

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 540**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.1999 E 07024137 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1930418**

54 Título: **Métodos para generar preparados exentos de helper de alto título de vectores de AAV recombinantes liberados**

30 Prioridad:

04.09.1998 US 142474

10.03.1999 US 123685 P

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

21.07.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 541 540 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

Métodos para generar preparados exentos de helper de alto título de vectores de AAV recombinantes liberados

DECLARACIÓN DE DERECHOS PARA INVENCIONES REALIZADAS BAJO INVESTIGACIÓN PATROCINADA FEDERALMENTE

- 5 Esta invención se realizó en parte durante el trabajo con el apoyo de una subvención del Instituto Nacional de la Salud (NIH – National Institute of Health) R44DK4460. El Gobierno puede tener ciertos derechos en esta invención.

CAMPO TÉCNICO

- 10 La presente invención se refiere en general al campo de vectores de virus adeno-asociados (AAV) recombinantes y de preparados adeno-asociados de los mismos que pueden ser utilizados para la transferencia génica. Más específicamente, se refiere a métodos para generar preparados con alto título de vectores de AAV recombinantes que están sustancialmente exentos de virus helper (p. ej., adenovirus) así como proteínas celulares por la liberación de partículas virales a partir de células productoras sin lisis celular.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

- 15 Los virus adeno-asociados (AAV) tienen características únicas que los hacen atractivos como vectores para la terapia génica. Los virus adeno-asociado infectan a una amplia gama de tipos de células. Sin embargo, son no-transformadores y no están implicados en la etiología de enfermedad humana alguna. La introducción de ADN a células huésped del receptor conduce generalmente a la persistencia y expresión del ADN a largo plazo sin perturbar el metabolismo normal de la célula.

- 20 Existen al menos tres características deseables de un preparado de un vector de AAV recombinante para su uso en la transferencia de genes, especialmente en la terapia génica humana. En primer lugar, se prefiere que el vector deba ser generado en títulos suficientemente elevados para transducir una proporción eficaz de células en el tejido diana. La terapia génica *in vivo* requiere típicamente un número elevado de partículas de vector. Por ejemplo, algunos tratamientos pueden requerir más de 10^8 partículas, y el tratamiento de la fibrosis quística por entrega directa a las vías aéreas puede requerir más de 10^{10} partículas. En segundo lugar, se prefiere que los preparados de vector deben estar esencialmente exentos de AAV competente para la replicación (es decir, fenotípicamente AAV de tipo salvaje que puede ser replicado en la presencia virus helper o de funciones de virus helper). En tercer lugar, se prefiere que el preparado de vector de rAAV como un todo esté esencialmente libre de otros virus (tales como un virus helper utilizado en la producción de AAV), así como virus helper y proteínas celulares y otros componentes tales como lípidos e hidratos de carbono, con el fin de minimizar o eliminar cualquier riesgo de generar una respuesta inmune en el contexto de la terapia génica. Este último punto es especialmente importante en el contexto del AAV, ya que el AAV es un virus "helper-dependiente" que requiere la co-infección con un virus helper (típicamente adenovirus) u otro suministro de funciones de virus helper con el fin de ser replicado y empaquetado eficazmente durante el proceso de producción de AAV; y, además de ello, se ha observado que adenovirus generan una respuesta inmune del huésped en el contexto de aplicaciones de terapia génica (véase, p. ej., Byrnes et al, Neuroscience 66:1015, 1995; McCoy et al, Human Gene Therapy 6:1553, 1995; y Barr et al, Gene Therapy 2:151,1995). Los métodos de la presente invención abordan estas y otras características deseables de preparados de vector rAAV, según se describe e ilustra en detalle más adelante.

- 40 Comentarios generales de virología AAV y genética están disponibles en otros documentos. El lector puede referirse, entre otros, a Carter, "Handbook of Parvoviruses", vol. I, págs. 169-228 (1989), y Berns, "Virology", págs. 1743-1764, Raven Press, (1990). AAV es un virus defectuoso en la replicación, lo que significa que se basa en un virus helper con el fin de completar su ciclo de replicación y empaquetamiento en una célula huésped. Virus helper capaces de apoyar la replicación de AAV están ejemplificados por adenovirus, pero incluyen otros virus tales como herpes y virus de la viruela. El genoma de AAV comprende generalmente los genes de empaquetamiento *rep* y *cap*, proporcionándose otras funciones necesarias *en trans* a partir del virus helper y la célula huésped.

- 45 A modo de ilustración, el genoma lineal de serotipo AAV2 termina en cada extremo por una secuencia de repetición terminal invertida (ITR). Entre las ITRs hay tres promotores de la transcripción p5, p19 y p40, que se utilizan para expresar los genes *rep* y *cap* (Laughlin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5567-5571). Las secuencias ITR son requeridas *in cis* y son suficientes para proporcionar un origen funcional de la replicación, una integración en el genoma de la célula y una escisión y rescate eficaces de los cromosomas de la célula huésped o plásmidos

recombinantes. Los productos de los genes *rep* y *cap* proporcionan funciones para la replicación y encapsidación del genoma viral, respectivamente, y es suficiente con que estén presentes en *trans*.

5 Genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos por procesos tales como formación de colas en CG (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), la adición de enlazadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasas de restricción (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) o por ligamiento directo de extremos romos (Senapathy y Carter, 1984, J Biol. Chem., 259:4661-4666). La transfección de estos plásmidos recombinantes de AAV en células de mamífero con un virus helper apropiado resulta en el rescate y la escisión del genoma de AAV libre de cualquier secuencia de plásmido, la replicación del genoma rescatado y la generación de la progenie de partículas de AAV infecciosas.

10 Vectores de AAV recombinantes que comprenden un polinucleótido heterólogo de interés terapéutico se pueden construir mediante la sustitución de partes de la secuencia de codificación de AAV en plásmidos bacterianos con el polinucleótido heterólogo. Principios generales de la construcción del vector de rAAV también se revisan en otros documentos. Véase, p. ej., Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 3:533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbiol. and Immunol., 158:97-129). Las ITRs de AAV son generalmente retenidas, ya que el empaquetamiento del vector requiere que estén presentes en *cis*. Sin embargo, se pueden omitir otros elementos del genoma de AAV, en particular uno o más de los genes de empaquetamiento. El plásmido vector puede ser empaquetado en una partícula de AAV mediante el suministro de los genes de empaquetamiento omitidos en *trans* a través de una fuente alternativa. Un cierto número de publicaciones describen diversos enfoques para la producción de vectores de rAAV. Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al, J. Virol, 62:1963 (1988); Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al, J. Virol, 63:3822-3828 (1989); Flotte et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349 (1992); patente de EE.UU. 5.173.414; documento WO 95/13365 (Targeted Genetics Corporation y Johns Hopkins University) y la correspondiente patente de EE.UU. n° 5.658.776 (por Flotte et al.); documento WO 95/13392 (Trempe et al.); documento WO 96/17947 (por Targeted Genetics Corporation, J. Allen).

25 Ya que son particularmente útiles altos títulos de preparados de vector de rAAV, pero la producción de altos títulos de rAAV, en particular en los procesos a gran escala, puede conducir a la generación de cantidades significativas de virus helper contaminantes (p. ej., adenovirus o "Ad"), proteínas de virus helper (p. ej., proteínas "Ad"), y/o proteínas celulares, se hizo especialmente importante diseñar métodos expansibles para la producción de rAAV que se pueden utilizar para la generación de preparados de alto título que están sustancialmente exentos de virus contaminantes y/o proteínas virales o celulares.

35 Se han descrito métodos para generar preparados de alto título de vectores de AAV recombinantes. La solicitud de patente internacional N° PCT/US98/18600 describe el cultivo de una línea celular que puede producir un vector de rAAV después de la infección con un virus helper; infectar las células con un virus helper, tal como adenovirus; y lisar las células. AAV y otros métodos y sistemas de producción virales también se describen, por ejemplo, en los documentos WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4: 609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132.

40 Métodos de la técnica anterior utilizados para producir partículas de AAV recombinante utilizando células de empaquetamiento requerían una etapa de lisis celular debido a la creencia generalizada de que el AAV no se libera de las células productoras en cantidad apreciable alguna sin lisar las células. Véase, por ejemplo, Chirico y Trempe (1998), J. Viral. Methods 76: 31-41. Sin embargo, el lisado de células contiene diversos componentes celulares que deben ser separados del vector de rAAV antes de que sea adecuado para su uso *in vivo*.

45 La presente descripción proporciona métodos para lograr una producción de altos títulos de vectores de rAAV liberados de una célula productora y sin lisar la o las células, y demuestra que tales técnicas se pueden emplear para la producción a gran escala de preparados de vectores de AAV recombinantes.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

COMPENDIO DE LA INVENCION

50 Esta descripción proporciona métodos y materiales para generar preparados de alto título de virus adeno-asociados (AAV) que están sustancialmente exentos de virus helper, proteínas de virus helper y proteínas celulares y otros componentes. Los métodos implican la liberación de partículas de rAAV de células productoras sin lisar activamente las células como es típico en la técnica, lo cual proporciona una ventaja clara y significativa frente a los métodos de

producción descritos anteriormente. Los métodos son también aplicables a virus que son no líticos y/o que generalmente no son liberados (es decir, virus sin brotes).

5 Por consiguiente, en un aspecto, la descripción proporciona métodos para generar una población de partículas de virus tales como partículas de virus adeno-asociado recombinante (rAAV), que comprende la etapa de: a) incubar una célula productora en un medio de cultivo celular en condiciones que fomentan la liberación de partículas de rAAV de la célula, con lo que las partículas de rAAV son liberadas de la célula productora al medio de cultivo, y en donde la célula productora comprende (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un vector de rAAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido heterólogo no AAV flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y (iii) un virus helper para AAV o una función de virus helper para AAV. 10 Las partículas de rAAV liberados pueden entonces ser recogidas, o recolectadas, del medio de cultivo. Las condiciones que fomentan la liberación de partículas virales de rAAV se describen en esta memoria e incluyen, pero no se limitan a pH, osmolalidad, oxígeno disuelto, medios enriquecidos y temperatura.

15 En algunas realizaciones, los métodos incluyen, además, diversas etapas de purificación y/o inactivación. En algunas de estas realizaciones, el método comprende, además, las etapas de: cromatografiar el sobrenadante de células productoras de AAV en una pluralidad de resinas de intercambio iónico que comprende al menos una resina de intercambio aniónico cargada positivamente y al menos una resina de intercambio catiónico cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV, o cromatografiar el sobrenadante de células productoras de AAV en una resina de intercambio aniónico, seguido de filtración en flujo tangencial (TFF). La cromatografía de sulfato de heparina también se puede utilizar para purificar adicionalmente el virus. 20

25 En los métodos de la invención, el cultivo de células puede llevarse a cabo de manera que las células están en suspensión o en condiciones que fomentan la adherencia de las células a un soporte sólido. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la célula productora se cultiva en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un matraz de cultivo de tejidos, una botella de rodillos, un matraz de agitación, un reactor de tanque, un fermentador y un biorreactor, un reactor con pletina, un sistema de fibras huecas, un reactor de lecho empaquetado y, opcionalmente, utilizando un microsoposte.

30 En algunos aspectos de la descripción, preparados de vectores de AAV recombinantes producidos por los métodos resultan en una población purificada de partículas de vector de rAAV que está sustancialmente exenta de AAV competente para la replicación y de proteínas de virus helper y celulares, así como sustancialmente exenta de ADN celular.

35 La presente descripción proporciona, además, una población de partículas de rAAV, producida de acuerdo con cualquiera de los métodos de producción de esta invención. Preferiblemente, la población de partículas contiene no más de aproximadamente una partícula de adenovirus infecciosa por cada mil partículas infecciosas de rAAV, preferiblemente menos de una por cada 10^6 rAAV, aún más preferiblemente menos de aproximadamente una en 10^9 , incluso más preferiblemente menos de aproximadamente uno de cada 10^{10} .

Estas y otras realizaciones de la invención se describen en la descripción que sigue.

La presente invención se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Las Figuras 1A y 1B son gráficos de barras que representan los resultados de dos experimentos separados, expresados como (partículas resistente a DNasa (DRP) por célula en los diversos niveles de pH. Los cultivos celulares se mantuvieron a los niveles de pH indicados, y los lisados celulares se analizaron el día 2 (barras en negro) y el día 3 (barras rayadas) post-infección.

45 Las Figuras 2A y 2B son gráficos de barras y representan los resultados, expresados como DRPs totales, de producción de rAAV, el día 2 (2A) y el día 3 (2B) post-infección, en biorreactores mantenidos a diversos niveles de pH. Los porcentajes encima de cada una de las barras son porcentajes de DRPs totales en el lisado celular. La parte en negro de cada una de las barras representa DRPs en lisados celulares, mientras que la parte sombreada de cada una de las barras representa las DRPs en el medio de cultivo celular. Los porcentajes por encima de cada una de las barras indican el porcentaje de DRPs totales en el lisado celular.

50 Las Figuras 3A y 3B son gráficos de barras que representan las unidades de replicación totales (RU), el día 2 (3A) y el día 3 (3B) post-infección, en los medios de cultivo (parte sombreada de cada una de las barras) y lisados celulares

(parte en negro de cada una de las barras) cuando los cultivos se mantuvieron a los niveles de pH indicados. Los porcentajes por encima de cada una de las barra indican el porcentaje de las RU totales en el lisado celular.

