, por ejemplo estimulando respuestas inmunes no deseadas a la proteína de la cápsida o compitiendo por los sitios de unión a la superficie de la célula diana. En consecuencia, se han desarrollado técnicas para eliminar las cápsidas vacías de las preparaciones de viriones de rAAV. Estas técnicas se basan normalmente en la ultracentrifugación, por ejemplo, centrifugación en gradiente de cloruro de cesio o iodixanol. Dichas técnicas de centrifugación son extremadamente laboriosas, dando como resultado un rendimiento bajo del vector, y no son escalables. Kaludov y col., (2002) *Hum. Gene Ther.* 13: 1235-1243, describen procedimientos de purificar vectores de rAAV-2, rAAV-4 y rAAV-5 usando columnas de intercambio aniónico. Sin embargo, los experimentadores fueron solo capaces de recuperar el 2%, 0,6% y 6,3%, respectivamente, como genomas empaquetados, incluso tras combinar los eluatos y concentrar las fracciones.

[0006] De esta manera subsiste una necesidad de nuevas formas de eliminar o reducir el número de cápsidas vacías de las disoluciones madre de partículas de vectores AAV con el fin de mejorar la capacidad de fabricación.

CARACTERÍSTICAS RESUMIDAS DE LA INVENCION

[0007] La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones.

[0008] La presente invención se basa en el descubrimiento de procedimientos eficaces y comercialmente viables de preparación de disoluciones madre de viriones de rAAV con cantidades reducidas de cápsidas vacías. Los inventores han encontrado en el presente documento que se pueden separar cápsidas vacías de viriones de rAAV que contienen material genético ("partículas de vector de AAV") usando técnicas de cromatografía en columna. Este resultado es sorprendente ya que se creía anteriormente que las cápsulas vacías y empaquetadas tenían

idénticas propiedades superficiales. Hasta donde llega el conocimiento de los inventores, esta es la primera demostración de que la carga de las partículas víricas y/o la densidad de carga son diferentes entre las partículas vacías y las partículas llenas. Las técnicas descritas en el presente documento proporcionan procedimientos eficaces y escalables para separar cápsidas vacías de AAV de partículas de vectores de AAV.

[0009] Según esto, en una realización, el uso de la invención se dirige a un procedimiento para purificar partículas de vectores de AAV procedentes de una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar una célula hospedadora que comprende partículas de vectores de AAV;
- (b) lisar la célula hospedadora para obtener un lisado celular bruto que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
- (c) aplicar el lisado celular bruto a una primera columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas de AAV se unen a la columna;
- (d) eluir las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV en condiciones de no separación para proporcionar una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
- (e) aplicar la preparación de AAV procedente de (d) a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías se unen a la columna;
- (f) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (e) en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV se eluyen y las cápsidas vacías de AAV permanecen unidas a la columna; y
- (g) recoger las fracciones eluidas de (f) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

[00010] En realizaciones adicionales, el anterior procedimiento comprende además:

- (h) aplicar las fracciones procedentes de la etapa (g) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV, si están presentes, se unen a la columna;
- (i) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (h) en condiciones en las que las cápsidas vacías de AAV se eluyen y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;
- (j) añadir un tampón alto en sal a la columna de (i) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV;
- (k) recoger fracciones de (i) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

[0011] En una realización más adicional, el uso de la invención se dirige a un procedimiento para purificar partículas de vectores de AAV procedentes de una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar una célula hospedadora que comprende partículas de vectores de AAV;
- (b) lisar la célula hospedadora para obtener un lisado celular bruto que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
- (c) clarificar el lisado celular bruto para proporcionar un lisado celular clarificado;
- (d) aplicar el lisado celular clarificado a una primera columna de intercambio catiónico que comprende una matriz del ligando funcional R-SO₃⁻ en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;
- (e) eluir las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV en condiciones no de separación para proporcionar una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
- (f) aplicar la preparación de AAV procedente de (e) a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;
- (g) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (f) en condiciones en las que las partículas de vectores se eluyen y las cápsidas vacías de AAV permanecen unidas a la columna;
- (h) recoger las fracciones eluidas procedentes de (g) que comprenden partículas de vectores de AAV;
- (i) aplicar la fracciones de la etapa (h) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, si están presentes, se unen a la columna;
- (j) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (i) en condiciones en las que se eluyen las cápsidas vacías de AAV y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;
- (k) añadir un tampón alto en sal a la columna de (j) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV; y

- (l) recoger las fracciones eluidas de (k) que comprenden las partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

[0012] En otra realización, el uso de la invención se dirige a un procedimiento para purificar partículas de vectores de AAV procedentes de una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar una célula hospedadora que comprende partículas de vectores de AAV;
 (b) lisar la célula hospedadora para obtener un lisado celular bruto que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
 (c) aplicar el lisado celular bruto a una columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;
 (d) eluir las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV en condiciones de no separación para proporcionar una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
 (e) aplicar la preparación de AAV procedente de (d) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV se unen a la columna
 (f) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (e) en condiciones en las que se eluyen las cápsidas vacías de AAV y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;
 (g) añadir un tampón alto en sal a la columna de (f) en condiciones en las que se eluyen las partículas de AAV;
 (h) recoger las fracciones eluidas procedentes de (g) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

[0013] En realizaciones adicionales, el anterior procedimiento comprende además:

- (i) aplicar la preparación de AAV de (h) a una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico e condiciones en las que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV, si están presentes, se unen a la columna;
 (j) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (i) en condiciones en las que se eluyen las cápsidas vacías de AAV y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;
 (k) añadir un tampón alto en sal a la columna de (j) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV;
 (l) recoger las fracciones eluidas procedentes de (k) que comprenden las partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

[0014] En realizaciones alternativas, el procedimiento comprende además:

- (i) aplicar la preparación de AAV procedente de (h) a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;
 (j) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (i) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV permanecen unidas a la columna; y
 (k) recoger las fracciones eluidas de (j) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

[0015] En algunas realizaciones de todos los procedimientos anteriores, la primera columna de intercambio catiónico y/o la segunda columna de intercambio catiónico comprende una matriz carboximetilada o sulfonada, tal como una matriz que comprende el ligando funcional R-SO₃⁻.

[0016] En realizaciones adicionales de todos los procedimientos anteriores, las partículas de vectores de AAV están presentes en el vector de AAV en una cantidad de al menos el 50%, tal como en una cantidad de al menos el 75%, por ejemplo, en una cantidad de al menos el 85%, o al menos del 90%.

[0017] En otras realizaciones adicionales de todos los procedimientos anteriores, las partículas de vectores de AAV se derivan de AAV-2 o de AAV-5.

[0018] Los expertos en la técnica producirán fácilmente estas y otras realizaciones de la invención sujeto a la vista de la divulgación en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0019] Figuras 1A y 1B. Muestran las características de unión de un lisado bruto que contiene partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV. En la Figura 1A, las resinas ensayadas fueron como sigue: Banda 1: control; Bandas 2 y 3: MACRO PREP Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de BioRad, Hercules, CA);

5 Bandas 4 y 5: UNO-SPHERE Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de BioRad, Hercules, CA); bandas 6 y 7: POROS 50HQ (intercambiador aniónico fuerte disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA); bandas 8 y 9: POROS 50D (intercambiador aniónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA). En la Figura 1B, las resinas ensayadas fueron como sigue: Banda 1: control; Bandas 2 y 3: POROS 50PI (intercambiador aniónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA); Bandas 4 y 5: SOURCE 30Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Bandas 6 y 7: DEAE SEPHAROSE (intercambiador aniónico débil disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Bandas 8 y 9: Q SEPHAROSE (intercambiador aniónico fuerte disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Para las Figuras 1A y 1B, las Bandas 2, 4, 6 y 8 usaron una fracción de lavado baja en sal (NaCl 50 mM); las Bandas 3, 5, 7 y 8 usaron una fracción de lavado alta en sal (NaCl 1M).

10 Figura 2. Muestra un análisis de cápsidas vacías de AAV y de partículas de vectores de AAV (Vgs) antes y después de la separación usando una columna de intercambio aniónico según se describe en los ejemplos.

15 Figura 3. Es una representación gráfica SDS-PAGE teñido con plata de las fracciones de una columna de intercambio aniónico según se detalla en los ejemplos. Banda 1; partículas de vectores de AAV; Bandas 2-5; fracciones de elución de los vectores; Banda 6: patrones de pesos moleculares de las proteínas.

20 Figura 4. Es una representación gráfica de un gel SDS-PAGE teñido con plata que muestra las fracciones de elución (Bandas 12-21) de una columna de intercambio catiónico según se describe en los ejemplos.

25 Figura 5. Es una representación gráfica de un gel SDS-PAGE teñido con plata que muestra la separación de las partículas vacías de AAV procedentes de partículas de vectores de AAV usando la cromatografía en columna de intercambio catiónico. Banda 1: material de partida; Bandas 2-4: tres muestras independientes de vectores eluidas de las columnas de intercambio catiónico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 **[0020]** La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, procedimientos convencionales de virología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante que se encuentran comprendidas dentro del conocimiento del experto en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Current Edition); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. I y II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., Edición Actual); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., Edición Actual); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., Edición Actual); *CRC Handbook of Parvoviruses*, vol. I y II (P. Tijssen, ed.); *Fundamental Virology*, 2ª Edición, vol. I y II (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds.); *Freshney Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (Wiley-Liss, Tercera Edición); y Ausubel y col. (1991) *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley Interscience, NY).

1. DEFINICIONES

40 **[0021]** En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se desean definir según se indica a continuación.

45 **[0022]** Debe señalarse que, según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen las referencias en plural a no ser que el contenido dicte claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “una cápsida empaquetada” incluye una mezcla de dos o más de dichas cápsidas, y similares.

50 **[0023]** Por “vector” se entiende cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias génicas entre las células. De esta manera, el término incluye vehículos de clonación y de expresión, así como vectores víricos.

55 **[0024]** Por un “vector de AAV” se entiende un vector derivado de un serotipo de virus adenoasociado, que incluye sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 y AAV-8. Los vectores de AAV pueden tener uno o más de los genes naturales de AAV eliminados en todo o en parte, preferiblemente los genes *rep* y/o *cap*, pero retienen las frecuencias ITR flanqueantes funcionales. Las secuencias ITR funcionales son necesarias para el rescate, la replicación y el empaquetado del virión de AAV. De esta manera, se define un vector de AAV en el presente documento para incluir al menos aquellas secuencias requeridas para la replicación y el empaquetamiento en cis (por ejemplo, ITR funcionales) del virus. Las ITR no necesitan ser secuencias de nucleótido naturales, y pueden estar alteradas, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, siempre que las secuencias proporcionen el rescate, la replicación y el empaquetamiento funcionales.

60 **[0025]** “Funciones auxiliares de AAV” se refieren a secuencias de codificación derivadas de AAV que se

pueden expresar para proporcionar productos génicos de AAV que, a la vez, funcionan en *trans* para la replicación de AAV productiva. De esta manera, las funciones auxiliares de AAV incluyen los marcos de lectura abiertos de AAV principales (ORF), *rep* y *cap*. Los productos de expresión de Rep han demostrado poseer muchas funciones, incluyendo, entre otras; el reconocimiento, la unión y la heterosis del origen de replicación del ADN de AAV; la actividad de la ADN helicasa, y la modulación de la transcripción de los promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión de Cap suministran las funciones de empaquetado necesarias. Las funciones auxiliares de AAV se usan en el presente documento para complementar las funciones de AAV en *trans* que están desapareciendo de los vectores de AAV.