5 La Figura 4 es un gráfico de barras que representa la relación partícula:infectividad (P/I) de partículas de rAAV recolectadas de lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 3 post-infección de biorreactores mantenida a los niveles de pH indicados.

10 Las Figuras 5A, 5B y 5C son gráficos de barras que representan las DRPs totales en lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medios de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (5A), día 3 (5B) y día 4 (5C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad de partida indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barra indican el porcentaje de DPRs totales en el lisado celular.

15 Las Figuras 6A, 6B y 6C son gráficos de barras que representan las RUs totales en lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (6A), día 3 (6B) y día 4 (6C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad de partida indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barras indican el porcentaje de las RUs totales en los lisados celulares.

La Figura 7 es un gráfico de barras que representa la relación P/I de partículas de rAAV en medios de cultivo celular los días 3 y 4 de cultivos del biorreactor con las osmolalidades de partida indicadas.

20 Las Figuras 8A-C son gráficos de barras que representan las DRPs totales en lisados celulares (parte negra de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (8A), día 3 (8B) y día 4 (8C) post-infección en biorreactores en los que se mantuvo el medio de cultivo celular a la temperatura indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barras indican el porcentaje de DPRs totales en el lisado celular.

25 Las Figuras 9A, 9B, y 9C son gráficos de barras que representan las RUs totales en lisados celulares (parte negra de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (9A), día 3 (9B) y día 4 (9C) post-infección en biorreactores en los que se mantuvo el medio de cultivo celular a la temperatura indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barras en la Figura 9A indican el porcentaje de las RUs totales en el medio de cultivo celular. Los porcentajes por encima de cada una de las barras en la Figura 9A indican el porcentaje de las RUs totales en el lisado celular.

30 La Figura 10 es un gráfico de barras que representa las DPRs totales en los medios de cultivo, tres días post-infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

La Figura 11 es un gráfico de barras que representa las RUs en los medios de cultivo, tres días post-infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

35 La Figura 12 es un gráfico de barras que representa la relación P/I de partículas virales en el medio de cultivo celular cuando los cultivos se cultivaron en los diversos medios indicados.

La Figura 13 proporciona composiciones de aminoácidos y vitaminas para los suplementos de medios que se describen en el Ejemplo 6.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

40 Los autores de la invención han descubierto métodos para generar preparados de alto título de virus adeno-asociados (AAV) que están sustancialmente exentos de virus helper, proteínas de virus helper y proteínas celulares y otros componentes. Los métodos generalmente implican cultivar (que generalmente implican mantener) células productoras en condiciones que fomenten la liberación de partículas de rAAV de las células productoras.

45 Está bien establecido en el campo de los AAV que el AAV no es liberado de la célula a menos que se lise la célula, sino que permanece en el núcleo de la célula. Por consiguiente, la creencia generalizada y universal es que, con el fin de producir partículas de rAAV, las células deben ser lisadas. En contraposición con las enseñanzas del sector, los autores de la invención han descubierto que partículas de rAAV pueden ser liberadas a partir de células sin lisar las células y, además, que la liberación de partículas de rAAV se puede aumentar manteniendo las células productoras bajo diversas condiciones del entorno controladas. Utilizando estas condiciones, las partículas de rAAV

5 se pueden producir en títulos más altos que los obtenidos previamente. Las células cultivadas en las condiciones descritas en esta memoria producen más virus por célula y liberan más virus en el medio de cultivo e, incluso de forma más significativa, pueden liberar una población de AAV con una mayor infectividad que el AAV que queda retenido dentro de la célula. En otras palabras, la relación de partícula resistente a ADNasa a infectividad puede ser menor en la población de AAV liberados en el medio de cultivo celular en comparación con esta relación de AAV retenido dentro de la célula (véase, p. ej., la Figura 4). Además, puesto que la lisis no es una etapa obligatoria en los métodos de la presente invención, las partículas de rAAV se pueden recoger a partir del sobrenadante celular, simplificando así subsiguientes etapas de purificación opcionales. Alternativamente, también podría llevarse a cabo una lisis.

10 En algunos aspectos, la descripción proporciona métodos de liberación, o de liberación preferencial, de partículas virales infecciosas. Esta liberación preferencial de partículas infecciosas es particularmente significativa en el contexto de la producción viral, en el que es altamente deseable producir una población que contiene un gran número de partículas infecciosas en contraposición a partículas no infecciosas.

15 Se entiende que los métodos y principios descritos en esta memoria son aplicables a un número de otros virus que normalmente quedan retenidos (es decir, no son liberados), particularmente adenovirus. AAV se ejemplifica en esta memoria.

20 Se describen en detalle más adelante diversos métodos para la generación y el procesamiento de partículas de AAV en células de mamífero, e ilustraciones del uso de técnicas de este tipo se proporcionan en los Ejemplos que siguen. Las partículas de rAAV producidas por los métodos de esta invención son particularmente útiles como vectores de transferencia génica. Métodos de uso de este tipo de vectores son conocidos en la técnica y no necesitan ser descritos en esta memoria.

25 A modo de introducción, es típico emplear una célula huésped o "productora" para la replicación y el empaquetamiento del vector de rAAV. Una célula productora de este tipo (habitualmente una célula huésped de mamífero) comprende generalmente o está modificada para que comprenda varios tipos diferentes de componentes para la producción de rAAV. El primer componente es un genoma del vector viral adeno-asociado recombinante (rAAV) (o "pro-vector de rAAV") que puede ser replicado y empaquetado en partículas de vector por parte de la célula de empaquetamiento huésped. El pro-vector de rAAV comprenderá normalmente un polinucleótido heterólogo (o "transgén"), con el que se desea alterar genéticamente otra célula en el contexto de la terapia génica (dado que el empaquetamiento de un transgén de este tipo en partículas de vector de rAAV puede ser utilizado con eficacia para suministrar el transgén a una diversidad de células de mamífero). El transgén está flanqueado preferiblemente por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV que comprenden secuencias que son reconocidas durante la escisión, la replicación y el empaquetamiento del vector de AAV, así como durante la integración del vector en un genoma de la célula huésped. Un segundo componente es un virus helper que puede proporcionar funciones helper para la replicación del AAV. Aunque el adenovirus se emplea comúnmente, también se pueden utilizar otros virus helper como es conocido en la técnica. Alternativamente, las funciones de virus helper requeridas se pueden aislar genéticamente de un virus helper y los genes codificantes se pueden utilizar para proporcionar funciones de virus helper *en trans*. Los elementos de vectores de AAV y el virus helper (o funciones de virus helper) pueden introducirse en la célula huésped ya sea simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Los componentes finales para la producción de AAV a proporcionar en la célula productora son "genes de empaquetamiento de AAV" tales como los genes *rep* y *cap* de AAV que proporcionan proteínas de replicación y encapsidación, respectivamente. Se pueden proporcionar varias versiones diferentes de genes de empaquetamiento de AAV (incluidas las casetes *rep-cap* de tipo salvaje, así como casetes *rep* y/o *cap* modificadas capitalización en las que los genes *rep* y/o *cap* pueden ser dejados bajo el control de los promotores nativos u operativamente enlazados a promotores heterólogos). Tales genes de empaquetamiento de AAV se pueden introducir ya sea de manera transitoria o de manera estable en la célula de empaquetamiento huésped tal como se conoce en la técnica y se describe con mayor detalle más adelante.

50 Siguiendo los métodos de la invención, partículas de rAAV son liberadas en el medio de cultivo celular ("sobrenadante") a partir de células intactas (es decir, no lisadas). Después de cultivar las células huésped bajo condiciones que permitan la replicación de AAV, la encapsidación y liberación, el sobrenadante puede ser procesado para generar preparados de alto título de virus adeno-asociados (AAV) que están sustancialmente exentos de virus helper, proteínas de virus helper, proteínas celulares y, de manera significativa, el ADN celular. Se proporcionan a continuación descripciones detalladas de técnicas de procesamiento y protocolos ilustrativos que emplean este tipo de técnicas.

Definiciones

Un "vector", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una macromolécula o asociación de macromoléculas que comprende o se asocia con un polinucleótido y que puede ser utilizado para mediar en el suministro del polinucleótido a una célula. Vectores ilustrativos incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores virales, liposomas y otros vehículos de suministro de genes.

5 "AAV" es una abreviatura para virus adeno-asociado, y puede ser utilizada para referirse al propio virus o a derivados del mismo. El término abarca todos los subtipos y formas que se producen tanto de forma natural como recombinantes, excepto cuando sea requerido de otro modo. La abreviatura "rAAV" se refiere a virus adeno-asociado recombinante, al que también se alude como un vector de AAV recombinante (o "vector de rAAV").

10 Un "vector de rAAV", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un vector de AAV que comprende una secuencia de polinucleótidos no de origen AAV (es decir, un polinucleótido heterólogo para AAV), típicamente una secuencia de interés para la transformación genética de una célula. En construcciones de vectores preferidos de esta invención, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, preferiblemente dos secuencias de repetición terminal invertidas (ITRs) de AAV. La expresión vector de rAAV abarca tanto partículas de vector de rAAV como plásmidos de vector de rAAV.

15 Una "partícula de vector de rAAV" o "partícula de rAAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV (preferiblemente por todas las proteínas de la cápside de un AAV de tipo salvaje) y un vector de rAAV encapsidado. Así, la producción de partículas de rAAV incluye necesariamente la producción de un vector de rAAV dado que un vector de este tipo está contenido dentro de una partícula de rAAV.

20 "Empaquetamiento" se refiere a una serie de eventos intracelulares que resultan en el ensamblaje y la encapsidación de una partícula de AAV.

Genes "*rep*" y "*cap*" de AAV se refieren a secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas de replicación y encapsidación de virus adeno-asociados. Se han encontrado en todos los serotipos de AAV examinados, y se describen a continuación y en la técnica. A *rep* y *cap* de AAV se les alude en esta memoria como "genes de empaquetamiento" de AAV.

25 Un "virus helper" para AAV se refiere a un virus que permite que AAV (p. ej., AAV de tipo salvaje) sea replicado y empaquetado por una célula de mamífero. En la técnica se conoce una diversidad de virus helper de este tipo para AAV, incluyendo adenovirus, virus herpes y virus de la viruela tales como virus vacuna. Los adenovirus abarcan un cierto número de diferentes subgrupos, aunque el más comúnmente utilizado es Adenovirus tipo 5 del subgrupo C. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, de origen mamífero no humano y aviar y están disponibles en depósitos tales como ATCC. Los virus de la familia herpes incluyen, por ejemplo, virus herpes simplex (HSV) y virus de Epstein-Barr (EBV), así como citomegalovirus (CMV) y virus de la pseudorrabia (PRV); que también están disponibles en depósitos tales como ATCC.

35 "Función o funciones de virus helper" se refiere a la función o funciones codificadas en un genoma de virus helper que permiten la replicación y el empaquetamiento de AAV (en unión con otros requisitos para la replicación y el empaquetamiento descritos en esta memoria). Tal como se describe en esta memoria, "función de virus helper" puede ser proporcionada en un cierto número de maneras, que incluyen proporcionar virus helper o proporcionar, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos que codifican la o las funciones requeridas a una célula productora en trans.

40 El término "tsHV" se refiere a un virus helper sensible a la temperatura, que puede proporcionar funciones helper para la replicación y el empaquetamiento de AAV, pero que es sensible a la temperatura con respecto a su propia replicación (es decir, se puede replicar a una temperatura "permissiva", pero replica a menor eficiencia o, preferiblemente, no replica en absoluto, a una temperatura "no permissiva"). La capacidad de la tsHV para proporcionar ayuda para la replicación de AAV también puede ser sensible a la temperatura, pero tsHV preferidos para uso con esta invención apoyan eficazmente la replicación de AAV a temperaturas a las que AAV puede replicar, pero que son no permisivas para la replicación del tsHV. Ejemplos de tales tsHV se describen más adelante.

50 Un virus o partícula viral "infecciosa" es uno que comprende un componente de polinucleótido que es capaz de ser suministrado en una célula para la cual la especie viral es trófica. El término no implica necesariamente una capacidad de replicación del virus. Los ensayos para el recuento de partículas virales infecciosas se describen en otra parte en esta descripción y en la técnica. La infectividad viral puede expresarse como la relación P:I, o la relación de partículas víricas totales a partículas virales infectivas.

Un virus "competente para la replicación" (p. ej. un AAV competente para la replicación) se refiere a un virus fenotípicamente de tipo salvaje que es infeccioso y que también es capaz de replicarse en una célula infectada (es decir, en presencia de un virus helper o funciones de virus helper). En el caso de AAV, la competencia para la replicación requiere generalmente la presencia de genes de empaquetamiento de AAV funcionales. Vectores de rAAV preferidos, según se describe en esta memoria, son incompetentes para la replicación en células de mamífero (especialmente en células humanas) en virtud de la falta de uno o más genes de empaquetamiento de AAV. Preferiblemente, dichos vectores de rAAV carecen de cualquier secuencia de genes de empaquetamiento de AAV con el fin de minimizar la posibilidad de que la replicación de AAV competente se genere mediante recombinación entre genes de empaquetamiento de AAV y un vector de rAAV entrante. Preparados de vector de rAAV preferidos según se describe en esta memoria son aquellos que contienen pocos o ningún AAV competente para la replicación (rcAAV) (preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^2 partículas de rAAV, más preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^4 partículas de rAAV, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^8 partículas de rAAV, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^{12} partículas de rAAV, más preferiblemente nada de rcAAV).

"Liberación" de partículas de rAAV significa que las partículas de rAAV penetran en el medio de cultivo celular a partir de una célula productora intacta, es decir, la partícula de rAAV es liberada sin lisis la célula. Se entiende que, en un cultivo de células productoras dado, algunas células lisan, por ejemplo, tras la muerte de la célula. Sin embargo, esta invención proporciona métodos que fomentan la liberación de partículas de rAAV sin llevar a cabo la lisis celular deliberada tal como se hace típicamente en la técnica. Los términos "liberación" y "secreción" a partir de una célula productora se utilizan indistintamente en esta memoria.

La expresión "condición que fomenta la liberación de partículas de rAAV" de una célula productora, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una condición para el cultivo de células productoras que conduce a una liberación incrementada o mejorada de partículas de rAAV de la célula productora en el medio de cultivo. En esta memoria se describen condiciones que fomentan la liberación de rAAV de la célula productora en el medio de cultivo, y son generalmente, pero no necesariamente, las condiciones que mejoran el metabolismo celular. "Fomentar la liberación" de partículas de rAAV desde una célula productora al medio de cultivo significa que la liberación de rAAV de la célula productora se incrementa cuando se compara con la liberación de rAAV desde una célula productora no cultivado bajo la o las condiciones del entorno que potencian la liberación. El incremento puede ser cualquier incremento detectable tal como al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente 35%, más preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 60%, más preferiblemente al menos aproximadamente 65%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 100%, o 2 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces. Como es bien conocido en la técnica, cuando una población de células se cultiva bajo una condición de cultivo de partida dado, los subproductos metabólicos de las células cambiarán determinadas condiciones de cultivo, tales como el pH y la osmolalidad. En condiciones del entorno que fomentan la liberación de partículas de rAAV, uno o más de estos parámetros se controla según sea necesario, es decir, se monitoriza a intervalos regulares y se ajusta para mantener el parámetro dentro de un intervalo adecuado (es decir, un intervalo que fomenta la liberación). La configuración y/o el control de estas condiciones será discutido con mayor detalle más adelante.

El término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, y puede estar interrumpido por componentes no nucleótidos. Si está presente, modificaciones en la estructura de los nucleótidos pueden ser impartidas antes o después del ensamblaje del polímero. El término polinucleótido, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere indistintamente a moléculas de doble hebra y de una sola hebra. A menos que se especifique o requiera de otra manera, cualquier aspecto de la descripción descrito en esta memoria que es un polinucleótido abarca tanto la forma de doble hebra como cada una de dos formas de una sola hebra complementarias conocidas o previstas para constituir la forma de doble hebra.

Un "gen" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar una proteína particular después de ser transcrito y traducido.

"Recombinante", tal como se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligamiento, y otros procesos que resultan en una construcción que es distinta de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que

comprende un polinucleótido recombinante. Los términos y expresiones incluyen, respectivamente, réplicas de la construcción de polinucleótido original y la progenie de la construcción de virus original.

5 Un "elemento de control" o "secuencia de control" es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuyen en la regulación funcional de un polinucleótido, incluyendo la replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar a la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso, y puede ser mejoradora o inhibidora por naturaleza. Elementos de control conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, las secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz, bajo determinadas condiciones, de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificadora que normalmente se encuentra aguas abajo (en la dirección 3') del promotor.

15 "Enlazado operativamente" o "enlazado de forma operable" se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos, en donde los elementos están en una relación que les permite operar de la manera esperada. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente a una región codificadora si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificadora. Puede haber residuos intermedios entre el promotor y la región codificadora, siempre que se mantenga esta relación funcional.

20 Un "vector de expresión" es un vector que comprende una región que codifica un polipéptido de interés, y se utiliza para efectuar la expresión de la proteína en una célula diana pretendida. Un vector de expresión comprende también elementos de control enlazados operativamente a la región codificadora para facilitar la expresión de la proteína en la diana. A la combinación de elementos de control y un gen o genes a los que están enlazados operativamente para la expresión se les alude a veces como una "casete de expresión", un gran número de los cuales son conocidos y están disponibles en la técnica o pueden construirse fácilmente a partir de componentes que están disponibles en la técnica.

25 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido introducido por técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor separado de su secuencia codificadora nativa y enlazado operativamente a una secuencia codificadora con la que no se encuentra vinculada de forma natural es un promotor heterólogo.

30 "Alteración genética" se refiere a un proceso en el que un elemento genético es introducido en una célula que no sea por mitosis o meiosis. El elemento puede ser heterólogo a la célula, o puede ser una copia adicional o versión mejorada de un elemento ya presente en la célula. La alteración genética puede efectuarse, por ejemplo, por transfección de una célula con un plásmido recombinante u otro polinucleótido a través de cualquier proceso conocido en la técnica tal como electroporación, precipitación con fosfato de calcio o puesta en contacto con un complejo de polinucleótido-liposoma. La alteración genética también puede efectuarse, por ejemplo, por transducción o infección con un virus de ADN o ARN o vector viral. Preferiblemente, el elemento genético se introduce en un cromosoma o mini-cromosoma en la célula; pero cualquier alteración que cambie el fenotipo y/o genotipo de la célula y su progenie se incluye en este término.

40 Se dice que una célula está "establemente" alterada, transducida o transformada con una secuencia genética si la secuencia está disponible para realizar su función durante el cultivo prolongado de la célula in vitro. En ejemplos preferidos, dicha célula está alterada "de forma hereditaria" debido a que se introduce una alteración genética que también es heredable por la progenie de la célula alterada.

45 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en esta memoria para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación o conjugación con un componente de marcaje. Polipéptidos tales como "CFTR", "p53", "E1A" y similares, cuando se comentan en el contexto de la terapia génica y composiciones para los mismos, se refieren al respectivo polipéptido intacto o a cualquier fragmento o derivado modificado genéticamente del mismo, que retiene la deseada función bioquímica de la proteína intacta. De manera similar, referencias a genes CFTR, p53, E1A, y otros genes de este tipo para uso en terapia génica (a los que se alude típicamente como "transgenes" a ser suministrados a una célula receptora), incluyen polinucleótidos que codifican el polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado modificado genéticamente que posea la función bioquímica deseada.

50 Un plásmido, virus u otra sustancia "aislado" se refiere a un preparado de la sustancia desprovisto de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes en los casos en los la sustancia o una sustancia similar se produce de forma natural o se prepara inicialmente a partir del mismo. Así, por ejemplo, una sustancia aislada puede prepararse mediante el uso de una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una

mezcla fuente. El enriquecimiento se puede medir sobre una base absoluta, tal como peso por volumen de disolución, o puede medirse en relación con una segunda sustancia, potencialmente interferente, presente en la mezcla fuente. Aumentar los enriquecimientos de los aspectos de esta descripción es cada vez más preferido. Así, por ejemplo, se prefiere un enriquecimiento de 2 veces, se prefiere más un enriquecimiento de 10 veces, se prefiere más un enriquecimiento de 100 veces, incluso se prefiere más un enriquecimiento de 1000 veces.

Un preparado de AAV se dice que está "sustancialmente exento" de virus helper si la relación de partículas de AAV infecciosas a partículas de virus helper infecciosas es de al menos aproximadamente $10^2:1$; preferiblemente al menos aproximadamente $10^4:1$, más preferiblemente al menos aproximadamente $10^6:1$; aún más preferiblemente al menos aproximadamente $10^8:1$. Los preparados también están preferiblemente exentos de cantidades equivalentes de proteínas de virus helper (es decir, proteínas como estarían presentes como resultado de un nivel de este tipo de virus helper, si las impurezas de partículas de virus helper antes señaladas estuvieran presentes en forma interrumpida). Una contaminación de proteína viral y/o celular en general se puede observar como la presencia de bandas de tinción Coomassie o bandas teñidas de plata sobre geles de SDS (p. ej., la aparición de bandas distintas de las correspondientes a las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3).

"Eficiencia", cuando se utiliza para describir la producción, la replicación o el empaquetamiento viral se refiere a propiedades útiles del método, en particular, la tasa de crecimiento y el número de partículas de virus producidas por célula. Producción de "alta eficiencia" indica la producción de al menos 100 partículas virales por célula; preferiblemente al menos aproximadamente 10.000 y más preferiblemente al menos aproximadamente 100.000 partículas por célula, en el transcurso del periodo de cultivo especificado. Incluso más preferiblemente, la producción de "alta eficiencia" abarca estos niveles de producción de partículas por célula, así como el número máximo de células productoras de partículas tales como al menos aproximadamente 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 20%, preferiblemente al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, preferiblemente al menos 75%. El Ejemplo 6 describe las condiciones de cultivo (medio "completo") que resultan en 93.000 - 123.000 partículas de rAAV por célula productora. En el contexto de la presente invención, la eficiencia también puede considerarse en términos de porcentaje, o medida, de liberación de partículas virales en comparación con partículas virales retenidas en la célula. La eficiencia también puede considerarse en términos de relación o proporción relativa de partículas virales totales a partículas virales infecciosas (tal como la relación "P/I"). Ensayos para determinar parámetros de eficiencia de la producción, tales como unidades de replicación y ensayo de centro infeccioso, son conocidos en la técnica.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, virología, cultivo de células animales y bioquímica que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, comp., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller y M.P. Calos, comps., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al, comps., 1987); "Current Protocols in Protein Science" (John E Coligan, et al. comps. Wiley and Sons, 1995); y "Protein Purification: Principles and Practice" (Robert K. Scopes, editorial Springer, 1994).

Condiciones que fomentan la liberación de partículas de rAAV a partir de células productoras

La presente descripción proporciona métodos para generar una población de partículas de virus adeno-asociados recombinantes (rAAV), que comprende la etapa de: a) incubar una población de células productoras en un medio de cultivo celular bajo condiciones que fomenten la liberación de partículas de rAAV de las células productoras al medio de cultivo. Las partículas de rAAV liberadas pueden entonces ser recolectadas del medio de cultivo celular, obteniendo de este modo una población de partículas virales.

Condiciones que fomentan (o mejoran) la liberación de partículas de AAV (incluyendo rAAV) de una célula productora al medio de cultivo incluyen, pero no se limitan a pH del medio de cultivo; osmolalidad del medio de cultivo; temperatura; concentración de un ion dado en el medio de cultivo; densidad celular; concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo; concentración de glucosa en el medio de cultivo; concentración de aminoácidos en el medio de cultivo; y condiciones que fomentan la sincronización del ciclo celular. Uno cualquiera o más de estos parámetros se mantiene dentro de un intervalo adecuado (es decir, un intervalo que fomente la liberación) durante el cual las células liberan partículas de AAV. A pesar de que un parámetro (es decir, condición) puede ser suficiente para fomentar la liberación, una combinación de dos o más parámetros puede ser mantenido simultáneamente, cada uno dentro de su propio intervalo adecuado. Además, un intervalo adecuado para un parámetro puede variar dependiendo de si se utilizan cualquier parámetro o parámetros adicionales. Si un parámetro se mantiene dentro de un intervalo adecuado durante un período de tiempo, un segundo parámetro se puede

mantener dentro de un segundo intervalo adecuado para el mismo o un período de tiempo diferente al primer parámetro. Alternativamente, las condiciones se pueden emplear en serie. Por ejemplo, el control de pH puede producirse durante una fase de crecimiento, seguida por el control de la temperatura.

5 Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica variar estos parámetros y determinar si la liberación de rAAV en el medio de cultivo se ha mejorado, con relación a la cantidad de rAAV liberado cuando las células productoras no se mantienen bajo la o las condiciones del entorno dadas. La liberación potenciada (o incrementada) de partículas de rAAV de una célula productora se puede medir por cualquiera de un cierto número de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a ensayos funcionales tales como un ensayo de centro de replicación y un ensayo de centro infeccioso; ensayos inmunológicos para los productos de gen *cap* tales como
10 ELISA; HPLC; y cualquiera de un cierto número de métodos de detección de ADN (para detectar la presencia de ADN viral) tales como transferencia en ranura.

En general, cualquiera de estas condiciones pueden ser monitorizadas y controladas en la medida necesaria y/o deseada utilizando métodos y equipos estándares conocidos en la técnica. Se mide la condición y se realizan ajustes para mantener o devolver la condición a su nivel adecuado (es decir, un nivel que fomente la liberación del virus).
15 Los autores de la invención han observado que no mantener apropiada o adecuadamente las condiciones de cultivo puede resultar en el cese de la liberación de partículas de virus, mientras que otras condiciones tales como la osmolalidad, no necesitan ser mantenidas en un nivel específico, siendo suficiente establecer las condiciones de cultivo inicial con respecto a este o estos parámetros. Para las condiciones que necesitan ser monitorizadas y ajustadas, por ejemplo, se puede utilizar un biorreactor y/o un sistema de perfusión de medios. Se prefieren estos
20 sistemas, debido a que permiten un control más cuidadoso de las condiciones de cultivo. Sin embargo, es adecuado cualquier sistema que permita un control y ajuste suficientes de las condiciones de cultivo para permitir una liberación suficiente y/o deseada de las partículas de AAV. Otros ejemplos de mecanismos de control para proporcionar las condiciones se proporcionan en esta memoria.