[0026] La expresión “construcción auxiliar de AAV” se refiere en general a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones de AAV eliminadas de un vector de AAV que se va a usar para producir un vector de transducción para la administración de una secuencia de nucleótidos de interés. Las construcciones auxiliares de AAV se usan frecuentemente para proporcionar la expresión transitoria de los genes *rep* y/o *cap* de AAV para complementar la desaparición de las funciones de AAV que son necesarias para la replicación de AAV; sin embargo, las construcciones auxiliares carecen de las ITR de AAV y no pueden replicarse ni empaquetarse por sí mismas. Las construcciones auxiliares de AAV pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito numerosas construcciones auxiliares de AAV, tales como los plásmidos pAAV/Ad y pIM29+45 frecuentemente usados que codifican los productos de expresión Rep y Cap. Véanse, por ejemplo, Samulski y col. (1989) J. Virol. 63: 3822-3828; y Mc-Carty y col. (1991) J. Virol. 65: 2936-2945. Se han descrito numerosos vectores diferentes que codifican los productos de expresión Rep y/o Cap. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.139.941 y 6.376.237.

[0027] La expresión “funciones accesorias” se refiere a funciones víricas y/o celulares no derivadas de AAV de las cuales AAV es dependiente para su replicación. De esta manera, el término comprende las proteínas y los ARN que son necesarios en la replicación de AAV, incluyendo aquellos restos implicados en la activación de la transcripción génica de AAV, el corte y empalme del ARNm de AAV específico de etapa, la replicación del ADN de AAV, la síntesis de los productos de expresión de Cap y el ensamblaje de la cápsida de AAV. Las funciones accesorias basadas en virus se pueden derivar de cualquiera de los virus auxiliares tales como adenovirus, virus del herpes (diferentes del virus del herpes simple de tipo 1) y virus vaccinia.

[0028] La expresión “vector de función accesorio” se refiere en general a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones accesorias. Un vector de función accesorio puede transfectarse en una célula hospedadora adecuada, en la que el vector es capaz a continuación de soportar la producción de viriones de AAV en la célula hospedadora. Expresamente excluidas del término están las partículas víricas infecciosas que existen en la naturaleza, tales como partículas víricas de adenovirus, virus del herpes o vaccinia. De esta manera, los vectores de función accesorio pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón o cósmido. En particular, se ha demostrado que no se requiere el complemento completo de los genes de adenovirus para las funciones auxiliares accesorias. Por ejemplo, mutantes de adenovirus incapaces de la replicación de ADN y de la síntesis de genes tardíos han demostrado ser permisivos para la replicación de AAV. Ito y col., (1970) J. Gen. Virol. 9: 243; Ishibashi y col., (1971) Virology 45: 317. De manera similar, mutantes dentro de las regiones E2B y E3 han demostrado soportar la replicación de AAV, indicando que las regiones E2B y E3 no están probablemente implicadas en proporcionar funciones accesorias. Carter y col., (1983) Virology 126: 505. Sin embargo, adenovirus defectivos en la región E1, o que tienen la región E4 eliminada, son incapaces de soportar la replicación de AAV. De esta manera, se necesitan probablemente las regiones E1A y E4 para la replicación de AAV, tanto directa como indirectamente. Laughlin y col., (1982) J. Virol. 41: 868; Janik y col., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1925; Carter y col., (1983) Virology 126: 505. Otros mutantes Ad caracterizados incluyen: E1B (Laughlin y col. (1982), *más arriba*; Janik y col. (1981), *más arriba*; Ostrove y col., (1980) Virology 104: 502); E2A (Handa y col., (1975) J. Gen. Virol. 29: 239; Strauss y col., (1976) J. Virol. 17: 140; Myers y col., (1980) J. Virol. 35: 665; Jay y col., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2927; Myers y col., (1981) J. Biol. Chem. 256: 567); E2B (Carter, Adeno-Associated Virus Helper Functions, in I CRC Handbook of Parvoviruses (P. Tijssen ed., 1990)); E3 (Carter y col. (1983), *mas arriba*); y E4 (Carter y col.(1983), *más arriba*; Carter (1995)). Aunque los estudios de las funciones accesorias proporcionadas por los adenovirus que tienen mutaciones en la región de codificación de E1B han producido resultados conflictivos, Samulski y col., (1988) J. Virol. 62: 206-210, informaron hace poco que se necesitaba E1B55k para la producción de viriones de AAV, mientras que E1B19k no. Adicionalmente, la Publicación Internacional WO 97/17458 y Matshushita y col., (1998) Gene Therapy 5: 938-945, describe vectores con funciones accesorias que codifican diversos genes Ad.

[0029] Los vectores de función accesorio particularmente preferidos comprenden una región de codificación de ARN del adenovirus VA, una región de codificación del ORF6 del adenovirus E4 una región de codificación del adenovirus E2A de 72 kDa, una región de codificación del adenovirus E1A y una región de codificación del adenovirus E1B que carece de una región de codificación de E1B55k intacta. Se describen dichos vectores en la Publicación Internacional N^o WO 01/83797.

[0030] Por “virus recombinante” se entiende un virus que se ha alterado genéticamente, por ejemplo,

mediante la adición o a inserción de una construcción de ácido nucleico heterólogo en la partícula.

[0031] Por “virión de AAV” se entiende una partícula de virus completo tal como una partícula de virus de AAV natural (wt) (que comprende un genoma de ácido nucleico de AAV monocatenario asociado con un revestimiento de proteína de la cápsida de AAV). A este respecto, las moléculas de ácido nucleico de AAV monocatenario de cualquier cadena de sentido complementario, por ejemplo “de sentido directo” o de “sentido contrario”, pueden estar empaquetadas en un virión de AAV cualquiera y ambas cadenas son igualmente infecciosas.

[0032] Las expresiones “virión de AAV recombinante”, “virión de rAAV”, “partícula de vector de AAV”, “cápsidas llenas”, “llenas”, y “partículas llenas” se definen en el presente documento como virus infecciosos de replicación defectiva que incluyen la estructura de la proteína de AAV, encapsidando una secuencia de nucleótidos heterólogos de interés que está flanqueada en ambos lados por las ITR de AAV. Un virión de rAAV se produce en una célula hospedadora adecuada que ha tenido secuencias que especifican un vector de AAV, funciones auxiliares de AAV y funciones accesorias introducidas en la anterior. De esta manera, la célula hospedadora se vuelve capaz de codificar polipéptidos de AAV que se necesitan para el empaquetamiento del vector de AAV (que contiene una secuencia de nucleótidos recombinantes de interés) en las partículas del virión recombinante infeccioso para la posterior administración génica.

[0033] Las expresiones “cápsida vacía”, “partícula vacía” y “vacías” se refieren a un virión de AAV que incluye una estructura de proteína de AAV pero que carece de todo o en parte de la construcción de polinucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos heterólogos de interés flanqueada en ambos lados por las ITR de AAV. Según esto, la cápsida vacía no funciona para transferir el gen de interés en la célula hospedadora.

[0034] La expresión “célula hospedadora” denota, por ejemplo, microorganismos, que pueden ser, o han sido, usados como receptores de una construcción auxiliar de AAV, un plásmido de vector de AAV, un vector con función accesorias, u otro ADN de transferencia. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. De esta manera, una célula hospedadora según se usa en el presente documento se refiere generalmente a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una célula parental individual puede no ser necesariamente completamente idéntica en la morfología o en el complemento de ADN genómico o total que el original parental debido a una mutación natural, accidental, o deliberada.

[0035] El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN extraño por una célula, y una célula se ha “transfectado” cuando se ha introducido ADN exógeno en el interior de la membrana celular. Se conocen generalmente en la materia numerosas técnicas de transfección. Véanse, por ejemplo, Graham y col. (1973) *Virology*, 52: 456, Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis y col. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu y col. (1981) *Gene* 13: 197. Se pueden usar dichas técnicas para introducir uno o más restos de ADN exógeno en las células hospedadoras adecuadas.

[0036] Según se usa en el presente documento, la expresión “línea celular” se refiere a una población de células capaz de crecimiento continuo o prolongado y división *in vitro*. A menudo, las líneas celulares son poblaciones clonales derivadas de una célula progenitora individual. Se sabe además en la materia que se pueden producir cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de dichas poblaciones clonales. Por tanto, las células de la línea celular referida pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular referida incluye dichas variantes.

[0037] Una disolución o preparación madre de viriones de rAAV que comprende partículas de vectores de AAV (genomas empaquetados) está “sustancialmente exenta de” cápsidas vacías de AAV cuando al menos aproximadamente el 50%-99% o más de los viriones presentes en la disolución madre son viriones de rAAV con genomas empaquetados (es decir, partículas de vectores de AAV). Preferiblemente, las partículas de vectores de AAV comprenden al menos aproximadamente un 75% a 85%, más preferiblemente aproximadamente un 90% de viriones presentes en la disolución madre, incluso, de manera más preferible aproximadamente un 95%, o incluso un 99% o más en peso de los viriones presentes en la disolución madre, o cualquier entero entre estos intervalos. De esta manera, una disolución madre está sustancialmente exenta de cápsidas vacías de AAV cuando entre aproximadamente un 40% a aproximadamente un 1% o menos, preferiblemente aproximadamente un 25% a aproximadamente un 15% o menos, más preferiblemente aproximadamente un 10% o menos, incluso más preferiblemente aproximadamente un 5% a aproximadamente un 1% o menos de la disolución madre resultante comprende cápsidas vacías.

[0038] Una secuencia de “ácido nucleico” se refiere a una secuencia de ADN o ARN. El término comprende secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos del ADN y el ARN tales como, pero sin limitarse a 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo,

dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

[0039] Una "secuencia de codificación", o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar localizada 3' respecto de la secuencia de codificación.

[0040] La expresión "secuencias control" de ADN se refiere colectivamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en la dirección 5', orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma ("IRES"), potenciadores, y similares, que proporcionan colectivamente la replicación, la transcripción y la traducción de una secuencia de codificación en una célula receptora. No todas estas secuencias control necesitan estar perpetuamente presentes siempre que la secuencia de codificación seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula hospedadora apropiada.

[0041] El término "promotor" se usa en el presente documento en su sentido ordinario para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en la que la secuencia reguladora se deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa y de iniciar la transcripción de la secuencia de codificación en la dirección 3' (dirección 3'). Los promotores de la transcripción pueden incluir "promotores inducibles" (en los que se induce la expresión de una secuencia de polinucleótidos unida de manera operable al promotor mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), "promotores represibles" (en los que se reprime la expresión de una secuencia de polinucleótidos unida de manera operable mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y "promotores constitutivos".

[0042] "Unido de manera operable" se refiere a una disposición de elementos en los que los componentes así descritos están determinados con el fin de llevar a cabo su función usual. De esta manera, las secuencias control unidas de manera operable a una secuencia de codificación son capaces de efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Las secuencias control no necesitan ser contiguas con la secuencia de codificación, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. De esta manera, por ejemplo, puede estar presente la intervención de secuencias transcritas adicionalmente no traducidas entre una secuencia promotora y la secuencia de codificación y la secuencia promotora puede considerarse aún "unida de manera operable" a la secuencia de codificación.

[0043] Con el fin de describir la posición relativa de las secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular, tal como cuando se describe una secuencia de ácido nucleico concreta como situada "en la dirección 5'", "en la dirección 3'", "3'", o "5'" con respecto a otra secuencia, debe entenderse que esta es la posición de las secuencias en la cadena de "sentido directo" o de "codificación" de una molécula de ADN a la que se está refiriendo como es convencional en la materia.

[0044] El término "heterólogo" según se refiere a secuencias de ácido nucleico tales como secuencias de codificación y secuencias control, denota secuencias que no están normalmente unidas entre sí, y/o que no están asociadas con una célula particular. De esta manera, una región "heteróloga" de una construcción o un vector de ácido nucleico es un segmento de ácido nucleico contenido o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción de ácido nucleico incluiría una secuencia de codificación flanqueada por secuencias que no se encuentran en asociación con la secuencia de codificación en la naturaleza. Otro ejemplo de secuencia de codificación heteróloga es una construcción en la que la secuencia de codificación no se encuentra por sí misma en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen diferentes codones que difieren de los del gen natural). De manera similar, una célula transformada con una construcción que no está normalmente presente en la célula se consideraría heteróloga para los objetivos de esta invención. La variación alélica o los episodios de mutaciones que se producen naturalmente no proporcionan un aumento del ADN heterólogo, según se usa en el presente documento.