En una realización, las células productoras se cultivan en condiciones de pH que fomenten la liberación de partículas virales. Generalmente, el pH del medio de cultivo se mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5, preferiblemente de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,5, más preferiblemente de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0. Incluso más preferiblemente, y especialmente si el pH es la única condición utilizada para fomentar la liberación, el pH es aproximadamente 8,0. Un biorreactor, por ejemplo, permite el control de pH a +/- 0,05, y está disponible un control incluso más preciso (tal como a +/- 0,01), y puede vigilar el
30 pH cada uno a 3 minutos o incluso menos. En algunas realizaciones, las células se cultivan en condiciones de pH en las que al menos aproximadamente el 67% de las partículas totales de virus se encuentran en el sobrenadante del cultivo. En otras realizaciones, las células se cultivan en condiciones de pH tales que al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 95% de partículas de virus se encuentran en el sobrenadante del cultivo. Preferiblemente, la relación P/I, o de partícula a infectividad, en el sobrenadante de cultivo es menor que aproximadamente 4.000, más preferiblemente menor que aproximadamente 3.000, más preferiblemente menor que aproximadamente 2.000, más preferiblemente menor que aproximadamente 1.700, más preferiblemente menor que aproximadamente 1.500. En algunas realizaciones, las células se cultivan a aproximadamente pH 8 y se recolectan aproximadamente 96 horas desde la infección con virus helper (o introducción o inicio de la o las funciones de virus helper). En otras
40 realizaciones, las células se cultivan a aproximadamente pH 8 y se recolectan aproximadamente 72 horas desde la infección con virus helper (o introducción o inicio de la o las funciones de virus helper). En otras realizaciones, las células se cultivan a aproximadamente pH 8 y se recolectan aproximadamente 48 horas desde la infección con virus helper (o introducción o inicio de la o las funciones de virus helper).

En algunas realizaciones se utilizan una condición o condiciones distintas de pH para fomentar la liberación de virus. Por ejemplo, en otras realizaciones, la temperatura se utiliza para fomentar la liberación de virus. Generalmente, la temperatura del medio de cultivo se mantiene entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 45 °C, preferiblemente entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 42 °C, más preferiblemente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C. Incluso más preferiblemente, y especialmente si la temperatura es la única condición para fomentar la liberación, la temperatura es de aproximadamente 37 ° a aproximadamente 39 °C. Un
50 biorreactor, por ejemplo, puede controlar una temperatura de +/- 0,5 °C, y puede vigilar tan estrechamente como aproximadamente cada 30 segundos.

En otras realizaciones, la osmolalidad se utiliza para fomentar la liberación del virus. Generalmente, la osmolaridad del medio de cultivo se inicia y/o mantiene entre aproximadamente 100mOsM y aproximadamente 650mOsM, preferiblemente de aproximadamente 150mOsM a aproximadamente 500mOsM, preferiblemente de aproximadamente 200mOsM a aproximadamente 400mOsM, incluso más preferiblemente aproximadamente 300mOsM (especialmente si la osmolaridad es la única condición utilizada para fomentar la liberación). La osmolalidad, un término bien entendido en la técnica, se define como el número de moléculas de soluto por kg de agua. Generalmente, compuestos tales como NaCl y otras sales, manitol, glucosa, contribuyen en la osmolalidad. La

osmolalidad puede medirse utilizando técnicas estándares en la técnica tales como la depresión del punto de congelación, utilizando, por ejemplo, un osmómetro.

Otras condiciones que pueden utilizarse en los métodos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a uno cualquiera o más de los siguientes: factores de crecimiento tales como insulina, EGF y FGF; concentración de glucosa; concentración de oxígeno disuelto; medio enriquecido (p. ej., glucosa adicional y/u otros nutrientes tales como vitaminas y aminoácidos). Las concentraciones de glucosa oscilan generalmente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20 g/l; más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 15 g/l; más preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 g/l. Las concentraciones de oxígeno (medidas típicamente, por ejemplo, mediante electrodo de oxígeno disuelto o analizador de gases en sangre) están generalmente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 200% con respecto al aire, preferiblemente entre aproximadamente 20% y aproximadamente 100% con respecto al aire, preferiblemente de aproximadamente 30% a aproximadamente el 75% con respecto al aire. Generalmente, cuanto mayor sea la densidad de células, más enriquecidos estarán los medios. Las condiciones de los medios se pueden mantener y/o suplementar utilizando técnicas conocidas en la técnica tales como perfusión.

Las células productoras se cultivan durante un período de tiempo adecuado con el fin de fomentar la liberación de virus en el medio. Generalmente, las células se pueden cultivar durante aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, hasta aproximadamente 10 días. Después de aproximadamente 10 días (o antes, dependiendo de las condiciones de cultivo y de la célula productora particular utilizada), el nivel de producción generalmente disminuye significativamente. En general, el tiempo de cultivo se mide desde el punto de la producción viral. Por ejemplo, en el caso de AAV, la producción viral generalmente comienza a partir del suministro de función de virus helper en una célula productora apropiada como se describe en esta memoria. Generalmente, las células se recolectan de aproximadamente 48 a aproximadamente 100, preferiblemente de aproximadamente 48 a aproximadamente 96, preferiblemente de aproximadamente 72 a aproximadamente 96, preferiblemente de aproximadamente 68 a aproximadamente 72 horas después de la infección por el virus helper (o después de que comience la producción viral). En los Ejemplos, los resultados se expresan habitualmente por el número de días, p. ej., "día 2", "día 3", etc. Estas designaciones indican generalmente un día adicional medido desde la infección con el virus helper. Es decir, el resultado reseñado para el "día 3" generalmente indica que el resultado se obtuvo aproximadamente 2 días, o 48 horas, desde el momento de la introducción de la o las funciones del virus helper.

Tal como se discutió anteriormente, se puede utilizar una cualquiera o más, en cualquier combinación, de las condiciones que fomentan la liberación. Por ejemplo, las células pueden ser cultivadas bajo una cualquiera o más de las siguientes condiciones: (a) pH a aproximadamente 8,0; (b) temperatura de aproximadamente 39 °C; (c) aproximadamente 300 mOsm; (d) medio enriquecido, durante aproximadamente 2 a 3 días. "Medios enriquecidos" generalmente significan enriquecidos en términos de sales inorgánicas adicionales (tales como Mg^{2+} , Ca^{2+}), vitaminas y/o cofactores de manera que el suero puede ser reducido o incluso eliminado. En una realización preferida, las células se cultivan bajo las siguientes condiciones: (a) aproximadamente 300 mOsm; (b) aproximadamente pH 8,00; (c) aproximadamente 39 °C; (d) y se recolectan aproximadamente 96 horas desde la infección con virus helper. En una realización preferida, las células se cultivan bajo las siguientes condiciones: (a) aproximadamente pH 8,00; (b) aproximadamente 39 °C; y (c) y se recolectan aproximadamente 96 horas desde la infección con virus helper. En otra realización, las células se cultivan bajo las siguientes condiciones: (a) aproximadamente 300 mOsm; (b) aproximadamente pH 8,00; (c) aproximadamente 39 °C; (d) y se recolectan aproximadamente 72 horas desde la infección con virus helper. En otra realización, las células se cultivan bajo las siguientes condiciones: (a) aproximadamente pH 8,00; (b) aproximadamente 39 °C; y (c) y se recolectan aproximadamente 72 horas desde la infección con virus helper. En otra realización, las células se cultivan bajo las siguientes condiciones: (a) aproximadamente 300 mOsm; (b) aproximadamente pH 8,00; (c) aproximadamente 39 °C; (d) y se recolectan aproximadamente 48 horas desde la infección con virus helper. En otra realización, las células se cultivan bajo las siguientes condiciones: (a) aproximadamente pH 8,00; (b) aproximadamente 39 °C; y (c) y se recolectan aproximadamente 48 horas desde la infección con virus helper.

En algunas realizaciones, el pH se mantiene a aproximadamente 8,0, y el cultivo se hace crecer a una temperatura de aproximadamente 39 °C. En algunas realizaciones, el pH se mantiene a aproximadamente 8,0 y la osmolalidad (al menos la osmolalidad inicial) es de aproximadamente 300 mOsm. En algunas realizaciones, el pH se mantiene a aproximadamente 8,0, la osmolalidad (al menos la osmolalidad inicial) es de aproximadamente 300 mOsm, y el cultivo se hace crecer a una temperatura de aproximadamente 39 °C.

En algunos aspectos, las células se sincronizan. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sometiendo las células a condiciones de estrés, particularmente antes de la adición de la o las funciones de virus helper. La sincronización puede contribuir a la productividad global. Posibles formas de estrés incluyen, pero no se limitan a un estrés nutricional, un estrés osmótico, un estrés de pH, un estrés por temperatura, un estrés aeróbico, un estrés mecánico,

un estrés por radiación y un estrés tóxico. Un ejemplo no limitante mediante el cual se impone estrés nutricional es mediante el cultivo de las células productoras en un medio que es deficiente en uno o más aminoácidos.

5 También se entiende que, la descripción incluye también métodos de tratamiento de células productoras (es decir, células productoras intactas) con un agente o condición que fomenta la liberación de virus, por ejemplo el tratamiento con un agente que permeabiliza una célula tal como un ionóforo o una toxina (tal como una toxina bacteriana), choque osmótico. Para estos aspectos, las células productoras de una población de cultivo generalmente conservan su integridad, es decir, no se lisan (aunque, como en cualquier población de cultivo de células, algunas células se pueden lisan). Generalmente, menos de aproximadamente cualquiera de los siguientes porcentajes de células se lisan: 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 12%, 10%, 8%, 5%, 3%, 2%, 1%. De manera alternativa, generalmente aproximadamente al menos cualquiera de los siguientes porcentajes de los contenidos celulares quedan retenidos en las células (es decir, retenidos en la membrana celular): 40%, 45%, 50%, 10 55%, 60%, 65%, 70%, 75 %, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%.

Recolección y Purificación de Partículas Virales Liberadas

15 Las células productoras pueden cultivarse en suspensión o fijadas a una superficie adecuada. Métodos de suspensión o cultivos fijos son conocidos en la técnica. Tras la generación de una población de partículas virales liberadas, las partículas virales liberadas se pueden recolectar y/o purificar para su uso posterior. Como se discute con mayor detalle más adelante, las partículas de virus en los medios de cultivo se separan de las células productoras utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como centrifugación o filtración (tal como filtración de flujo tangencial en una membrana de fibra hueca). Preferiblemente, se llevan a cabo una o más etapas de purificación después de separar las células productoras del medio de cultivo. Ejemplos de tales etapas incluyen, pero no se limitan a la concentración utilizando filtros adecuados o cromatografía de intercambio iónico. Diversos métodos de producción y purificación se describen en el documento WO 99/11764 (PCT/US98/18600) (Targeted Genetics Corporation).

25 En algunas realizaciones, el sobrenadante del cultivo (después de retirar las células) se somete a cromatografía iónica opuesta. En algunas realizaciones cromatografía de intercambio de aniones es seguida por cromatografía de intercambio de cationes. En otras realizaciones, el intercambio de cationes es seguido por la cromatografía de intercambio de aniones. En algunas realizaciones, el sobrenadante del cultivo se somete a cromatografía sobre sulfato de heparina, preferiblemente después del tratamiento de cromatografía iónica opuesta, más preferiblemente después del tratamiento del sobrenadante del cultivo en cromatografía de intercambio de cationes, seguido por 30 cromatografía de intercambio de aniones. Estas técnicas se describen con mayor detalle a continuación.

A modo de ilustración, el sobrenadante del cultivo, o un preparado que ha sido eluido de una columna de intercambio de aniones o de intercambio de cationes y/o que ha sido concentrado mediante filtración de flujo tangencial puede purificarse mediante la unión a una columna que comprende sulfato de heparina. El AAV puede entonces eluirse de una columna de este tipo utilizando un tampón que contiene una sal (p. ej., un gradiente lineal de NaCl). Por ejemplo, AAV obtenido de fracciones reunidas de la columna de cromatografía de intercambio de aniones puede ser concentrada y diafiltrada en TMEG más NaCl 100 mM utilizando una membrana de filtración de flujo tangencial de 300K. Este concentrado se puede inyectar en una columna de sulfato de heparina de uno ml (columna "Hi-Trap Heparin" de Pharmacia), y se eluyó utilizando un gradiente lineal de NaCl.