[0045] Por "aislado" cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos, se entiende que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. De esta manera, una "molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido particular" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente exenta de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido

sujeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente las características básicas de la composición.

2. MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

[0046] Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a formulaciones o parámetros de procedimientos particulares ya que dichas formulaciones o parámetros de procedimientos pueden, por supuesto, variar. Debe entenderse también que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones concretas de la invención, y no se pretende que sea limitante.

[0047] Aunque se pueden usar numerosos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento durante la práctica de la presente invención, se describen en el presente documento los materiales y procedimientos preferidos.

[0048] La presente invención implica reducir el número, o eliminar, de las cápsidas vacías de AAV contenidas en las disoluciones madre purificadas de viriones de AAV, con una pérdida mínima de partículas de vectores de AAV contenidas en las anteriores. La presente invención se puede utilizar independientemente del procedimiento en el que se generan los viriones de rAAV.

[0049] Existen algunos procedimientos que son bien conocidos en la materia para generar viriones de rAAV: por ejemplo, transfección usando un vector y secuencias auxiliares de AAV junto con infección simultánea con uno de los virus auxiliares de AAV (por ejemplo, adenovirus, virus del herpes, o virus vaccinia) o transfección con un vector de AAV recombinante, un vector auxiliar de AAV, y un vector de función accesoria. Para descripciones detalladas de los procedimientos para generar viriones de rAAV véanse las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6.001.650 y 6.004.797.

[0050] Se pueden usar, por ejemplo, AAV naturales y virus auxiliares para proporcionar las funciones replicativas necesarias para producir viriones de rAAV (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N^o 5.139.941). Alternativamente, se puede usar un plásmido, que contiene genes de función auxiliar en combinación con la infección por uno de los virus auxiliares bien conocidos como fuente de funciones replicativas (véanse por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N^o 5.622.856 y la Patente de los Estados Unidos N^o 5.139.941). De manera similar, se puede usar un plásmido, que contiene genes con función accesoria, en combinación con una infección por AAV natural, para proporcionar las funciones replicativas necesarias. Estos tres enfoques, cuando se usan en combinación con un vector de rAAV, son cada uno suficientes para producir viriones de rAAV. Se pueden emplear también otros enfoques, bien conocidos en la materia por el experto en la técnica para producir viriones de rAAV.

[0051] En una realización preferida de la presente invención, se usa un procedimiento de transfección triple (descrito en detalle en la Patente de los Estados Unidos N^o 6.001.650) para producir viriones de rAAV debido a que este procedimiento no requiere el uso de un virus auxiliar infeccioso, permitiendo que se produzcan viriones de rAAV sin ningún virus auxiliar detectable presente. Esto se lleva a cabo mediante el uso de tres vectores para la producción del virión de rAAV: un vector de función auxiliar de AAV, un vector de función accesoria, y un vector de expresión de rAAV. Un experto en la materia apreciará, sin embargo, que se pueden proporcionar las secuencias de ácido nucleico codificadas por estos vectores en dos o más vectores en diversas combinaciones.

[0052] Según se explica en el presente documento, el vector de función auxiliar de AAV codifica las secuencias de la "función auxiliar de AAV" (es decir, *rep* y *cap*), que funcionan *en trans* para la replicación y encapsidación productora de AAC. Preferiblemente, el vector de función auxiliar de AAV soporta una producción eficaz de vector de AAV sin generar ningún virión de AAV wt detectable (es decir, los viriones de AAV que contienen los genes *rep* y *cap* funcionales) Un ejemplo de dicho vector, pHLP19, se describe en la Patente de los Estados Unidos N^o 6.001.650. Se pueden derivar los genes *rep* y *cap* del vector de función auxiliar de AAV de cualquiera de los serotipos de AAV conocidos, según se ha explicado anteriormente. Por ejemplo, el vector de función auxiliar de AAV puede tener un gen *rep* derivado de AAV-2 y un gen *cap* derivado de AAV-6; un experto en la materia reconocerá que son posibles otras combinaciones de genes *rep* y *cap*, siendo la característica definitoria la capacidad de soportar la producción de viriones de rAAV.

[0053] El vector de función accesoria codifica secuencias de nucleótidos para funciones víricas y/o celulares no derivadas de AAV de las cuales AAV es dependiente para la replicación (es decir, "funciones accesorias"). Las funciones accesorias incluyen aquellas funciones requeridas para la replicación de AAV, incluyendo, sin limitación, los restos implicados en la activación de la transcripción génica de AAV, el corte y empalme del ARNm de AAV específico de etapa, la replicación del ADN de AAV, la síntesis de los productos de expresión de *cap*, y el ensamblaje de la cápsida de AAV. Se pueden derivar funciones accesorias basadas en virus de cualquiera de los virus auxiliares bien conocidos tales como adenovirus, virus del herpes (diferentes del virus del herpes de tipo 1), y

virus vaccinia. En una realización preferida, se usa el plásmido de función accesoria pLadeno5 (se describen detalles con respecto a pLadeno5 en la Patente de los Estados Unidos nº 6.004.797). Este plásmido proporciona un conjunto completo de funciones accesorias de adenovirus para la producción del vector de AAV, pero carece de los componentes necesarios para formar un adenovirus competente para la replicación.

[0054] Una vez que se producen las disoluciones madre de viriones de AAV, se pueden usar numerosos procedimientos, detallados a continuación, para determinar los títulos infecciosos y para purificar las partículas de vectores de AAV de las cápsidas vacías de AAV.

[0055] Con el fin de profundizar en la comprensión de la invención, se proporciona a continuación una discusión más detallada con respecto a los vectores de expresión de AAV recombinante, funciones auxiliares y accesorias de AAV, composiciones que comprenden viriones de AAV, así como de la administración de viriones.

VECTORES DE EXPRESIÓN DE AAV RECOMBINANTE

[0056] Se construyeron vectores de expresión de AAV recombinante (rAAV) usando técnicas conocidas para proporcionar como componentes unidos operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluían una región de inicio de la transcripción, el polinucleótido de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionan para ser funcionales en la célula hospedadora de interés. La construcción resultante que contiene los componentes unidos operativamente se une (5' a 3') con las secuencias ITR de AAV funcionales.

[0057] Se conocen las secuencias de nucleótidos de las regiones ITR de AAV. Véanse, por ejemplo, Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801; Berns, K.I. "Parvoviridae and their Replication" en *Fundamental Virology*, 2ª Edición, (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds.) para la secuencia de AAV-2. Las ITR de AAV usadas en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótidos terminal, y pueden estar alteradas, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de los nucleótidos. Adicionalmente se puede derivar una ITR de AAV de cualquiera de los diversos serotipos de AAV, incluyendo sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 y AAV-8, etc. Además, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión de AAV no necesitan necesariamente ser idénticas o derivadas del mismo serotipo o aislado de AAV, siempre que funciones como se pretende, es decir, para permitir la excisión y el rescate de la secuencia de interés de un genoma o vector de célula hospedadora, y para permitir la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando los productos del gen Rep de AAV están presentes en la célula.

[0058] Las moléculas de polinucleótidos adecuadas para uso en vectores de AAV tendrán menos de aproximadamente 5 kilobases (kb) de tamaño. La secuencia de polinucleótidos seleccionada se une de manera operable a los elementos de control que dirigen la transcripción o la expresión de la misma en el sujeto *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender las secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado. Alternativamente, se pueden emplear secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles incluyen generalmente las derivadas de secuencias que codifican genes de mamíferos o virus. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotor de la enolasa específico de neurona, un promotor GFAP, el promotor temprano de SV40, el promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón; el promotor tardío mayor de adenovirus (AD MLP); un promotor del virus del herpes simple (VSH), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región del promotor temprano inmediato de CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR), el promotor CAG, promotores sintéticos, promotores híbridos, y similares. Adicionalmente, encontrarán uso en el presente documento secuencias derivadas de genes no víricos, tales como el gen de la metalotioneína de murino. Dichas secuencias promotoras están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Stratagene (San Diego, CA).

[0059] Se puede construir el vector de expresión de AAV que alberga la molécula del polinucleótido de interés unida mediante las ITR de AAV insertando la(s) secuencia(s) seleccionada(s) en un genoma de AAV que ha tenido los marcos de lectura abiertos de AAV principales ("ORF") escindidos de la anterior. Se pueden eliminar también otras porciones del genoma de AAV, siempre que permanezca una porción suficiente de las ITR para permitir las funciones de replicación y empaquetado. Se pueden diseñar dichas construcciones usando técnicas bien conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.173.414 y 5.139.941; Publicaciones Internacionales N^{os} WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski y col. (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8: 3988-3996; Vincent y col. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3: 533-539; Muzyczka (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158: 97-129; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801; Shelling y Smith (1994) *Gene Therapy* 1: 165-169; y Zhou y col. (1994) *J. Exp. Med.* 179: 1867-1875.

[0060] Alternativamente, se pueden escindir las ITR de AAV del genoma vírico o de un vector de AAV que contiene el mismo y fusionarse en 5' y 3' de una construcción de ácido nucleico seleccionada que está presente en

otro vector usando técnicas de ligadura normalizadas, tales como las descritas en Sambrook y col., *más arriba*. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo las ligaduras en Tris-Cl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, 33 µg/ml de BSA, NaCl 10 mM-50 mM, y cualquiera de ATP 40 µM, 0,01-0,02 unidades (Weiss) de ADN ligasa T4 a 0°C (para la ligadura del "extremo pegajoso") o ATP 1 mM, 0,3-0,6 unidades (Weiss) de ADN ligasa T4 a 14°C (para la ligadura del extremo enromado). Las ligaduras intermoleculares del "extremo pegajoso" se llevan a cabo usualmente a concentraciones de 30-100 µg/ml de ADN total (concentración final total de 5-100 nm). Se han descrito vectores de AAV que contienen las ITR en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.139.941. En particular se describen en la anterior algunos vectores de AAV que están disponibles de la American Type Culture Collection ("ATCC") con los Números de Acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226.

[0061] Para los fines de la invención, las células hospedadoras adecuadas para producir viriones de rAAV de los vectores de expresión de AAV incluyen microorganismos, células de levaduras, células de insectos, y células de mamíferos, que pueden ser, o han sido, usadas como receptores de una molécula de ADN heterólogo y que son capaces de crecer en, por ejemplo, un cultivo en suspensión, un biorreactor, o similar. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. De esta manera, una "célula hospedadora" según se usa en el presente documento se refiere generalmente a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se prefieren las células de la línea celular humana estable 293 (disponible fácilmente a través, por ejemplo, de la American Type Culture Collection con el Número de Acceso ATCC CRL1573) en la práctica de la presente invención. Concretamente, la línea celular humana 293 es una línea de células de riñón embrionario humano que se ha transformado con fragmentos de ADN de adenovirus de tipo 5 (Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36: 59), y que expresa los genes E1a y E1b adenovíricos (Aiello y col. (1979) Virology 94: 460). La línea celular 293 se transfecta fácilmente, y proporciona una plataforma particularmente conveniente en la que producir viriones de rAAV.

FUNCIONES AUXILIARES DE AAV

[0062] Las células hospedadoras que contienen los vectores de expresión de AAV anteriormente descritos pueden llegar a ser capaces de proporcionar funciones auxiliares con el fin de replicar y encapsidar las secuencias de nucleótidos flanqueadas por las ITR de AAV para producir viriones de rAAV. Las funciones auxiliares de AAV son generalmente secuencias de codificación derivadas de AAV que se pueden expresar para proporcionar productos génicos de AAV que, a la vez, funcionan *en trans* para la replicación de AAV productiva. En el presente documento, se usan las funciones auxiliares de AAV para complementar las funciones de AAV necesarias que están desapareciendo de los vectores de expresión de AAV. De esta manera, las funciones auxiliares de AAV incluyen una, o ambas de los ORF de AAV principales, concretamente, las regiones de codificación *rep* y *cap*, o los homólogos funcionales de las mismas.