40 Las secciones siguientes describen con mayor detalle componentes del sistema de producción y métodos de la invención.

Célula Productora que Comprende Función Virus Helper y AAV

En los métodos de la invención, las células productoras que comprenden componentes necesarios para la replicación y encapsidación viral se cultivan en condiciones adecuadas (es decir, condiciones que fomentan la liberación viral). Varios criterios influyen en la selección de células para su uso en la producción de partículas de rAAV según se describe en esta memoria. Como cuestión inicial, la célula debe ser permisiva para la replicación y el empaquetamiento del vector de rAAV cuando se utiliza el virus helper seleccionado. Sin embargo, ya que la mayoría de células de mamífero pueden ser infectadas productivamente por el AAV, y muchas también pueden ser infectadas por virus helper tales como adenovirus, está claro que una gran diversidad de células de mamífero y líneas celulares satisfacen eficazmente estos criterios. Entre éstas, las células y las líneas celulares más preferidas son aquellas que pueden fácilmente crecer en cultivo con el fin de facilitar la producción a gran escala de preparados de vectores de AAV recombinantes. Una vez más, sin embargo, muchas de estas células satisfacen eficazmente este criterio. Cuando se desea la producción a gran escala, la elección del método de producción también influirá en la selección de la célula huésped. Por ejemplo, según se describe con mayor detalle a continuación y en la técnica, algunas técnicas de producción y recipientes o cámaras de cultivo están diseñados para el crecimiento de células

adherentes o fijadas, mientras que otros están diseñados para el crecimiento de las células en suspensión. En este último caso, la célula huésped sería por lo tanto preferiblemente adaptada o adaptable al crecimiento en suspensión. Sin embargo, incluso en el caso de células y líneas celulares que se consideran como adherentes o dependientes de anclaje, es posible (como se describe más adelante) derivar variantes adaptadas a la suspensión de una línea parental dependiente de anclaje mediante la selección en serie de células capaces de crecimiento en suspensión.

Cuando se utiliza un virus helper sensible a la temperatura, la célula debe ser capaz de replicar eficazmente el vector de rAAV en condiciones que son no permisivas para la replicación del virus helper. A modo de ilustración, cuando se utiliza el adenovirus ts149 como un virus helper ts (según se describe más adelante), la célula debe ser capaz de soportar la replicación de rAAV y el empaquetamiento a temperaturas muy por encima de 32 °C, preferiblemente de aproximadamente 39,5 °C. Las células humanas 293 son un ejemplo de una línea celular que cumple estos criterios, pero numerosas otras células y líneas celulares son capaces de replicar rAAV a esta temperatura relativamente elevada.

En última instancia, el virus helper (o la función de virus helper), la secuencia del vector de rAAV, y todas las secuencias de AAV necesarias para la replicación y el empaquetamiento deben estar presentes en la misma célula. En los casos en los que uno o más genes de empaquetamiento de AAV se proporcionan por separado a partir del vector, se proporciona una célula huésped que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un polinucleótido heterólogo introducido en dicha célula huésped utilizando un vector o pro-vector de rAAV, en donde dicho vector o pro-vector de rAAV comprende dicho polinucleótido heterólogo flanqueado por al menos una ITR de AAV y es deficiente en dicho o dichos genes de empaquetamiento de AAV; y (iii) un virus helper o secuencias que codifican las funciones de virus helper necesarias. Cabe señalar, sin embargo, que uno o más de estos elementos pueden combinarse en un solo replicón. A modo de ilustración, un virus helper también puede comprender un pro-vector de rAAV o un gen de empaquetamiento de AAV.

El virus helper se introduce preferiblemente en el cultivo celular a un nivel suficiente para infectar a la mayoría de las células en cultivo, pero de otro modo puede mantenerse en un mínimo con el fin de limitar la cantidad de virus helper presente en el preparado resultante. Se puede utilizar una multiplicidad de infección o "MOI" de 1-100, pero una MOI de 5-10 es típicamente adecuada.

De manera similar, si el vector de AAV y/o los genes de empaquetamiento son introducidos transitoriamente en la célula de empaquetamiento (en oposición a ser introducidos de manera estable), son introducidos preferiblemente a un nivel suficiente para alterar genéticamente la mayoría de las células en cultivo. Las cantidades generalmente requeridas son del orden de 10 µg por 10⁶ células, si se suministra como un plásmido bacteriano; o 10⁸ partículas por 10⁵ células, si se suministra como una partícula de AAV. La determinación de una cantidad óptima es un ejercicio de titulación rutinaria que está dentro de la experiencia ordinaria del experto.

Estos elementos pueden introducirse en la célula, ya sea simultánea o secuencialmente, en cualquier orden. En los casos en los que la célula es alterada de manera hereditaria por cualquiera de los elementos, la célula puede seleccionarse y se deja proliferar antes de introducir el siguiente elemento.

En una realización preferida, el virus helper se introduce el último en la célula para rescatar y empaquetar un vector de rAAV residente. La célula generalmente ya se suplementará en la medida necesaria con genes de empaquetamiento de AAV. Preferiblemente, el vector de rAAV o los genes de empaquetamiento, y más preferiblemente ambos se integran de forma estable en la célula. Se aprecia fácilmente que son posibles otras combinaciones. Tales combinaciones se incluyen dentro del alcance de la invención.

Una vez que la célula huésped es provista de los elementos necesarios, la célula se cultiva en condiciones que son permisivas para la replicación de AAV, para permitir la replicación, el empaquetamiento y la liberación del vector de rAAV. Tiempos de cultivo adecuados dependen de un cierto número de consideraciones y pueden variar como se discutió anteriormente. El tiempo de cultivo se ajusta preferiblemente para que corresponda a niveles de producción pico, y es generalmente de 3-6 días. Preferiblemente, se producen al menos 100 partículas virales por célula; más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 por célula, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 10.000 por célula. Preferiblemente, al menos 0,5 x 10⁶, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 x 10⁶, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 2 x 10⁶ RU/ml de vectores de AAV se producen por 2 x 10⁵ células durante el período de cultivo. Opcionalmente, se pueden utilizar métodos de producción a gran escala tales como cultivo en suspensión y filtración de flujo tangencial. Se recogen entonces partículas de AAV y se aíslan de las células utilizadas para prepararlas.

Preparados de partículas de rAAV obtenidos por los métodos de la presente invención comprenden preferiblemente una alta densidad de partículas infecciosas de AAV y están sustancialmente exentos de virus helper, proteínas de virus helper y desechos celulares y otros contaminantes. Propiedades deseables incluyen las siguientes:

5 • Una concentración de al menos 10^7 , preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^9 RU/ml, según se determina en un ensayo de replicación o comparación cuantitativa de la hibridación con un patrón conocido.

• No hay más de 10^3 , preferiblemente no más de aproximadamente 10^2 , más preferiblemente no más de aproximadamente 10^1 partículas infecciosas de virus helper por 10^8 RU de partículas de rAAV.

10 • Menos de 5%, preferiblemente menos de aproximadamente 1%, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001% de contaminación por virus helper en una base de proteína (peso/peso), detectada por análisis densitométrico de geles de SDS, o por inmunoensayo para proteína específica de virus helper (tal como fibra hexón o pentón de adenovirus).

15 • Menos de 5%, preferiblemente menos de aproximadamente 1%, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001% de contaminación por virus helper o proteína celular (peso/peso), detectada por análisis densitométrico de geles de SDS, o por inmunoensayo para virus helper o proteínas específicas celulares.

• Preferiblemente, el preparado también está sustancialmente exento de otros componentes celulares potenciales tales como lípidos celulares, hidratos de carbono y/o ácidos nucleicos.

20 Los métodos descritos en esta descripción son adecuados para la preparación de pequeños lotes experimentales, o lotes de preparación de 10-100 litros o más. Para los preparados de lotes a gran escala, también es deseable la siguiente propiedad:

• Un total de al menos 10^{10} , preferiblemente 10^{12} , y más preferiblemente 10^{14} RU de partículas de vectores de AAV en el preparado.

25 Opcionalmente, los vectores de rAAV pueden procesarse adicionalmente para enriquecer partículas de rAAV, agotar partículas de virus helper o de hacerlas de otra manera adecuadas para la administración a un sujeto. Técnicas de purificación pueden incluir centrifugación en gradiente isopícnico y técnicas cromatográficas. La reducción de la actividad de virus helper infeccioso puede incluir la inactivación por tratamiento térmico o por tratamiento de pH tal como se conoce en la técnica. Otros procesos pueden incluir concentración, filtración, diafiltración o mezclado con un tampón o excipiente farmacéutico adecuado. Los preparados pueden dividirse en partes alícuotas de dosis unitaria y multidosis para su distribución, que conservarán las características esenciales del lote tales como la homogeneidad del contenido antigénico y genético y la proporción relativa de virus helper contaminante.

Técnicas ilustrativas para generar preparados de virus helper y AAV que exhiben varias propiedades deseables descritas anteriormente se proporcionan en las siguientes secciones.

35 Se conocen en la técnica diversos métodos para la determinación del título infeccioso de un preparado viral. Un método para la determinación del título es un ensayo de titulación de alto rendimiento, en el que se establece un conjunto de pocillos de cultivo que comprenden cada uno una parte alícuota de células de mamífero y una parte alícuota de preparado de virus (así como pocillos de control que comprenden, por ejemplo, las células solo, virus solo y vacíos). El conjunto de pocillos de cultivo puede estar, por ejemplo, en forma de un recipiente de microtitulación. Típicamente, partes alícuotas (p. ej., partes alícuotas diluidas en serie) de la preparación de virus a titular se añaden a las células, y luego las células y los virus se incuban en condiciones que permiten la replicación del virus (típicamente condiciones de crecimiento adecuadas para la célula huésped de mamífero). Después de la replicación del virus, el ácido nucleico viral se libera generalmente mediante lisis de las células de mamíferos (utilizando condiciones o agentes que fomentan la lisis según sea necesario). El ácido nucleico (incluyendo ácido nucleico viral) en la multiplicidad de lisados puede ser transferido y fijado a una membrana bajo condiciones que unen ácido nucleico (lavado según sea apropiado para separar las proteínas y otros contaminantes). La membrana es preferiblemente una réplica o imagen especular del conjunto de cultivo en la que los pocillos individuales del conjunto original son posteriormente representados por "agrupaciones" de ácido nucleico (a partir del lisado de cada uno de los pocillos de cultivo) que están unidas en las posiciones correspondientes en la membrana. La hibridación de la membrana con una sonda específica para el virus marcado (o-viral-inserto específico) de la sonda se puede utilizar entonces para identificar y cuantificar la cantidad relativa de ácido nucleico viral específico en cada uno de los puntos del conjunto, y por correspondencia, en cada uno de los pocillos de cultivo originales. Condiciones y materiales para la transferencia, la unión, el lavado y la hibridación de ácidos nucleicos se pueden adaptar a partir

de técnicas de biología molecular rutinarias tales como la hibridación "dot blot" (transferencia de puntos) (como se describe en la técnica).

Selección y Preparación de Vector de AAV y Genes de Empaquetamiento de AAV

5 Las células productoras utilizadas en los métodos de producción descritos en esta memoria comprenden un vector de rAAV. Un vector de rAAV comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, no AAV) de interés en lugar de la totalidad o una parte de los genes *rep* y/o *cap* de AAV que normalmente constituyen la mayor parte del genoma de AAV. Como en el genoma de AAV de tipo salvaje, sin embargo, el vector de rAAV está flanqueado preferiblemente por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV como se ha indicado anteriormente. Variaciones en las que una construcción de rAAV está flanqueada por una sola ITR único (típicamente modificada) también se han descrito en la técnica y pueden emplearse en relación con la presente invención.

15 Son adecuados virus adeno-asociados de cualquier serotipo, ya que los diversos serotipos están funcional y estructuralmente relacionados, incluso a nivel genético (véase, p. ej., Blacklow, págs. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J.R. Pattison, comp. (1988); y Rose, *Comprehensive Virology* 3:1, 1974). Todos los serotipos de AAV aparentemente exhiben propiedades similares de replicación mediadas por los genes *rep* homólogos; y todos, en general, portan tres proteínas de la cápside relacionadas tales como las expresadas en AAV2. El grado de relación es sugerido adicionalmente por el análisis de heterodúplex, que revela una extensa hibridación cruzada entre serotipos a lo largo de la longitud del genoma; y la presencia de segmentos de reasociación análogos en los extremos que corresponden a ITRs. Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada uno de los serotipos están bajo control regulador similar. Entre los diversos serotipos de AAV, AAV2 es el más comúnmente empleado.

20 Un vector de rAAV comprende un polinucleótido heterólogo. El polinucleótido es típicamente de interés debido a una capacidad de proporcionar una función a una célula diana en el contexto de la terapia génica, tales como la supra- o sub-regulación de la expresión de un determinado fenotipo. Un polinucleótido heterólogo o "transgén" de este tipo generalmente será de longitud suficiente para proporcionar la secuencia de función o codificadora deseada. Para la encapsidación dentro de partículas de AAV2, el transgén será preferiblemente de menos de aproximadamente 5 kb, aunque se pueden emplear otros serotipos y/o modificaciones para permitir que secuencias mayores sean empaquetadas en las partículas virales de AAV.

25 Cuando se desea la transcripción del polinucleótido heterólogo en la célula diana pretendida, puede ser enlazado operativamente a su propio promotor o a un promotor heterólogo, dependiendo, por ejemplo, del nivel y/o especificidad de la transcripción deseada dentro de la célula diana, como se conoce en la técnica. Diversos tipos de promotores y potenciadores son adecuados para uso en este contexto. Los promotores constitutivos proporcionan un nivel continuo de transcripción génica, mientras que los promotores inducibles exhiben generalmente una baja actividad en ausencia del inductor, y están supra-regulados en presencia del inductor. Los promotores y potenciadores también pueden ser específicos para el tejido: es decir, exhiben su actividad sólo en determinados tipos celulares, presumiblemente debido a elementos reguladores de genes que se encuentran únicamente en esas células.

30 Ejemplos ilustrativos de promotores son el promotor tardío SV40 de virus de simio 40, el elemento potenciador/promotor de poliedro de Baculovirus, la timidina quinasa del virus Herpes Simplex (HSV tk), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) y diversos promotores retrovirales, incluyendo elementos LTR. Promotores inducibles incluyen promotores inducibles de iones de metales pesados (tales como el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) o diversos promotores de la hormona de crecimiento), promotores inducibles de hormonas esteroides y los promotores de fago T7 que son activos en presencia de ARN polimerasa T7. Ejemplos de promotores específicos para tejido incluyen diversos promotores de surfactina (para la expresión en el pulmón), promotores de miosina (para la expresión en el músculo) y promotores de albúmina (para la expresión en el hígado). Se conoce una gran diversidad de otros promotores y están generalmente disponibles en la técnica, y las secuencias de muchos de tales promotores están disponibles en las bases de datos de secuencias tales como la base de datos GenBank.

35 En los casos en los que se desea también la traducción en la célula diana pretendida, el polinucleótido heterólogo comprenderá preferiblemente también elementos de control que facilitan la traducción (tal como un sitio de unión al ribosoma o "RBS" y una señal de poliadenilación). Por consiguiente, el polinucleótido heterólogo comprenderá generalmente al menos una región codificadora unida operativamente a un promotor adecuado, y también puede comprender, por ejemplo, un potenciador enlazado operativamente, sitio de unión a ribosomas y señal de poli-A. El polinucleótido heterólogo puede comprender una región codificadora, o más de una región codificadora bajo el control de los mismos o diferentes promotores. A la unidad completa, que contiene una combinación de elementos de control y región codificadora, se le alude a menudo como un casete de expresión.

El polinucleótido heterólogo se integra mediante técnicas recombinantes en o, preferiblemente, en lugar de la región codificadora genómica del AAV (es decir, en lugar de los genes *rep* y *cap* de AAV), y está flanqueado preferiblemente por ambos lados por regiones de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Esto significa que una ITR aparece tanto aguas arriba como aguas abajo de la secuencia codificadora, ya sea en yuxtaposición directa, preferiblemente (aunque no necesariamente) sin ninguna secuencia intermedia de origen de AAV con el fin de reducir la probabilidad de recombinación que podría regenerar un genoma de AAV competente para la replicación. Una sola ITR puede ser suficiente para llevar a cabo las funciones normalmente asociadas con configuraciones que comprenden dos ITRs (documento WO 94/13788), y construcciones de vectores con sólo una ITR se pueden emplear en unión con los métodos de empaquetado y de producción de la presente invención.

Los promotores nativos para *rep* son autorreguladores y pueden limitar la cantidad de partículas de AAV producidas. El gen *rep* también puede ser enlazado operativamente a un promotor heterólogo, ya sea que *rep* se proporcione como parte de la construcción del vector, o por separado. Es adecuado cualquier promotor heterólogo que no esté fuertemente sub-regulado por la expresión del gen *rep*; pero se prefieren promotores inducibles porque la expresión constitutiva del gen *rep* puede tener un impacto negativo sobre la célula huésped. Una gran diversidad de promotores inducibles son conocidos en la técnica; y ejemplos se han enumerado anteriormente. Una subclase preferida de promotores inducibles es aquella que es inducida por el virus helper que se utiliza para complementar la replicación y el empaquetamiento del vector de rAAV. También se ha descrito un cierto número de promotores inducibles por virus helper, incluyendo el promotor del gen temprano de adenovirus que es inducible por la proteína E1A adenovirus; el promotor tardío principal de adenovirus; el promotor del virus herpes que es inducible por las proteínas de virus herpes tales como VP16 o 1CP4; así como promotores inducibles del virus vacuna o virus de la viruela.

Se han descrito métodos para identificar y someter a ensayo promotores inducibles de virus helper tales como promotores derivados del gen de la metalotioneína de ratón, véase el documento WO96/17947 (Targeted Genetics Corporation).

Dados los límites de tamaño de encapsidación relativo de diversos genomas de AAV, la inserción de un polinucleótido heterólogo grande en el genoma requiere la separación de una parte de la secuencia de AAV. La separación de uno o más genes de AAV es en cualquier caso deseable, con el fin de reducir la probabilidad de generar AAV competente para la replicación ("rcAAV"). Por consiguiente, secuencias codificadoras o promotoras para *rep*, *cap*, o ambas, se separan preferiblemente, ya que las funciones proporcionadas por estos genes pueden proporcionarse en *trans*.

Al vector resultante se le alude como "defectuoso" en estas funciones. Con el fin de replicar y empaquetar el vector, las funciones que faltan se complementan con un gen de empaquetamiento, o una pluralidad de los mismos, que juntos codifican las funciones necesarias para los diversos productos génicos *rep* y/o *cap* que faltan. Preferiblemente, los genes de empaquetamiento o casetes génicas no están flanqueados por ITRs de AAV y, preferiblemente, no comparten homología sustancial alguna con el genoma de rAAV con el fin de minimizar la recombinación homóloga durante la replicación entre la secuencia del vector y genes de empaquetamiento proporcionados por separado. El nivel de homología y la frecuencia de recombinación correspondiente aumentan al aumentar la longitud de las secuencias homólogas y con su nivel de identidad compartida. El nivel de homología que planteará un problema en un sistema dado puede ser determinado teóricamente y confirmado experimentalmente, tal como se conoce en la técnica. Típicamente, sin embargo, la recombinación puede reducirse o eliminarse sustancialmente si la secuencia de solapamiento es menor que aproximadamente una secuencia de 25 nucleótidos si es al menos 80% idéntica en toda su longitud, o menor que aproximadamente una secuencia de 50 nucleótidos si es al menos 70 % idéntica en toda su longitud. Por supuesto, son preferibles niveles incluso inferiores de homología, ya que se reducirán aún más la probabilidad de recombinación. Parece que, incluso sin homología de solapamiento alguno, existe una cierta frecuencia residual de generación de rcAAV. Incluso reducciones adicionales en la frecuencia de generación de rcAAV (p. ej., mediante recombinación no homóloga) pueden obtenerse "disociando" las funciones de replicación y encapsidación de AAV tal como se describe en el documento WO98/27204 (Targeted Genetics Corporation).

La construcción de vector de rAAV, y las construcciones de genes de empaquetamiento complementarios pueden ser implementadas en esta invención en un cierto número de diferentes formas. Partículas virales, plásmidos y células huésped transformadas de manera estable se pueden utilizar para introducir este tipo de construcciones en la célula de empaquetamiento, ya sea transitoriamente o de forma estable.

El vector de AAV y el o los genes de empaquetamiento complementarios, en su caso, pueden proporcionarse en forma de plásmidos bacterianos, partículas de AAV, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, ya sea la secuencia de vector de AAV, el o los genes de empaquetamiento, o ambos, se proporcionan en forma de células eucariotas genéticamente alteradas (preferiblemente alteradas de forma hereditaria, o integradas de forma estable). El desarrollo de células huésped alteradas de forma hereditaria para expresar la secuencia del vector de

AAV, los genes de empaquetamiento de AAV, o ambos, proporciona una fuente establecida del material que se expresa a un nivel fiable. Por lo tanto, se puede utilizar una diversidad de diferentes células alteradas genéticamente en el contexto de esta invención según se describe en la técnica, entre otros, en la patente US 5.658.776; documentos WO95/13392; WO98/23018; La patente de EE.UU. 5.656.785; documento WO98/27204. Son posibles otras combinaciones.

Por consiguiente, los genes *rep* y *cap* pueden estar presentes en plásmidos y/o pueden estar integrados de forma estable en el genoma de la célula productora.

Introducción de Material Genético en Células

Según se describe en la técnica, y se ilustra tanto en esta memoria como en las referencias citadas anteriormente, el material genético se puede introducir en células productoras utilizando cualquiera de una variedad de medios para transformar o transducir estas células, tales como la transfección con plásmidos bacterianos, infección con vectores virales, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, y la introducción utilizando cualquiera de una diversidad de composiciones basadas en lípidos (un proceso al que se alude a menudo como "lipofección"). Métodos y composiciones para realizar estas técnicas se han descrito en la técnica y están ampliamente disponibles.

La selección de células productoras convenientemente alteradas puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos utilizadas para alterar la célula pueden introducirse simultáneamente con o enlazarse operativamente a uno o más marcadores detectables o seleccionables, tales como genes de resistencia a fármacos, tal como se conoce en la técnica. El ensayo para la adquisición, localización y/o mantenimiento de un polinucleótido introducido puede realizarse utilizando técnicas basadas en la hibridación de ADN (tales como transferencia Southern y otros procesos como se conocen en la técnica). El ensayo de la expresión puede realizarse fácilmente mediante análisis Northern de ARN extraído de las células alteradas genéticamente, o mediante inmunofluorescencia indirecta para el producto génico correspondiente. El ensayo y la confirmación de las capacidades y eficiencias de empaquetamiento se pueden obtener introduciendo en la célula los componentes funcionales restantes del AAV y un virus helper, para someter a ensayo la producción de partículas de AAV. En los casos en los que una célula está alterada de forma hereditaria con una pluralidad de construcciones de polinucleótidos, generalmente es más conveniente (aunque no esencial) introducirlas en la célula por separado y validar cada una de las etapas en serie. Referencias que describen tales técnicas incluyen las citadas en esta memoria.

Selección y Preparación de Virus Helper

Como se comentó anteriormente, AAV es un parvovirus que es defectuoso para la auto-replicación, y generalmente debe confiar en un virus helper para suministrar ciertas funciones replicativas. En los métodos de la presente invención se pueden utilizar diversos virus helper.

Se ha identificado un cierto número de estos virus helper, incluyendo adenovirus, virus herpes (incluyendo pero no limitados a HSV1, citomegalovirus y HHV-6) y virus de la viruela (particularmente virus vacuna). Cualquiera de estos virus se puede utilizar con esta invención.

Frecuentemente, el virus helper será un adenovirus de un tipo y subgrupo que pueda infectar la célula huésped deseada. Se utilizan comúnmente adenovirus humanos del subgrupo C, particularmente los serotipos 1, 2, 4, 6 y 7. Generalmente, se prefiere el serotipo 5. Características y patrones de crecimiento de adenovirus se conocen en la técnica. Véase, p. ej. Horowitz. "Adenoviridae and their replication", págs. 771-816 en "Fundamental Virology", Fields et al., comps.

Aunque no es esencial, en principio es deseable que la cepa de virus helper sea defectuosa para la replicación en el sujeto que en última instancia recibirá la terapia genética. Por lo tanto, cualquier virus helper residual presente en una preparación de rAAV será incompetente para la replicación. Los adenovirus a partir de los cuales se han separado la región E1A o tanto la región E1A como la E3 no son infecciosos para la mayoría de las células humanas. Se pueden replicar en una línea celular permisiva (p. ej., la línea celular 293 humana) que es capaz de complementar la actividad que falta. Regiones de adenovirus que parecen estar asociadas con la función helper, así como regiones que no lo están, se han identificado y descrito en la técnica (véase, p. ej., P. Colosi et al., documento WO97/17458 y referencias citadas en el mismo).

Uso de un Virus Helper Condicionalmente-Sensible

Un virus helper "condicionalmente sensible" también se puede emplear para proporcionar una actividad de virus helper. Véase el documento WO 99/11764. Una cepa de virus helper de este tipo debe tener como mínimo la

propiedad de ser capaz de apoyar la replicación de AAV en una célula huésped bajo al menos un conjunto de condiciones en las que en sí no se someten a la replicación genómica eficaz. En los casos en los que la actividad de virus helper se suministra como partículas de virus intactas, generalmente también es necesario que el virus sea capaz de replicarse en una célula huésped bajo un segundo conjunto de condiciones. El primer conjunto de condiciones diferirá del segundo conjunto de condiciones por una característica fácilmente controlable, tal como la presencia o ausencia de un cofactor requerido (tal como un catión), la presencia o ausencia de un fármaco inhibidor, o un desplazamiento en una condición ambiental tal como la temperatura. Lo más convenientemente, la diferencia entre las dos condiciones es la temperatura, y a un virus condicionalmente sensible de este tipo se le alude como un virus helper sensible a la temperatura (tsHV).

Un virus helper "sensible a la temperatura" o virus "ts" es uno que es capaz de replicar su material genético en una célula eucariota en un determinado intervalo de temperaturas (el intervalo de temperaturas "permisivo"), típicamente de aproximadamente 15°-35°C y preferiblemente de aproximadamente 20-32 °C. Sin embargo, a la temperatura "no permisiva", incluso cuando se mantienen iguales otras condiciones, la tasa de replicación del material genético es sustancialmente menor, al menos 10 veces menor; habitualmente al menos aproximadamente 100 veces menor; y preferiblemente al menos aproximadamente 1000 veces menor. Esta temperatura es típicamente de aproximadamente 35°-50 °C, generalmente de aproximadamente 42 °C. En un ejemplo típico de un virus ayudante tal ts, el virus es capaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente bajas, tales como temperaturas de aproximadamente 20-32 °C, pero es incapaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente altas, tales como temperaturas de aproximadamente 37-42 °C. Se entiende que la célula infectada con virus, no obstante, puede exhibir algunos procesos metabólicos atribuibles al virus a la temperatura no permisiva, incluyendo, pero no limitado a la función cooperadora para la producción de AAV.