[0063] Por "región de codificación *rep* de AAV" se entiende la región reconocida por la técnica del genoma de AAV que codifica las proteínas de replicación Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Estos productos de expresión de Rep han demostrado poseer muchas funciones, incluyendo el reconocimiento, la unión y la heterosis del origen de replicación del ADN de AAV, la actividad de la ADN helicasa y la modulación de la transcripción de los promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión de Rep se requieren colectivamente para replicar el genoma de AAV. Para una descripción de la región de codificación *rep* de AAV, véanse, por ejemplo, Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158: 97-129; y Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5: 793-801. Los homólogos adecuados de la región de codificación *rep* de AAV incluyen el gen *rep* del virus 6 del herpes humano (VHH-6) que se conoce también por mediar en la replicación del ADN de AAV-2 (Thomson y col. (1994) Virology 204: 304-311).

[0064] Por "región de codificación *cap* de AAV" se entiende la región reconocida por la técnica del genoma de AAV que codifica las proteínas VP1, VP2, y VP3 de la cápsida, o los homólogos funcionales de las mismas. Estos productos de expresión de Cap, suministran las funciones de empaquetamiento que se requieren colectivamente para empaquetar el genoma vírico. Para una descripción de la región de codificación *cap* de AAV, véase, *por ejemplo*, Muzyczka, N. y Kotin, R.M. (*más arriba*).

[0065] Se introducen funciones auxiliares de AAV en la célula hospedadora transfectando la célula hospedadora con una construcción auxiliar de AAV tanto antes de, como en paralelo con, la transfección del vector de expresión de AAV. Se usan de esta manera construcciones auxiliares de AAV para proporcionar la expresión al menos transitoria de los genes *rep* y/o *cap* de AAV para complementar las funciones de AAV que están desapareciendo que son necesarias para la infección de AAV productiva. Las construcciones auxiliares de AAV carecen de las ITR de AAV y ni pueden replicarse ni empaquetarse por sí mismas.

[0066] Estas construcciones pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus, o virión. Se han descrito numerosas construcciones auxiliares de AAV, tales como los plásmidos pAAV/Ad y pIM29+45 frecuentemente usados que codifican los productos de expresión de Rep y Cap. Véanse, por ejemplo, Samulski y col. (1989) J. Virol. 63: 3822-3828; y McCarty y col. (1991) J. Virol. 65: 2936-2945. Se han descrito numerosos vectores adicionales que codifican los productos de expresión de Rep y/o Cap. Véase, por ejemplo, la patente de los

Estados Unidos 5.139.941.

FUNCIONES ACCESORIAS DE AAV

5 **[0067]** La célula hospedadora (o célula de empaquetamiento) debe también volverse capaz de proporcionar funciones no derivadas de AAV, o "funciones accesorias" con el fin de producir viriones de rAAV. Las funciones accesorias son funciones víricas y/o celulares no derivadas de AAV de las cuales AAV es dependiente para su replicación. De esta manera, las funciones accesorias incluyen al menos aquellas proteínas y ARN no de AAV que se requieren en la replicación de AAV, incluyendo aquellas implicadas en la activación de la transcripción génica de AAV, el corte y empalme del ARNm de AAV específico de etapa, la replicación del ADN de AAV, la síntesis de los productos de expresión de Cap y el ensamblaje de la cápsida de AAV. Se pueden derivar las funciones accesorias basadas en virus de cualquiera de los virus auxiliares conocidos.

15 **[0068]** En particular, se pueden introducir funciones accesorias en y expresarse a continuación en células hospedadoras usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Normalmente, se proporcionan funciones accesorias mediante la infección de las células hospedadoras con un virus auxiliar no relacionado. Se conocen numerosos virus auxiliares adecuados, incluyendo adenovirus; virus del herpes tales como los tipos 1 y 2 del virus del herpes simple; y virus vaccinia. Encontrarán uso en el presente documento funciones accesorias no víricas, tales como aquellas proporcionadas mediante sincronización celular usando cualquiera de los diversos agentes conocidos. Véanse, por ejemplo, Buller y col. (1981) J. Virol. 40: 241-247; McPherson y col. (1985) Virology 147: 217-222; Schlehofer y col. (1986) Virology 152: 110-117.

20 **[0069]** Alternativamente, se pueden proporcionar funciones accesorias usando un vector de función accesoria según se ha definido anteriormente. Véanse, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N° 6.004.797 y Publicación Internacional N° WO 01/83797.

25 **[0070]** Se pueden obtener secuencias de ácido nucleico que proporcionan las funciones accesorias de fuentes naturales, tal como del genoma de una partícula de adenovirus o construirse usando procedimientos recombinantes o sintéticos conocidos en la materia. Según se ha explicado anteriormente, se ha demostrado que no se requiere el complemento completo de los genes de adenovirus para las funciones auxiliares accesorias. En particular, se ha demostrado que los adenovirus mutantes incapaces de la replicación de ADN y de la síntesis génica tardía son permisivos para la replicación de AAV. Ito y col., (1970) J. Gen. Virol. 9: 243; Ishibashi y col., (1971) Virology 45: 317. De manera similar, los mutantes comprendidos dentro de las regiones E2B y E3 han demostrado soportar la replicación de AAV, indicando que las regiones E2B y E3 no están probablemente implicadas en proporcionar funciones accesorias. Carter y col., (1983) Virology 126: 505. Sin embargo, los adenovirus defectivos en la región E1, o que tienen una región E4 eliminada, son incapaces de soportar la replicación de AAV. De esta manera, se requieren probablemente las regiones E1A y E4 para la replicación de AAV, tanto directa como indirectamente. Laughlin y col., (1982) J. Virol. 41: 868; Janik y col., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1925; Carter y col., (1983) Virology 126: 505. Otros mutantes Ad caracterizados incluyen: E1B (Laughlin y col. (1982), supra; Janik y col. (1981), *más arriba*; Ostrove y col., (1980) Virology 104: 502); E2A (Handa y col., (1975) J. Gen. Virol. 29: 239; Strauss y col., (1976) J. Virol. 17: 140; Myers y col., (1980) J. Virol. 35: 665; Jay y col., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2927; Myers y col., (1981) J. Biol. Chem. 256: 567); E2B (Carter, Adeno-Associated Virus Helper Functions, en I CRC Handbook of Parvoviruses (P. Tijssen ed., 1990)); E3 (Carter y col. (1983), *más arriba*); y E4 (Carter y col. (1983), *más arriba*; Carter (1995)). Aunque los estudios de las funciones accesorias proporcionados por los adenovirus que tienen mutaciones en la región de codificación E1B han producido resultados conflictivos, Samulski y col., (1988) J. Virol. 62: 206-210, informaron hace poco que se necesitaba E1B55k para la producción de viriones de AAV, mientras que E1B19k no. Además, la Publicación Internacional WO 97/17458 y Matshushita y col., (1998) Gene Therapy 5: 938-945, describen vectores con funciones accesorias que codifican varios genes Ad. Los vectores con funciones accesorias particularmente preferidos comprenden una región de codificación de ARN de adenovirus VA, una región de codificación ORF6 de adenovirus E4, una región de codificación E2A de adenovirus de 72 kD, una región de codificación E1A de adenovirus, y una región E1B de adenovirus que carece de una región de codificación E1B55k intacta. Se describen dichos vectores en la Publicación Internacional N° WO 01/83797.

55 **[0071]** Como consecuencia de la infección de la célula con el virus auxiliar, o la transfección de la célula hospedadora con un vector de función accesoria, las funciones accesorias que se expresan transactivan la construcción auxiliar de AAV para producir proteína Rep y/o Cap de AAV. Los productos de expresión de Rep escinden el ADN recombinante (incluyendo el ADN de interés) del vector de expresión de AAV. Las proteínas Rep sirven también para duplicar el genoma de AAV. Las proteínas Cap expresadas se ensamblan en cápsidas, y el genoma de AAV recombinante se empaqueta en las cápsidas. De esta manera, la replicación de AAV continúa, y el ADN se empaqueta en viriones de rAAV.

PURIFICACIÓN DE VIRIONES DE rAAV

60 **[0072]** Tras la replicación de AAV recombinante, se pueden purificar viriones de rAAV procedentes de la

célula hospedadora usando una variedad de procedimientos de purificación convencionales, tales como cromatografía en columna, gradientes de CsCl, y similares. Por ejemplo, se pueden usar una pluralidad de etapas de purificación de la columna, tales como purificación en una columna de intercambio aniónico, una columna de afinidad y/o una columna de intercambio catiónico. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 02/12455. Además, si se emplea la infección para expresar las funciones accesorias, se puede inactivar el virus auxiliar residual usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, se puede inactivar el adenovirus calentando a temperaturas de aproximadamente 60°C durante, por ejemplo, 20 minutos o más. Este tratamiento inactiva eficazmente únicamente el virus auxiliar debido a que el AAV es extremadamente estable al calor mientras que el adenovirus auxiliar es lábil al calor.

[0073] Se pueden usar vectores de AAV recombinantes que contienen cualquier número de genes indicadores para determinar los títulos infecciosos. Por ejemplo, se puede usar la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa (LacZ), la proteína fluorescente verde, o la luciferasa. Tras cosechar la célula hospedadora transfectada, se formó un lisado rompiendo las células hospedadoras transfectadas usando técnicas adecuadas para la producción a gran escala tales como la microfluidización. A continuación se filtró el lisado (por ejemplo, a través de un filtro de 0,45 μ m), y se purificó usando procedimientos de cromatografía en columna según se describe en el presente documento. Se ha informado también de otras técnicas para determinar el título infeccioso de cualquier vector de AAV. Véase por ejemplo, Zhen y col., "An Infectious Titer Assay for Adeno-associated Virus (AAV) Vectors with Sensitivity Sufficient to Detect Single Infectious Events." Hum. Gene Ther. (2004) En Prensa.

[0074] A continuación se trató la disolución madre de AAV purificada para eliminar las cápsidas vacías usando técnicas de cromatografía en columna. En un procedimiento particularmente preferido de la invención, se obtuvieron preparaciones de rAAV lisando células transfectadas para obtener un lisado celular bruto. A continuación se puede clarificar el lisado celular bruto para eliminar los desechos celulares mediante técnicas bien conocidas en la materia, tales como filtración, centrifugación, y similares, para devolver un lisado celular clarificado. A continuación se aplicó el lisado celular bruto o el lisado celular clarificado, que contiene partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, a una primera columna de intercambio catiónico para separar adicionalmente las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV de la parte celular y de otros componentes presentes en la preparación del lisado celular. Se conocen los procedimientos para llevar a cabo la purificación inicial del lisado celular. Se describe un procedimiento representativo en la Patente de los Estados Unidos N° 6.593.123.

[0075] A continuación se aplicaron las fracciones recogidas de la primera columna de intercambio catiónico a un segundo intercambiador iónico, es decir, una segunda columna de intercambio catiónico y/o una columna de intercambio aniónico, usando diferentes condiciones de elución que separan las cápsidas vacías de AAV de las partículas de vectores de AAV.