Un virus helper sensible a la temperatura puede ser producido en cantidades a granel por cultivo de las células infectadas a una temperatura permisiva. El vector de AAV puede entonces ser producido cultivando de células que comprenden elementos del vector y el virus helper sensible a la temperatura a una temperatura no permisiva. La preparación del vector estará sustancialmente exenta de componentes de virus helper.

Un gran número de variantes de adenovirus sensibles a la temperatura han sido descritos en la técnica; véase, p. ej., las variantes descritas por Ensinger et al. (J. Virol. 10:328, 1972); Williams et al. (J. Gen Virol. 11:95, 1971); Ishibashi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65:304, 1970); Lundholm et al. (Virology 45:827, 1971); y Shiroki et al, (Virology 61:474, 1974). El análisis de complementación indica que tales variantes caen en una pluralidad de diferentes grupos de complementación (Ginsberg et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34:419, 1974). Esto sugiere que puede volverse sensible a la temperatura un cierto número de etapas en el ciclo de replicación del adenovirus.

Ya que la función helper para la replicación de AAV requiere que sólo una parte del ciclo de adenovirus esté intacta, el ensayo de la función helper de diversos mutantes a la temperatura no permisiva proporciona un medio para representar en mapa la función helper. Por ejemplo, Ishibashi et al. (Virology 45:317, 1971) informó que variantes de adenovirus aviares sensibles a la temperatura apoyan la replicación de AAV1 y AAV2. Ito et al. informaron que el mutante ts13 sensible a la temperatura de adenovirus humano 7 (Ad7ts13) ayuda a la replicación de AAV a la temperatura no permisiva tan eficientemente como la cepa salvaje. Drake et al. (Virology 60:230, 1974) informaron de la complementación de la síntesis del antígeno AAV4 por 3 grupos de mutantes sensibles a la temperatura de virus herpes simplex tipo 1 (HSV1). Handa et al. (J. Gen. Viro. 29:239, 1975) informaron de la actividad helper para la producción de virus AAV1 por mutantes de adenovirus humanos Ad5ts36, Ad5ts125, Ad5ts149, Ad12tsA275, Ad12tsB221 y Ad12tsC295. Ostrove et al. (Virology 104:502, 1980) informaron que mutantes sensibles a las temperaturas Ad5ts125, Ad5ts135, Ad5ts157, Ad5ts116 y Ad5ts142 y los mutantes de intervalo de huéspedes hr6 pero no hr3 apoyan la replicación de AAV. Mayor et al. (J. Gen Virol. 35:545, 1977) informaron que Ad31ts13 pero no Ad31ts94 apoyaba la producción de AAV1 a la temperatura no permisiva.

Straus et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:742, 1976) informaron que Ad5ts125 apoyaba la replicación de AAV2 bajo condiciones en las que el adenovirus no se replica por sí mismo. Utilizaron esta propiedad para estudiar intermedios de ADN formados durante la replicación del AAV. Myers et al. (J. Virol. 35:65, 1980) realizaron un estudio cuantitativo sobre la función helper, y demostraron que Ad5ts149 apoyaban la producción de 20.000 partículas de AAV infecciosas por célula a la temperatura no permisiva, mientras que Ad5ts107 producía sólo ~ 100 partículas por célula. Ya que Ad5ts107 tiene una mutación en la región codificadora de la proteína de unión de ADN de 72 kDa, llegaron a la conclusión de que esta proteína juega un papel en la expresión de ARN de AAV. Más recientemente, Carter et al. (Virology 191:473, 1992) propusieron que se requiere una proteína completamente funcional de 72 kDa para la expresión post-transcripcional cuantitativa de los genes *rep* y *cap* de AAV.

Variantes sensibles a las condiciones de la cepa seleccionada de virus helper pueden ser generadas por una estrategia de mutagénesis y selección apropiada. Por ejemplo, el virus puede ser mutagenizado con nitrosoguanidina, ácido nitroso, hidroxilamina o 5-bromo-2-desoxiuridina. Se seleccionan candidatos que puedan multiplicarse en una célula eucariota adecuada bajo las condiciones permisivas deseadas, pero no bajo las

condiciones no permisivas deseadas. Como una ilustración, se pueden obtener mutantes sensibles a la temperatura de adenovirus que se multiplican, p. ej., a 32 °C, pero no a 39,5 °C. Relaciones de eficiencia de extensión en placa a 39,5 °C frente a 32 °C son preferiblemente menos de 10⁻⁴ y más preferiblemente menos de 10⁻⁵. Una ilustración adicional de procesos de selección adecuados para adenovirus sensible a la temperatura se pueden encontrar, por ejemplo, en Ensinger et al., *J. Virol.* 10:328, 1972; y Williams et al., *J. Gen Virol.* 11:95, 1971. Una descripción de variantes de adenovirus que no son sensibles a la temperatura, pero son sensibles al intervalo del huésped puede encontrarse en Harrison et al, *Virology* 77:319, 1977. Mutantes sensibles a la temperatura, eficaces para uso en esta invención, se pueden preparar, por ejemplo, a partir de virus helper alternativos tales como herpes simplex 1 (HSV1) o herpes simplex 2 (HSV2). Véase, p. ej., Schaffer et al, *Virology* 52:57, 1973 para HSV1; Esparza et al, *Virology* 57:554, 1974 para HSV2. Tal como se indica en la sección de antecedentes, se ha descrito un gran número de virus helper sensibles a la condición, y se pueden obtener de los científicos que los desarrollaron o describieron o de un depositario público.

La cepa debe hacerse sensible a la condición en una etapa de su ciclo de replicación de manera que la función que está bloqueada en condiciones no permisivas no es una que se requiera para la replicación de alta eficiencia de AAV. La elección de qué cepa de virus helper utilizar se puede hacer por referencia tanto a la biología conocida del virus helper como a los requisitos de replicación de AAV.

Un virus helper ilustrativo para uso con esta invención es el adenovirus ts149 sensible a la temperatura del serotipo Ad5 (Ad5ts149). Bajo condiciones optimizadas, esta cepa puede ser utilizada para producir rAAV a niveles que igualan o superan los sustentados por Ad5 de tipo salvaje. El ts149 tiene una única transición de C-G a A-T en la posición 7563 (Roovers et al., *Virus Genes* 4:53, 1990). Esto resulta en un cambio de aminoácido leucina en el residuo 411 de la ADN polimerasa a fenilalanina. La ADN polimerasa está contenida dentro de la unidad de transcripción E2 de adenovirus. Sin embargo, otros mutantes ts que mapean a esta región son menos adecuados. En particular, la unidad de transcripción E2 también comprende la región codificadora para la proteína de unión a ADN de 72 kDa (DBP). Una cepa que no produce DBP detectable (Add/802) es compatible con la replicación de AAV, pero a un nivel que se reduce en un orden de magnitud (Carter et al., *Virology* 191:473, 1992). Adts125, que también comprende una mutación mapeada a la región codificadora de DBP, apoya la replicación de AAV (Straus et al., *J. Virol* 17:140,1976), aunque los niveles son generalmente mucho menores que con Ad5 de tipo salvaje (Myers et al., *J. Virol.* 35:65, 1980). Por consiguiente, vectores de adenovirus sensibles a la temperatura, adecuados para uso en esta invención, incluyen aquellos para los que la sensibilidad mapea a la región E2A del genoma, preferiblemente a la región codificadora de la ADN polimerasa.

El experto puede determinar fácilmente qué cepas virales son adecuadas para uso como virus helper mediante la realización de un ensayo de replicación de rAAV utilizando un panel de cepas de virus helper candidatas en una célula candidata bajo condiciones que son no permisivas para la auto-replicación del helper. Para las variantes sensibles a la temperatura, el rastreo se realiza a la temperatura no permisiva de acuerdo con las propiedades conocidas de la cepa. Temperaturas no permisivas son generalmente más altas que las temperaturas permisivas, típicamente de aproximadamente 35°-50 °C, preferiblemente 38° -45 °C, más preferiblemente de aproximadamente 39,5 °C. Se prefieren variantes que apoyan la replicación de AAV a un nivel que está dentro de un orden de magnitud del apoyado por el virus de tipo salvaje correspondiente. En la realización del rastreo, el experto debería incorporar las otras enseñanzas de esta descripción. En particular, es insuficiente el cribado mediante el cultivo varias veces que dan una replicación del AAV pico con virus de tipo salvaje. Debería establecerse una matriz cinética, en la que los virus helper candidatos se utilizan durante períodos más largos, y luego se comparan con el virus de tipo salvaje en el momento de recolección pico.

Una vez que se ha seleccionado una cepa de virus helper adecuada, se puede implementar en esta invención en un cierto número de formas diferentes. Se pueden utilizar partículas virales, plásmidos virales y células huésped transformadas de manera estable.

En una realización, el genoma del virus helper (o mínimamente, las regiones de la función helper que codifica el genoma del virus helper) se introduce en la célula huésped a utilizar para la replicación del vector de rAAV en la forma de un plásmido de ADN, o una pluralidad de plásmidos que proporcionan funciones complementarias. Procedimientos para la manipulación experimental de adenovirus son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Graham et al., "Manipulation of adenovirus vectors". En: Murray EJ, comp. *Methods in molecular biology: Gene transfer and expression protocols*, vol7. Clifton, NJ: The Human Press, 1991:109-128, que proporciona protocolos detallados para la propagación, titulación y purificación de adenovirus, la cotransfección y la recombinación in vivo. Plásmidos de adenovirus están disponibles comercialmente de Microbix Biosystems Inc., Toronto, Canadá.

En otra realización, la célula huésped es transfectada de forma estable con genes de adenovirus, o es alterada genéticamente para proporcionar las funciones necesarias para la replicación de rAAV. Alternativamente, la célula huésped puede ser alterada genéticamente con sólo una porción del genoma del adenovirus, y subsiguientemente se infecta o transfecta con una partícula de adenovirus o un plásmido. Las solicitudes de patente WO 95/27071 y

WO 95/34671 describen células huésped alteradas de forma hereditaria para proporcionar la función de adenovirus, que complementa la propiedad replicativa de diversas construcciones de adenovirus defectuosas.

En aún otra realización, la célula huésped utilizada para la replicación de AAV está infectada con un virus helper que es capaz de autorreplicación, pero no bajo condiciones no permisivas. Se puede utilizar cualquier preparado de la cepa requerida que proporcione una MOI suficiente. De acuerdo con GMP y otros requisitos reglamentarios, y para facilitar la ampliación con fines comerciales, preparados de virus helper comprenden preferiblemente una alta densidad de partículas infecciosas y están sustancialmente exentos de desechos celulares y otros contaminantes. Propiedades deseables incluyen las siguientes:

- Una densidad de al menos 10^6 , preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{10} UI/ml, según se determina en un ensayo TCID₅₀.

- Una relación de ADN de adenovirus a proteína total o hexón de adenovirus que indica que al menos 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% de las partículas virales contienen ADN de adenovirus.

- Menos de 20%, preferiblemente menos de aproximadamente 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente 1% de contaminación por material no adenovirus al nivel de proteínas o ADN, tal como se detecta por geles de SDS teñidos para proteína, o geles de agarosa de digestos de nucleasas de restricción teñidos con bromuro de etidio.

- Un total de al menos 10^9 , preferiblemente al menos aproximadamente 10^{11} , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{13} UI por lote de producción.

Virus helper se puede preparar en cualquier célula que sea permisiva para la replicación viral. Para adenovirus, las células preferidas incluyen células 293 y células HeLa. Tradicionalmente, cuando estas células se han utilizado para la replicación de adenovirus, han sido utilizadas en cultivos en placa. Estos métodos generalmente apoyan la replicación de adenovirus sensible a la temperatura a niveles que son uno o dos logs más bajos que los de adenovirus de tipo salvaje.

Por consiguiente, es preferible emplear técnicas de cultivo que permitan un incremento en la densidad de siembra. Están disponibles células 293 y variantes de células HeLa que han sido adaptadas a cultivo en suspensión. HeLa es preferible por razones de crecimiento celular, viabilidad y morfología en suspensión. Estas células pueden ser cultivadas a una densidad suficiente (2×10^6 por ml) para compensar la tasa de replicación más baja de la cepa de adenovirus sensible a la temperatura. Una vez establecidas, las células se infectan con el virus y se cultivaron a la temperatura permisiva durante un periodo suficiente; generalmente 3-7 días y, por lo general, aproximadamente 5 días.