[0076] Los intercambiadores catiónicos adecuados para la primera columna de intercambio catiónico y la segunda columna de intercambio catiónico, si se usan, incluyen una amplia variedad de materiales conocidos en la materia. Son particularmente preferidos los intercambiadores catiónicos fuertes capaces de unir viriones de rAAV en un amplio intervalo de pH. Por ejemplo, las matrices de intercambio catiónico carboximetiladas y sulfonadas son particularmente útiles para el uso en el presente documento. Los materiales de matriz útiles incluyen, pero no se limitan a, matrices de celulosa, tales como matrices fibrosas microgranulares y perlicadas; agarosa, dextrano, poliacrilato, polivinilo, poliestireno, sílice y poliéter; y materiales compuestos. Se prefieren particularmente en el presente documento las matrices que contienen el ligando R-SO₃⁻ funcional, preferiblemente resinas de sulfopropilo o sulfoetilo. Las matrices representativas incluyen, pero no se limitan a POROS HS, POROS SP, POROS S (todos los intercambiadores catiónicos fuertes disponibles de Applied Biosystems, Foster City, CA), POROS CM (intercambiador catiónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA), TOSOHAAS TOYOPEARL SP550C and MERCK FRACTOGEL EMD SO3⁻650(m), así como SOURCE 15S, SOURCE 30S, SEPHAROSE SP FF, SEPHAROSE SP XL (todos disponibles de Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

[0077] Para todos los protocolos de cromatografía en columna proporcionados a continuación, se pueden preparar columna usando los protocolos estándares conocidos en la materia con las disoluciones tampón apropiadas. A continuación se cargó la muestra. Para la primera columna de intercambio catiónico usada, las condiciones son tales que las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV se unieron a la resina de la columna y se eluyeron posteriormente de manera conjunta, pero se separaron de otros componentes y desechos celulares presentes en el lisado celular. Por ejemplo, las cápsidas vacías y llenas se eluyeron usando un tampón de fuerza iónica apropiada. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de sodio 10-50 mM, preferiblemente 15-40, tal como 15... 20... 25... 30... 35... 40, etc. El fosfato de sodio mM contiene sal tal como NaCl o KCl a una concentración de, por ejemplo, 100-700 mM, tal como 200-400 mM, por ejemplo, 200... 300... 325... 350... 370... 380... 400, etc., o cualquier concentración comprendida en estos intervalos. El pH del tampón puede estar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 9,5, tal como 4-8, por ejemplo, pH 4... 4,5... 5... 5,5... 6, etc., o cualquier pH comprendido en estos intervalos. Se recogieron las fracciones y a continuación se pueden hacer avanzar en una columna de intercambio aniónico y/o una segunda columna de intercambio catiónico en condiciones de separación.

[0078] Si se utilizó una segunda columna de intercambio catiónico en una etapa posterior para separar las cápsidas vacías de AAV de las partículas de vectores de AAV, se usaron dos tampones de elución, un tampón bajo en sal y un tampón alto en sal. En particular, se separaron las cápsidas vacías de las partículas de vectores de AAV usando un tampón apropiado a un pH de entre aproximadamente pH 6 a pH 12, preferiblemente pH 7 a pH 10, e incluso más preferiblemente pH 7,5 a pH 9,5, tal como pH 7,5... 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5... 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, o cualquier pH entre los intervalos definidos. Se conocen bien en la materia los tampones apropiados e incluyen, sin limitación, tampones con los siguientes iones tampón: ácido acético; ácido malónico; MES; fosfato; HEPES, BICINE y similares. Para eluir la muestra, se aumentó la fuerza iónica del tampón de partida usando una sal, tal como NaCl, KCl, sulfato de amonio o cualquier otra sal que contenga sulfato, formiato, acetato, citrato, y/o fosfato. En una realización de la invención, se trató la columna en primer lugar con una concentración baja de sal, por ejemplo, 10-200 mM de acetato de amonio, tal como 20... 25...30... 35... 40... 45... 50... 55... 60... 65... 100 mM, o cualquier concentración comprendida dentro de estos intervalos. Este tratamiento dio como resultado la elución de partículas de vectores de AAV de la resina de la columna. Posteriormente, se trató la columna con una concentración más elevada de sal con el fin de eluir las cápsidas vacías de AAV. Un ejemplo para uso como el segundo tampón es acetato de amonio con una concentración de 10-800 mM, preferiblemente 500-700 mM, tal como 500... 550... 600... 650... 700... 800 mM, o cualquier concentración comprendida dentro de estos intervalos definidos. Usando estas condiciones, las partículas de vectores de AAV eluyen inicialmente en las fracciones y más tarde en las partículas vacías.

[0079] Según se ha explicado anteriormente, en una realización alternativa de la invención, se aplicó la preparación de la primera columna de intercambio catiónico a una columna de intercambio aniónico tanto en lugar de cómo adicionalmente en la segunda columna de intercambio catiónico. Si se utiliza una columna de intercambio aniónico además de la segunda columna de intercambio catiónico, se puede usar tanto antes como posteriormente a la segunda columna de intercambio catiónico. Además, se puede usar una segunda columna de intercambio aniónico después de la primera columna de intercambio aniónico. Se conocen numerosos intercambiadores aniónicos adecuados para uso con la presente invención, e incluyen sin limitación, MACRO PREP Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de BioRad, Hercules, CA); UNOSPHERE Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de BioRad, Hercules, CA); POROS 50HQ (intercambiador aniónico fuerte disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA); POROS 50D (intercambiador aniónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA); POROS 50PI (intercambiador aniónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA); SOURCE 30Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); DEAE SEPHAROSE (intercambiador aniónico débil disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Q SEPHAROSE (intercambiador aniónico fuerte disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

[0080] La columna de intercambio aniónico se equilibró en primer lugar usando tampones normalizados y según las especificaciones del fabricante. Por ejemplo, se puede equilibrar la columna con, por ejemplo, un tampón de fosfato de sodio 5 a 50 mM, preferiblemente 7-20 mM, tal como 10 mM. A continuación se cargó la muestra y se usaron dos tampones de elución, un tampón bajo en sal y un tampón alto en sal. Se recogieron las fracciones tras los lavados con los tampones bajo en sal y alto en sal y se detectó la proteína en las fracciones usando técnicas normalizadas, tales como la vigilancia de la absorción del UV a 260 y 280 nm. Usando un intercambiador aniónico, los picos de las proteínas del eluato más bajo en sal contienen las cápsidas vacías de AAV y las fracciones más elevadas en sal contienen las partículas de vectores de AAV.

[0081] En particular, en la columna de intercambio aniónico, se separaron las cápsidas de las partículas de vectores de AAV usando un tampón apropiado a un pH de entre aproximadamente pH 5 a pH 12, preferiblemente pH 6 a pH 10, e incluso de manera más preferible pH7 a pH 9,5, tal como pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4...8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5...9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, o cualquier pH entre los intervalos definidos. Se conocen bien en la materia los tampones apropiados para el uso con las columnas de intercambio aniónico y son general mente catiónicos o de ión híbrido en la naturaleza. Dichos tampones incluyen, sin limitación, tampones con los siguientes iones tampón: N-metilpiperazina; piperazina; Bis-Tris; Bis-Tris propano; Trietanolamina; Tris; N-metildietanolamina; 1-3-diaminopropano; etanolamina; ácido acético, y similares. Para eluir la muestra, se aumenta la fuerza iónica del tampón de partida usando una sal, tal como NaCl, KCl, sulfato, formiato o acetato, a un pH apropiado.

[0082] En una realización de la invención, se trató en primer lugar la columna de intercambio aniónico con una concentración baja de sal, por ejemplo, 10-100 mM de NaCl, tal como 10... 20... 25... 30... 35... 40... 45... 50... 55... 60... 65... 100 mM, o cualquier concentración comprendida en estos intervalos. Tras el tratamiento inicial, se trató la columna a continuación con una concentración más elevada de sal con el fin de eluir las cápsidas vacías, tal como una concentración más elevada de NaCl, o con otro tampón con una fuerza iónica mayor. Un ejemplo para uso como el segundo tampón es un tampón de acetato de sodio o un tampón basado en Tris con una concentración de 100-300 mM, preferiblemente 125-200 mM, tal como 125... 130... 140... 150... 160... 170... 180...190... 200 mM, o cualquier concentración comprendida dentro de estos intervalos definidos. Después que se eluyeron las cápsidas vacías de la columna, se pudieron recuperar las partículas de vectores de AAV usando una concentración más elevada de sal. Un ejemplo para uso como el tampón de elución es tampón Tris 10 mM que contiene acetato de sodio a una concentración en el intervalo de 100-500 mM, preferiblemente 130-300 mM, tal como 100... 130... 150...

200... 250... 300... 350... 400... 450... 500 mM, o cualquier concentración comprendida dentro de estos intervalos definidos.

5 **[0083]** Usando las técnicas descritas anteriormente se pueden separar más de un 90% de la cápsidas vacías de AAV de las partículas de vectores de AAV. Además, se consiguió fácilmente una elevada recuperación de partículas de vectores de AAV, es decir, se pueden recuperar más de un 10%, preferiblemente más de un 25%, incluso de manera más preferible más de un 50%, tal como más de un 60% de partículas de vectores de AAV.

10 **[0084]** Se conocen en la materia los procedimientos para probar las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV con genomas empaquetados. Véanse, por ejemplo, Grimm y col., Gene Therapy (1999) 6: 1322-1330; Sommer y col., Molec. Ther. (2003) 7: 122-128. Para probar la cápsida desnaturalizada, los procedimientos incluyen someter la disolución madre de AAV tratada a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, consistente en algún gel capaz de separar las tres proteínas de cápsidas, por ejemplo, un gradiente de gel que contiene Tris-acetato al 3-8% en el tampón, a continuación, hacer avanzar el gel hasta que se separa el material de la muestra, y transferir el gel en membranas de nailon o nitrocelulosa, preferiblemente nailon. A continuación se usaron anticuerpos dirigidos contra la cápsida del AAV como los anticuerpos primarios que se unen a las proteínas de la cápsida desnaturalizada, preferiblemente un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cápsida del AAV, lo más preferible el anticuerpo monoclonal B1 dirigido contra AAV-2 (Wobus y col., J. Virol. (2000) 74: 9281-9293). A continuación se usó un anticuerpo secundario, que se une con el anticuerpo primario y contiene un medio para detectar la unión con el anticuerpo primario, más preferiblemente, un anticuerpo dirigido contra IgG que contenía una molécula de detección unida covalentemente a éste, lo más preferible un anticuerpo de oveja dirigido contra IgG de ratón unido covalentemente a peroxidasa de rábano picante. Se usó un procedimiento de detección que determina semicuantitativamente la unión entre los anticuerpos primario y secundario, preferiblemente un procedimiento de detección capaz de detectar emisiones de isótopos radioactivos, radiación electromagnética, o cambios colorimétricos lo más preferible, un kit de detección de quimioluminiscencia.

20 **[0085]** Para ensayar el título infeccioso, los procedimientos incluyen la siembra de aproximadamente 100.000 células hospedadoras, preferiblemente de origen humano, lo más preferible células HeLa, en placas de cultivo de tejido tratadas, preferiblemente placas de cultivo de tejido tratadas de 24 pocillos, y se incubaron durante aproximadamente 24 horas después que el adenovirus, preferiblemente el adenovirus serotipo 2, y se añadió la disolución madre de rAAV tratada a las células hospedadoras. Las células hospedadoras, el adenovirus, y la disolución madre de rAAV, se dejaron incubar durante 24 horas, después de los cual las células hospedadoras se fijaron, preferiblemente con formaldehído y glutaraldehído, y se tiñeron con un agente apropiado que detectará el transgen expresado en el rAAV; por ejemplo, con rAAV-LacZ, se contemplo X-gal como el agente de tinción. Se conocen bien en la materia otros agentes de otros genes indicadores. Se conocen bien en la materia más procedimientos generales para determinar los títulos de infectividad de vectores que contienen algún transgen. Véase, por ejemplo, Zhen et al., "An Infectious Titer Assay for Adenoassociated Virus (AAV) Vectors with Sensitivity Sufficient to Detect Single Infectious Events." Hum. Gene Ther. (2004) En Prensa.

40 **3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

[0086] A continuación, se muestran ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente a objeto ilustrativo, y no se pretende en ningún modo que limiten el alcance de la presente invención.

45 **[0087]** Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc., pero debería, por supuesto, asumirse, algún error y desviación experimental.

50 **MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS:**

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE rAAV

55 **[0088]** Se produjeron viriones de AAV recombinante que contenían el gen que codificaba el factor IX humano (rAAV-hFIX) mediante el procedimiento de transfección triple descrito en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6.001.650 y 6.004.797. Los plásmidos usados fueron el plásmido de función accesoria 'pladeno5', el plásmido de función auxiliar de AAV 'pHLP19', y el plásmido de AAV recombinante 'phFIX-16'. Se usaron células 293 de riñón embrionario humano (HEK) como células hospedadoras para la producción de viriones de rAAV.

60 **[0089]** Se cosecharon las células 293 transfectadas aproximadamente 72 horas después de la transfección y se rompieron mediante microfluidización usando un Microfluidizer™ (Microfluidics International Corp., Newton, MA) y se recogió el lisado bruto y se filtró a través de filtros en serie para eliminar los desechos celulares para crear un lisado celular clarificado A continuación se introdujo el lisado celular clarificado en una columna POROS 50HS para purificar las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías de AAV de otros componentes celulares. Las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías se eluyeron de la columna POROS 50HS usando un tampón

que contenía fosfato de sodio 20 mM, NaCl 370 mM, pH 5,5. La preparación de AAV que contenía las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías se diluyó 2 veces para reducir la concentración de sal y se purificó adicionalmente a través de una columna Q SEPHAROSE, se recogieron en flujo pistón las partículas de vectores y las cápsulas vacías de AAV, y se llevó a cabo la concentración y el intercambio del tampón usando técnicas de ultrafiltración y diafiltración.

[0090] El producto final purificado en la columna POROS 50HS contenía las cápsidas vacías de AAV, así como las partículas de vectores de AAV que contenían genomas de vectores recombinantes. Con el fin de generar muestras de control de cada una, se añadió cloruro de cesio al material purificado de la columna POROS 50HS a una densidad de 1,41 g/ml con mezcla, y a continuación se sometió a ultracentrifugación a 45.00 rpm usando un rotor Ti 70 durante 23 horas. Se arrastraron las bandas visiblemente vacías y las de partículas de vectores de AAV usando jeringuillas por separado. Las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV purificadas se dializaron por separado frente a un tampón compuesto por fosfato de sodio 10 mM pH 7,4, NaCl 140 mM y sorbital al 5% usando casetes de diálisis (Pierce) a 4°C con tres intercambios de tampón.

RESINAS Y CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA:

[0091] Se probaron varios tipos de resinas de cromatografía que incluían de intercambio aniónico, resinas de intercambio catiónico, una resina de cromatofocalización y resinas de interacción hidrófoba (HIC), para su potencial de separar cápsidas vacías de AAV y partículas de vectores de AAV. Se usó un manguito de alto rendimiento para el cribado de la resina. Se empaquetaron las resinas en una columna vacía desechable con una altura de lecho de 3 cm (Bio-Rad Laboratories) que se instalaron en un manguito. Se equilibraron las columnas usando un tampón que contenía fosfato de sodio 10 mM. Los vectores de AAV del lisado de células HEK293 clarificado se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y las cápsidas vacías se diluyeron a continuación en tampón de equilibrio de la columna a una concentración de NaCl (sal) de 50 mM y a continuación se introdujeron en las columnas. Se lavaron las columnas con el tampón de equilibrio en primer lugar y se lavaron adicionalmente con tampón que contenía fosfato de sodio 10 mM y NaCl 40 mM pH 7,4 (lavado bajo en sal) para lavar los materiales no unidos. A continuación se trataron las columnas con tampón de elución que contenía fosfato de sodio 10 mM y NaCl 1 M (Lavado alto en sal). Los materiales arrastrados mediante lavado usando el lavado bajo en sal se recogieron como una fracción, y los materiales eluidos usando el lavado alto en sal se recogieron como una fracción separada.

[0092] Tras el cribado inicial usando columnas desechables, la cromatografía en columna a una escala más grande llevada a cabo en una columna BIOCAD 700 (Applied Biosystems), se usó para investigar adicionalmente resinas y condiciones prometedoras. Se empaquetaron columnas XK16Glass (Amersham Pharmacia) con diferentes resinas usando procedimientos de empaquetamiento en flujo constante con una velocidad lineal de 150 cm/hora. Se programaron los parámetros de cromatografía usando diversos procedimientos (véanse los detalles en cada resultado de experimento). En general, los programas contienen bloques funcionales de equilibrio de columna, carga de muestra, lavado bajo en sal, gradiente lineal o en etapas y una etapa de limpieza alta en sal. Se vigilaron las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías eluidas en varias fracciones y se analizaron usando las técnicas descritas a continuación.

SDS-PAGE Y TRANSFERENCIA WESTERN:

[0093] Se obtuvieron muestras de fracciones de la columna y se calentaron en tampón de carga de SDS-PAGE que contenía agente reductor (DTT), y se resolvieron las proteínas de la cápsida en geles de poliacrilamida en gradiente pre-cast (Novex). Se llevó a cabo la tinción de plata usando SilverXpress (Invitrogen, CA) según las instrucciones del fabricante. De manera similar, se llevó a cabo el análisis de transferencia Western tras la transferencia de proteínas resuelta mediante SDS-PAGE en membranas de nitrocelulosa. Se usó un anticuerpo monoclonal (B1, American Research Products, MA) como el anticuerpo primario para detectar las proteínas de la cápsida de AAV (VP1 VP2 y VP3) mediante transferencia Western. Se usó anticuerpo de oveja dirigido contra IgG de ratón conjugada con HRP (Promega, WI) como anticuerpo secundario y se detectó mediante el kit ECL (Amersham, Reino Unido).

PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

[0094] Se midió la concentración de genomas de vectores de AAV (vg) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Se diluyeron las muestras y se digirieron con DNasa I para eliminar el ADN exógeno. Tras inactivación de la DNasa, se diluyeron las muestras adicionalmente y se amplificaron usando cebadores y una sonda fluorogénica TaqMan™ específica de la secuencia de ADN entre los cebadores. Se midió el número de ciclos necesario para alcanzar un nivel definido de fluorescencia (ciclo umbral, Ct) para cada muestra en un Sistema de Detección de Secuencias Prsim 7700 de Applied Biosystems. Se empleó ADN plásmido que contenía secuencias idénticas a la contenida en el vector de AAV para generar una curva patrón en la reacción Q-PCR. Los valores Ct obtenidos de las muestras se usaron para determinar el título del genoma del vector normalizando éste al valor del Ct de la curva patrón del plásmido.

EJEMPLO 1**PROPIEDADES DE UNIÓN DE LAS CÁPSIDAS VACÍAS Y DE LAS PARTÍCULAS DE VECTORES DE AAV CON GENOMAS EMPAQUETADOS**

[0095] Para probar si las partículas de vector de AAV se unieron a las columnas de intercambio aniónico, se cribaron algunas resinas usando una técnica de manguito de alto rendimiento. El lisado celular del cultivo de células 293 que contenía partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías se diluyó usando tampón de fosfato de sodio 20 mM para reducir la concentración de NaCl a aproximadamente 50 mM y se introdujo en cada columna. A continuación se lavaron las columnas y se eluyeron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las muestras recogidas se sometieron a Transferencia Western para detectar la distribución de partículas de AAV en las fracciones. Según se muestra en las Figuras 1^a y 1B, el anticuerpo monoclonal específico de la proteína de la cápsida de AAV detectó proteínas únicamente en las fracciones de elución con una elevada concentración de sal (NaCl 1M) (Figura 1, Banda 3, 5, 7 y 9). Estos datos indicaron claramente que las partículas de vectores de AAV y las cápsidas vacías se unieron a todas las resinas de intercambio aniónico (intercambiadores débiles y fuertes) cribadas.

EJEMPLO 2**DIFERENCIAS DE CARGA ENTRE CÁPSIDAS VACÍAS Y PARTÍCULAS DE VECTORES DE AAV**

[0096] Las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV se separaron usando centrifugación en gradiente de CsCl. Las cápsidas vacías dieron como resultado una banda visible a una densidad más elevada de sal (aproximadamente 1,3 g/cc) y las partículas de vectores de AAV se distribuyeron como una banda visible a una densidad de sal más elevada (1,38-1,41 g/cc). Se prepararon las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV según se ha descrito anteriormente y se introdujeron en las columnas por separado. Se usaron tres resinas, Q SEPHAROSE, POROS 50HQ y UNOSPHERE Q, para los ciclos de la cromatografía en columna que se llevaron a cabo usando los mismos programas para comparar los perfiles de elución entre las partículas vacías y llenas. Las cápsidas vacías de AAV eluyeron a una concentración más baja de sal (eluyeron en las fracciones más iniciales) en comparación con las partículas de vectores de AAV (que eluyeron en las fracciones finales); se observó este fenómeno en las tres resinas aniónicas probadas. En el caso de la resina UNOSPHERE Q, las cápsidas vacías se eluyeron en la fracción 10 en un gradiente salino de NaCl de 0 a 500 mM, mientras que las partículas de vectores de AAV se eluyeron en la fracción 11; en el caso de la columna Q SEPHAROSE, las cápsidas vacías se eluyeron en las fracciones 11, 12 y 13 mientras que las partículas de vectores de AAV se eluyeron en las fracciones 13, 14 y 15. Se observó el mismo fenómeno con la columna POROS 50HQ cuando se usó un gradiente más bajo de concentración de acetato de sodio; las cápsidas vacías se eluyeron en las fracciones 30 a 36, mientras que las partículas de vectores de AAV se eluyeron en las fracciones 36 a 40. Estos datos indican claramente que existen diferencias de carga fundamentales entre las cápsidas vacías de AAV y las partículas de vectores de AAV y que se pueden separar las dos poblaciones usando estas propiedades mediante técnicas de cromatografía en columna. Confirmando la separación de las cápsidas vacías y de las partículas de vectores de AAV mediante por estas resinas, la relación de la absorción UV a 260 nm/280 nm aumentó gradualmente en las fracciones eluidas, de manera consistente con la elución diferencial (eluyendo en primer lugar las cápsidas vacías que tienen una relación 260/280 menor debido a que carecen de ADN).

EJEMPLO 3**EFECTO DE RESINAS Y SALES SOBRE LA EFICACIA Y RESOLUCIÓN DE LA ELUCIÓN ENTRE LAS CÁPSIDAS VACÍAS Y LAS PARTÍCULAS DE VECTORES DE AAV**

[0097] Las resinas cribadas en este procedimiento fueron todas resinas de intercambio aniónico, pero presentaron diferencias (densidad de carga, tamaño y composición de la perla, etc.). La eficacia en la unión y en la separación de las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV varió de resina a resina. Las cápsidas vacías eluyeron usando NaCl 110 nM en la columna Q SEPHAROSE. En contraste, fue suficiente NaCl aproximadamente 65 mM para eluir las cápsidas vacías usando la columna UNOSPHERE, y en el caso de la columna POROS HQ, fue suficiente NaCl 130 mM para eluir las cápsidas vacías.

[0098] Se usaron también algunas sales diferentes en los estudios de los perfiles de elución. Se sometieron cloruro de sodio, acetato de sodio, acetato de amonio y citrato de sodio a comparaciones entre sí. Usando el mismo programa para llevar a cabo los ciclos de cromatografía en columna, se retrasó la elución de las cápsidas vacías de algunas fracciones cuando se usaron acetato de sodio o acetato de amonio en comparación con cloruro de sodio, sugiriendo que diferentes sales tienen diferentes propiedades en la cromatografía en columna aniónica y se pueden usar estas propiedades para potenciar la resolución en la separación de las cápsidas vacías de las partículas de vectores de AAV.

EJEMPLO 4**DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELUCIÓN DE LAS CÁPSIDAS VACÍAS**

5 **[0099]** Basándose en los datos experimentales discutidos anteriormente, se usó la columna POROS 50HQ para desarrollar una técnica basada en la cromatografía en columna para separar las cápsidas vacías de las partículas de vectores de AAV. Las cápsidas vacías preparadas usando centrifugación en gradiente de CsCl según se ha descrito anteriormente se introdujeron en una columna empaquetada con resina POROS 50HQ. En ciclos separados, tras las etapas de lavado iniciales con concentraciones bajas de sal (NaCl 50 mM), se lavó la columna tanto con acetato de sodio 150 mM, acetato de sodio 160 mM o acetato de sodio 170 mM. Se eluyeron las cápsidas vacías más eficazmente cuando se usó NaAc 170 mM. En un ciclo separado de cromatografía usando el mismo perfil de elución de sal, las partículas de vectores de AAV permanecieron en la columna y a continuación se eluyeron cuando se aplicó una concentración lineal de sal usando una concentración más elevada de cloruro de sodio.

EJEMPLO 5**SEPARACIÓN DE CÁPSIDAS VACÍAS DE LAS PARTÍCULAS DE VECTORES DE AAV USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO**

20 **[0100]** Para demostrar que se podrían separar las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV usando técnicas de cromatografía en columna, se mezclaron juntas las cápsidas vacías y las partículas de AAV purificadas. Se mezclaron 3 ml de cápsidas vacías con una concentración de $9E+13$ partículas/ml con 2 ml de partículas llenas con la concentración de $7E+12$ genomas de vectores (vg)/ml. Se diluyeron los materiales adicionalmente 3 veces usando tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,4. Se introdujeron 14 ml de este material diluido en una columna POROS 50HQ con un volumen de lecho de 20 ml. Se usó el perfil de elución de la cromatografía en columna descrito anteriormente, y los datos indicaron que las cápsidas vacías se eluyeron en la condición salina de acetato de sodio 170 mM mientras que las partículas de vectores de AAV permanecieron en la columna y se eluyeron a continuación usando un gradiente lineal de sal de NaCl. El modelo de absorción de UV (relación 260:280 nm) de material eluido de la columna durante el curso de la separación fue completamente consistente con y demostró además la separación eficaz de las cápsidas vacías de las partículas de vectores de AAV. Las diversas fracciones eluidas de la columna se analizaron adicionalmente usando el análisis ELISA, Q-PCR, SDS-PAGE y DO de las cápsidas. Todos los datos obtenidos indicaron que la separación de las cápsidas vacías de las partículas de vectores de AAV fueron completos y que la relación de partículas a genomas de vectores en la fracción de partículas de vectores de AAV fue de 1:1. De esta manera, las partículas de vectores de AAV se separaron completamente de las cápsidas vacías, a pesar de que el material de partida (introducido en la columna) contenía aproximadamente 16 veces más cápsidas vacías que partículas de vectores (Figura 2).

EJEMPLO 6**EFFECTO DEL pH EN LA SEPARACIÓN DE LAS CÁPSIDAS VACÍAS DE LAS PARTÍCULAS DE VECTORES DE AAV USANDO LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO**

45 **[0101]** Para desarrollar un procedimiento completo de purificación basado en columna para eliminar las cápsidas vacías, se aplicaron viriones recuperados de una columna de intercambio catiónico (POROS HS) que contenían cápsidas vacías y partículas de vectores de AAV a la columna POROS 50HQ. Cuando se usó un procedimiento similar para separar las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV de muestras purificadas con CsCl, no se obtuvo una separación clara como la observada para las muestras prepurificadas y mezcladas en gradiente de CsCl, aunque los dos tipos de partículas permanecieron distinguibles, es decir, se observó una separación parcial, pero incompleta de las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV. Se ensayaron algunos parámetros que pueden afectar la resolución de la cromatografía en columna para optimizar la eficacia de la separación. Entre los parámetros ensayados, se encontró que el pH aumentó la resolución de la separación significativamente. Se probaron tampones con pH 7,4, pH 8,0, pH 8,5 y pH 9,0. Se eliminaron selectivamente las cápsidas vacías de AAV en las fracciones iniciales de la columna cuando se usaron pH más elevados, tales como pH 9,0, en el procedimiento, mientras que las partículas de vectores de AAV eluyeron en una concentración más elevada de sal en las fracciones finales. Usando pH 9,0, se eliminaron las cápsidas vacías como un pico individual con el modelo de firma de absorción de UV de señal de UV 280 más elevada y de señal de UV260 más baja. En contraste, el segundo pico contenía las partículas de vectores de AAV y mostró el modelo opuesto de absorción de UV, dominando UV260 sobre UV280, según se esperaba para las partículas llenas de vectores de AAV que contenían ADN. La observación se confirmó adicionalmente mediante los ensayo de Q-PCR y SDS-PAGE, indicando que el segundo pico contenía las partículas de vectores de AAV y el primer pico las cápsidas vacías.

EJEMPLO 7**PROCEDIMIENTO PARA SEPARAR CÁPSIDAS VACÍAS DE AAV DE PARTÍCULAS DE VECTORES DE AAV USANDO CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO**

5 [0102] Basándose en la observación descrita anteriormente, se diseñó un procedimiento para separar cápsidas vacías de AAV de las partículas de vectores de AAV usando tampón basado en Tris a pH 8,5 y una resina de columna POROS 50HQ en una columna de vidrio XK-16 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). Los materiales eluidos en los segmentos iniciales contenían las cápsidas vacías y los segmentos finales las partículas de vectores de AAV según se indicó mediante los modelos de absorción de UV. Esto se confirmó adicionalmente mediante análisis Q-PCR. Se analizaron los vectores que eluyeron a una concentración más elevada de sal en SDS-PAGE para determinar la pureza. Se determinaron los genomas de los vectores mediante Q-PCR y se cargaron muestras replicadas en SDS-PAGE y se tiñeron mediante tinción de plata. Para servir como control, se purificaron viriones de rAAV que contenían únicamente partículas de vectores de AAV usando técnicas de centrifugación en gradiente de CsCl y se hicieron avanzar los mismos genomas de vectores en los geles de SDS-PAGE.

10 [0103] Usando estas técnicas, se recuperó aproximadamente el 60% del vector. El vector recuperado estaba esencialmente exento de cápsidas vacías (<10 de la partículas fueron cápsidas vacías) basándose en el análisis de la tinción de plata de la SDS-PAGE (Figura 3). Según se muestra en la Figura 3, no hubo diferencias significativas en la densidad de banda (correspondiente a la proteína total) entre el control del vector exento de cápsidas vacías (banda 1) y el vector contenido en las fracciones eluidas de la columna (bandas 2-5), cuando se cargaron todas las bandas con un número igual de genomas de vectores.

EJEMPLO 8**SEPARACIÓN DE CÁPSIDAS VACÍAS DE PARTÍCULA DE VECTORES DE AAV USANDO LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE INTERCAMBIO CATIONICO**

25 [0104] Se investigó también la cromatografía en columna de intercambio catiónico para su potencial de separar cápsidas vacías de partículas de vectores de AAV. La preparación de AAV de la primera columna de intercambio catiónico (descrita en la sección de materiales y procedimientos) que contenía las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV, se aplicó a una resina POROS HS. La columna se equilibró en primer lugar con tampón de fosfato de sodio 20 mM que contenía NaCl 200 mM a pH 7,4. La preparación de AAV que contenía partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías obtenidas de la primera columna de intercambio catiónico se diluyó usando fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4 para reducir la concentración salina a aproximadamente NaCl 200 mM. A continuación se introdujo este material en la columna POROS HS. A continuación se aplicó a la columna un gradiente de acetato de amonio de 500 a 700 mM que contenía Tris 10 mM a pH 8,5. Usando este gradiente el protocolo de elución, las partículas de AAV eluyeron en primer lugar, y se separaron eficazmente de las cápsidas vacías que se eluyeron a una concentración más elevada de acetato de amonio. Se observó este contraste en la separación usando la resina de intercambio aniónico (Ejemplo 7 anterior) en el que las cápsidas vacías se eluyeron a una concentración de sal más baja con respecto a las partículas de vectores de AAV.

30 [0105] Se proporcionó información adicional con respecto a los modelos de unión y de elución de las cápsidas vacías y las partículas de vectores de AAV en la columna de intercambio catiónico mediante la absorbancia de UV del eluato de la columna. Por ejemplo, cuando se hizo avanzar la columna de intercambio catiónico a pH 8,5, el cromatógrafo demostró un modelo de absorbancia del UV con absorción a 260 nm (correspondiente a las partículas de vectores de AAV) dominante, en las fracciones iniciales y una absorción a 280 nm (correspondiente a las cápsidas vacías) dominante en las fracciones de elución finales. Según se muestra en la Figura 4, cuando los mismos genomas de vectores se sometieron al análisis de la tinción de plata de la SDS-PAGE, la cantidad de proteína aumentó significativamente de las fracciones iniciales a las fracciones finales, indicando que las fracciones iniciales contenían menos cápsidas vacías.

35 [0106] Basándose en estas observaciones, se puede conseguir la separación de las cápsidas vacías de AAV de las partículas de vectores de AAV (que contienen ADN) usando la cromatografía de intercambio catiónico. La Figura 5 muestra un gel SDS-PAGE que demuestra la separación. A continuación se introdujo en la columna de intercambio catiónico una preparación de vectores de AAV que contenía cápsidas vacías y partículas de vectores de AAV eluidas de una columna de intercambio catiónico (en la que no se usaron las condiciones requeridas para conseguir la separación) y se eluyó en un gradiente por etapas usando acetato de amonio. Se identificaron las fracciones que contenían genomas de vectores usando la Q-PCR, y se sometieron alícuotas de estas fracciones al análisis de la tinción de plata de la SDS-PAGE. Es claro que las señales de proteínas en las fracciones eluidas contenían menos señal de proteína por entrada de vg con respecto al material que se introdujo en la segunda columna, demostrando que se eliminaron las cápsidas vacías de las partículas de vectores de AAV. Se muestran en la banda 2 a la 4 los vectores eluidos de los tres experimentos independientes, indicando la consistencia y repetitibilidad de las observaciones.

[0107] De esta manera, se describen los procedimientos para separar cápsidas vacías de partículas de vectores de AAV.

5 **[0108]** Los aspectos preferidos del uso de la presente invención se describen a continuación y se refieren como los aspectos E1 a E15.

E1. Un procedimiento para purificar partículas de vectores de AAV procedentes de una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, para proporcionar un producto sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV, comprendiendo dicho procedimiento:

- 10 a) proporcionar una célula hospedadora que comprende partículas de vectores de AAV;
 b) lisar dicha célula hospedadora para obtener un lisado celular bruto que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
 15 c) aplicar dicho lisado celular bruto a una primera columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;
 d) eluir dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV en condiciones de no separación para proporcionar una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
 20 e) aplicar la preparación de AAV procedente de (d) a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;
 f) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (e) en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV se eluyen y las cápsidas vacías de AAV permanecen unidas a la columna; y
 25 g) recoger las fracciones eluidas de (f) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

E2. El procedimiento de E1, en el que dicha primera columna de intercambio catiónico comprende una matriz carboximetilada o sulfonada.

30 E3. El procedimiento de E2, en el que dicha matriz comprende el ligando funcional R-SO₃⁻.

E4. El procedimiento de E1 en el que dicha segunda columna de intercambio catiónico comprende una matriz carboximetilada o sulfonada.

35 E5. El procedimiento de E4, en el que dicha matriz comprende el ligando funcional RSO₃⁻.

E6. El procedimiento de E1, que comprende además:

- 40 h) aplicar las fracciones de la etapa (g) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y las cápsidas de AAV, si están presentes, se unen a la columna;
 i) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (h) en condiciones en las que las cápsidas vacías de AAV se eluyen y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;
 j) añadir un tampón alto en sal a la columna de (i) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV;
 45 k) recoger las fracciones de (j) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

E7. Un procedimiento para purificar partículas de vectores de AAV procedentes de una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV, comprendiendo dicho procedimiento:

- 50 a) proporcionar una célula hospedadora que comprende partículas de vectores de AAV;
 b) lisar dicha célula hospedadora para obtener un lisado celular bruto que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
 55 c) clarificar dicho lisado celular bruto para proporcionar un lisado celular clarificado;
 d) aplicar dicho lisado celular clarificado a una primera columna de cromatografía de intercambio catiónico que comprende una matriz con el ligando funcional R-SO₃⁻, en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías se unen a la columna;
 e) eluir dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV en condiciones de no separación para proporcionar una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;
 60 f) aplicar la preparación de AAV procedente de (e) a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;
 g) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (f) en condiciones en las que las

partículas de vectores de AAV se eluyen y las cápsidas vacías de AAV permanecen unidas a la columna;

h) recoger las fracciones eluidas de (g) que comprenden partículas de vectores de AAV;

i) aplicar las fracciones de la etapa (h) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, si están presentes, se unen a la columna;

j) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (i) en condiciones en las que las cápsidas vacías de AAV se eluyen y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;

k) añadir un tampón alto en sal a la columna de (j) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV; y

l) recoger las fracciones eluidas de (k) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

E8. Un procedimiento para purificar partículas de vectores de AAV procedentes de una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV, comprendiendo dicho procedimiento:

a) proporcionar una célula hospedadora que comprende partículas de vectores de AAV;

b) lisar dicha célula hospedadora para obtener un lisado celular bruto que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;

c) aplicar dicho lisado celular bruto a una columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;

d) eluir dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV en condiciones de no separación para proporcionar una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV;

e) aplicar la preparación de AAV procedente de (d) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;

f) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (e) en condiciones en las que las cápsidas vacías de AAV se eluyen y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;

g) añadir un tampón alto en sal a la columna de (f) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV;

h) recoger las fracciones eluidas de (g) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

E9. El procedimiento de E8, que comprende además:

i) aplicar la preparación de AAV procedente de (h) a una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV, si están presentes, se unen a la columna;

j) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (i) en condiciones en las que las cápsidas vacías de AAV se eluyen y las partículas de vectores de AAV permanecen unidas a la columna;

k) añadir un tampón alto en sal a la columna de (j) en condiciones en las que se eluyen las partículas de vectores de AAV;

l) recoger las fracciones eluidas de (k) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

E10. El procedimiento de E8, que comprende además:

i) aplicar la preparación de AAV de (h) a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico en condiciones en las que dichas partículas de vectores de AAV y dichas cápsidas vacías de AAV se unen a la columna;

j) añadir un tampón bajo en sal a la columna de (i) en condiciones en las que las partículas de vectores de AAV se eluyen y las cápsidas vacías de AAV permanecen unidas a la columna; y

k) recoger las fracciones eluidas de (j) que comprenden partículas de vectores de AAV para proporcionar un producto de AAV sustancialmente exento de cápsidas vacías de AAV.

E11. El procedimiento de cualquiera de E1-10 en el que las partículas de vectores de AAV están presentes en dicho producto de AAV en una cantidad de al menos el 75%.

E12. El procedimiento de cualquiera de E1-10, en el las partículas de vectores de AAV están presentes en dicho producto de AAV en una cantidad de al menos el 85%.

E13. El procedimiento de cualquiera de E1-10, en el que las partículas de vectores de AAV están presentes en dicho producto de AAV en una cantidad de al menos el 90%.

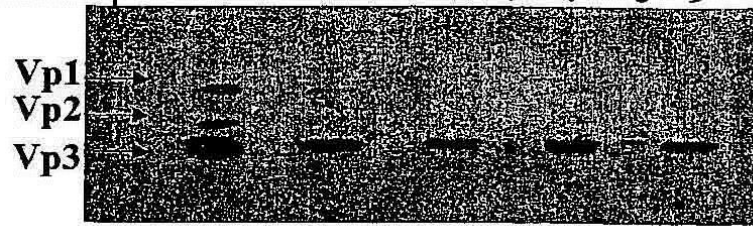
E14. El procedimiento de cualquiera de E1-10, en el que dichas partículas de vectores de AAV se derivan de AAV-2.

E15. El procedimiento de cualquiera E1-10, en el que dichas partículas de vectores de AAV se derivan de AAV-5.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de cromatografía de intercambio aniónico o catiónico para separar partículas de vectores de AAV de cápsidas vacías de AAV.
2. Uso de cromatografía de intercambio aniónico o catiónico para reducir el número de cápsidas vacías de AAV en una preparación de AAV que comprende partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV, en el que dicha preparación de AAV es preferiblemente una disolución madre purificada de viriones de AAV.
- 10 3. Uso, según la reivindicación 2, en el que dicha cromatografía de intercambio aniónico o catiónico reduce el número de cápsidas vacías de AAV en una preparación de AAV, de manera que las partículas de vectores de AAV comprenden al menos aproximadamente el 75%, preferiblemente al menos aproximadamente el 85%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, de los viriones de AAV que están presentes en la preparación.
- 15 4. Uso de cromatografía de intercambio aniónico o catiónico para purificar partículas de vectores de AAV de una mezcla de partículas de vectores de AAV y cápsidas vacías de AAV.
- 20 5. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha cromatografía de intercambio aniónico o catiónico es cromatografía de intercambio aniónico.
6. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha cromatografía de intercambio aniónico o catiónico es cromatografía de intercambio catiónico.

A: Banda: pm 1 2 3 4 5 6 7 8 9



B: Banda: pm 1 2 3 4 5 6 7 8 9

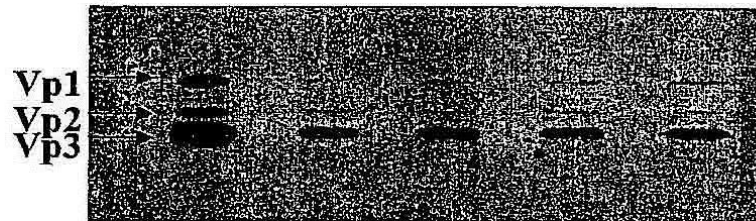


FIG. 1

| Muestras | Cápsidas/ml | Vgs/ml | Relación de cápsida/vg |
|--------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------------|
| Materiales de partida** | 1,07E+13 | 6,47E+11 | 16,56 |
| Fracción 25*** | 9,59E+10 | 1,05E+11 | 0,92 |

FIG. 2

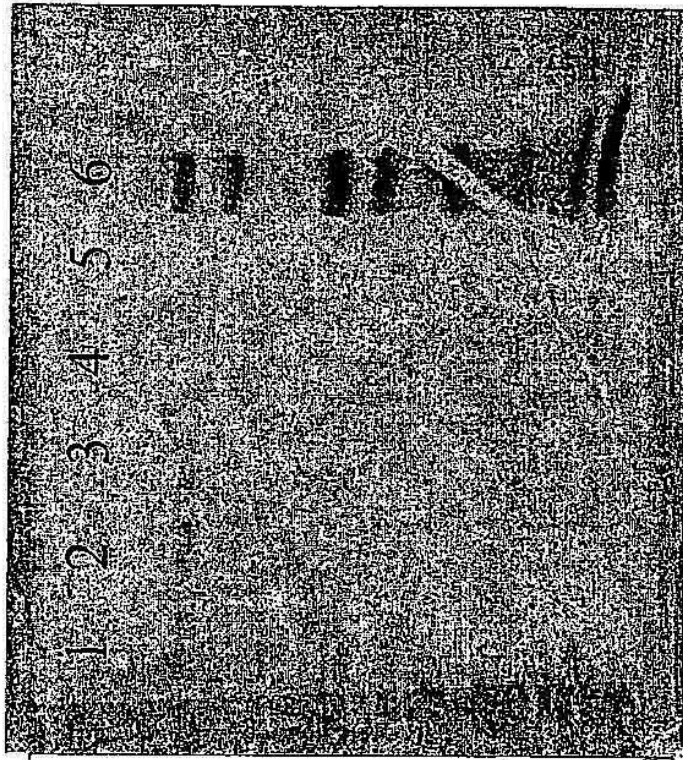


FIG. 3

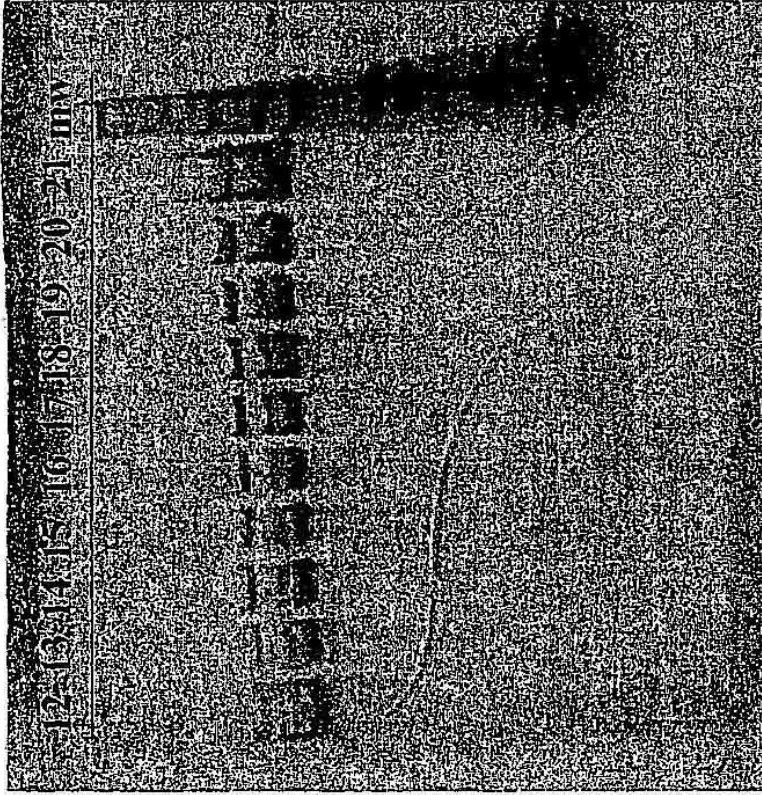


FIG. 4

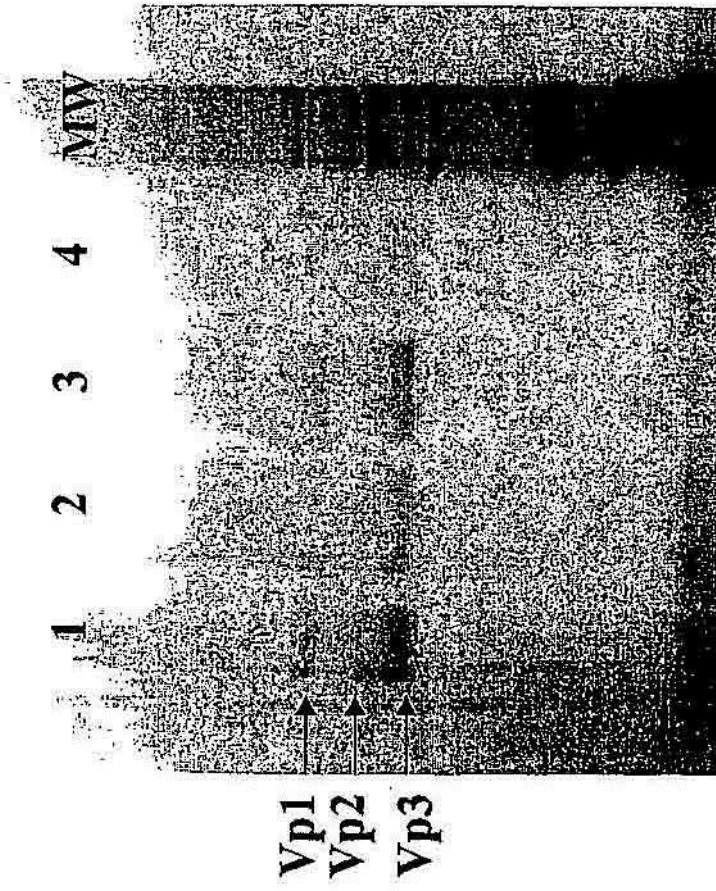


FIG. 5