La filtración de flujo tangencial es una técnica utilizada en la técnica para el procesamiento de grandes volúmenes de células de mamífero con el propósito de perfundir, concentrar y recolectar las mismas. Véase, p. ej., Dorin et al., *Biotechnol. Prog.* 6:494, 1990; Maiorella et al., *Biotechnol. Bioeng.* 37:121, 1991. Se recomienda que esta técnica sea utilizada con cultivos en suspensión para la preparación de virus helper para uso en esta invención. Células HeLa S3 resisten fuerzas de cizallamiento de $750\text{-}1500\text{ s}^{-1}$, permitiendo la concentración de las células y la diafiltración de medio consumido.

Virus se recolecta del cultivo, ya sea a partir de los medios consumidos o mediante microfluidización de las células. El nivel de virus helper producido en el cultivo es típicamente de al menos 10^7 UI/ml, y preferiblemente al menos aproximadamente 3×10^7 UI/ml.

Virus helper preparado de acuerdo con la descripción anterior puede ser utilizado directamente para infectar células huésped utilizadas para la replicación de rAAV. Más habitualmente, el virus se aísla y concentra antes de su uso. Métodos actuales para purificar y concentrar virus helper implican típicamente gradientes de CsCl isopícnicos. Este método lleva tiempo y es laborioso, requiere numerosas etapas de procesamiento abierto, y es difícil de ampliar. En su lugar, se recomienda la purificación mediante cromatografía. Se remite al lector generalmente a Prior et al., *Pharmaceut. Technol.* 19:30, 1995; y Huyghe et al, *Human Gene Therapy* 6:1403,1995. Particularmente preferidos para el aislamiento de cepas sensibles a la temperatura de adenovirus es la cromatografía de intercambio de aniones, especialmente en una resina de polietilenimina utilizando un gradiente continuo de NaCl a pH 7,4.

Técnicas de Producción y Purificación de AAV Preferidos para uso en la Presente Invención

Como con virus helper, es conveniente para fines ilustrativos dividir la discusión de la producción y purificación de AAV en fases de proceso "aguas arriba" y "aguas abajo"; con el proceso de "aguas arriba" se alude generalmente a la producción de AAV en células huésped adecuadas y a la liberación del virus de las células para producir un preparado "crudo" de AAV. El procesamiento de "aguas abajo" se puede emplear para purificar el preparado de AAV (p. ej., para aislar AAV lejos de las proteínas celulares y/u otros contaminantes).

En aspectos preferidos de la presente invención, los procesamientos de aguas arriba y aguas abajo de AAV se llevan a cabo de una manera diseñada para reducir sustancialmente y/o eliminar la contaminación de proteínas celulares, así como cualquier virus helper contaminante (p. ej., Ad) o proteínas de virus helper, cualquiera de los cuales podría contribuir a la obtención de una respuesta inmune si está presente en niveles sustanciales en el preparado final de vector de rAAV a utilizar para la transferencia de genes.

Las secciones siguientes describen, con fines de ilustración, las técnicas que se pueden emplear para la producción de AAV.

(i) Procesamiento de Aguas Arriba de AAV

Vector de AAV puede ser producido a partir de una línea celular de mamífero que contiene los genes de empaquetamiento de AAV necesarios (p. ej., un gen *rep* y *cap* de AAV); un pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido heterólogo no AAV flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y un virus helper para AAV (p. ej. un adenovirus). Estos componentes se pueden introducir en la célula en una diversidad de configuraciones. Ya que el AAV puede ser replicado y empaquetado en cualquiera de una diversidad de células de mamífero, hay un gran número de líneas celulares que pueden modificarse y emplearse para la producción de AAV.

A modo de ilustración, vector de AAV se puede producir a partir de una línea celular tal como "C12" (según se describe por K.R. Clark et al, Gene Therapy, 3:1124-1132, 1996) o la línea "C137.5" (descrita en una solicitud en tramitación de propiedad común por Targeted Genetics Corporation, J. Allen et al., documento WO 96/17947), que ha sido diseñado para contener una construcción *rep* y/o *cap*, así como una construcción de vector. Opcionalmente, una línea celular tal como C12 o c137 que contiene una construcción *rep* y/o *cap* puede ser transfectada con un plásmido que contiene una construcción de vector tal como ptgAAV-CF. O una célula puede ser transfectada con un plásmido que contiene *rep* y *cap*, tal como pRS5, así como un plásmido que contiene una construcción de vector. La célula puede estar infectada con adenovirus, o transfectada con ADN que contiene genes de adenovirus.

Se puede generar una diversidad de tales células "productoras" de AAV según se describe en las referencias citadas en esta memoria y en la técnica.

Las células productoras de AAV pueden ser cultivadas bajo condiciones (incluyendo los medios, temperatura y similares) que son generalmente adecuadas para el crecimiento de las células de mamíferos, que son generalmente también permisivas para la replicación de AAV. Por ejemplo, se prefiere el medio de suspensión DMEM/F12 para el crecimiento de las células y el medio DMEM solo se prefiere para la producción del vector de AAV. Como es conocido en la técnica, algunos tipos de células y líneas celulares tienden a ser dependientes de la fijación, mientras que otros son capaces de crecer en suspensión; y muchas células dependientes de la fijación también se pueden "adaptar" al crecimiento en suspensión mediante el ciclado de las células bajo condiciones de suspensión como un medio de enriquecimiento y, en última instancia, para la selección de variantes que son capaces de crecimiento en suspensión. Por consiguiente, el crecimiento de las células para la producción de AAV puede llevarse a cabo en cualquiera de una diversidad de recipientes, dependiendo en parte de si la línea celular productora seleccionada es relativamente dependiente de la fijación o está adaptada a la suspensión. Recipientes de este tipo para el crecimiento de células dependientes de la fijación incluyen, por ejemplo, matraces de cultivo tisular, botellas de rodillos, microsoportes y biorreactores (tales como de fibras huecas, de lecho empaquetado o biorreactores de lecho fluido). Recipientes para líneas celulares de mamífero adaptadas a la suspensión incluyen, por ejemplo, matraces de agitación, reactores de tanque y fermentadores de elevación de aire.

La replicación de AAV prosigue durante un período de tiempo, así como hasta un punto en el ciclo de crecimiento en donde la producción viral es óptima, preferiblemente crecimiento logarítmico de medio a tardío (típicamente uno a tres días), después de lo cual las partículas de virus se recolectan a partir del sobrenadante del cultivo.

La filtración de flujo tangencial (TFF) se puede emplear beneficiosamente para el procesamiento y la recolección de grandes volúmenes de células. La TFF se puede utilizar para perfundir, concentrar y recolectar células animales. Por ejemplo, la TFF se puede utilizar para procesar las células bajo condiciones de flujo laminar a tasas medias de cizallamiento de pared de hasta 3000 por segundo (véase, p. ej., Maiorella, B. et al, Biotechnology and

Bioengineering, 37: 121-126, 1991). La concentración a gran escala de virus utilizando la ultrafiltración TFF ha sido descrita por R. Paul et al. Human Gene Therapy, 4:609-615, 1993.

Series de producción que emplean tales técnicas ilustrativas se describen a continuación.

(ii) Procesamiento de Aguas Abajo de AAV

5 Tal como se describió anteriormente, sería particularmente ventajoso obtener preparados de AAV que estén sustancialmente exentos de partículas de virus helper (tales como partículas Ad). Además, los preparados de vector de AAV estarán preferiblemente también sustancialmente exentos de virus helper y proteínas celulares (que también pueden ser inmunogénicas). Sin embargo, hay un conjunto adicional de las limitaciones que influyen en la idoneidad de las técnicas para la producción de AAV. A saber, con el fin de ser particularmente útiles para la producción de AAV para la terapia génica, lo más deseable es que las técnicas sean "ampliables", es decir, aplicables en unión con dispositivos y procedimientos de fabricación a gran escala. Este último conjunto de restricciones reduce o elimina eficazmente la utilidad de técnicas estándares disponibles tales como la separación de cloruro de cesio (que no es bien adecuada para procedimientos de preparación a gran escala).

15 Preferiblemente, las partículas de rAAV se purifican adicionalmente por procedimientos cromatográficos de intercambio de iones que contrastan con diversos procedimientos mencionados en la técnica para la purificación potencial de, p. ej., AAV o Ad. En particular, tales procedimientos según se describen en la técnica emplean típicamente un solo tipo de separación iónica, a veces en combinación con otros tipos de procedimientos cromatográficos (véase, p. ej., K. Tamayose et al, Human Gene Therapy 7:507-513 (1996), y documento WO96/27677, 12 de sept., 1996). Sin embargo, en el caso de la producción de AAV, una combinación de cromatografía de intercambio de iones opuestos secuencial es particularmente eficaz para la generación de preparados de AAV que están sustancialmente exentos de partículas de virus helper y proteínas, así como proteínas celulares. Una combinación de ambos intercambios iónicos opuestos es particularmente eficaz para la eliminación de todos los diversos contaminantes de partículas y proteínas que típicamente se producen en la generación o preparados de vector de AAV.

25 Cualquiera de una diversidad de resinas de intercambio de cationes y aniones se pueden emplear en unión con estos procedimientos, las propiedades fundamentales de los cuales son la disponibilidad de grupos cargados negativa y positivamente, respectivamente, a los que AAV se puede unir al menos en cierta medida (lo más preferiblemente hasta un grado que difiere sustancialmente de la afinidad de unión relativa de uno o más de los contaminantes mencionados anteriormente, es decir, partículas Ad y proteínas, así como proteínas celulares de mamíferos). Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la etapa de intercambio aniónico es particularmente efectiva para separar AAV de adenovirus; mientras que se cree que ambas etapas (pero especialmente la etapa de intercambio catiónico) son particularmente eficaces para separar AAV de proteínas celulares. Los autores de la invención han empleado también intercambio de aniones seguido de filtración de flujo tangencial tal como se describe e ilustra más adelante. Como se describe más adelante, han encontrado que los preparados de AAV pueden ser altamente concentrados por cromatografía sobre sulfato de heparina.

40 A modo de ilustración, un lisado aclarado de AAV según se describe anteriormente se puede cargar en una columna de intercambio de aniones cargada positivamente, tal como una resina amino o imino N cargada (p. ej., POROS 50 PI, o cualquier DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria, o resina a base de PEI) o una columna de intercambio de cationes cargada negativamente (tal como HS, SP, CM o cualquier resina catiónica basada en sulfo, fosfo o carboxi). La columna se puede lavar con un tampón (tal como tampón de cromatografía A/TMEG). La columna se puede eluir con un gradiente de concentración creciente de NaCl y las fracciones se pueden recoger y someter a ensayo en cuanto a la presencia de AAV y/o contaminantes.

45 Otros procedimientos pueden ser utilizados en lugar de o, preferiblemente, además de los procedimientos de intercambio de aniones y cationes descritos anteriormente, basados en asociaciones inter-moleculares mediadas por características distintas de la carga tal como se conoce en la técnica. Tales otros procedimientos incluyen asociaciones intermoleculares basadas en pares de ligando-receptor (tales como interacciones anticuerpo-antígeno o lectina-hidrato de carbono), así como separaciones basadas en otros atributos de las moléculas tales como cromatografía de tamizado molecular basado en el tamaño y/o la forma. Por poner un solo ejemplo, el filtrado o el preparado de AAV parcialmente purificado se puede cargar en una columna que contiene un anticuerpo específico para AAV. Esta columna puede unirse a AAV. La columna se puede lavar con tampón para separar las proteínas contaminantes, y después se puede eluir con un gradiente o etapa de aumentar la concentración de NaCl y las fracciones se pueden recoger. Alternativamente, una columna de este tipo se puede eluir con un tampón de pH diferente al del tampón de carga.

Los picos de AAV y adenovirus pueden ser identificados en las fracciones por ensayos de infectividad o mediante una hibridación de ácido nucleico o inmunoensayos. Los picos se pueden agrupar, y la agrupación se puede diluir o dializar o diafiltrar con un tampón (p. ej., TMEG o equivalente) para reducir la concentración de sal.

5 Esta agrupación se puede inyectar en una columna de intercambio de aniones cargada positivamente y/o una columna de intercambio de cationes cargada negativamente (tales como los mencionados anteriormente). La columna se puede lavar con un tampón (tal como tampón de cromatografía A/TMEG). La columna se puede eluir con un gradiente de concentración creciente de NaCl y las fracciones se pueden recoger. Los picos de AAV y adenovirus pueden ser identificados en las fracciones mediante un ensayo de infectividad o mediante una hibridación de ácido nucleico o inmunoensayo. Los picos se pueden agrupar sobre la base de los resultados de
10 cualquiera de estos ensayos.

La agrupación de fracciones que contienen AAV eluidas de una columna de intercambio de aniones según se describe anteriormente se puede concentrar y purificar por filtración tangencial de flujo (TFF), por ejemplo en una unidad Filtron Ultrasette o Millipore Pellicon. Una membrana de corte de peso molecular adecuado (tal como un corte de 100,00 ó 300.000), se compone típicamente de un polímero tal como celulosa regenerada o polietersulfona.
15 El preparado se filtra a través de la membrana, y se conserva el producto. El material retenido se puede diafiltrar utilizando la membrana con lavados sucesivos de un tampón adecuado tal como solución salina equilibrada de Ringer + 5% de glicerol. La muestra final es altamente enriquecida para el producto y puede ser filtrada en condiciones estériles a través de un filtro de 0,2 μ y almacenada para su uso.

20 En la purificación y concentración de AAV con filtración de flujo tangencial de material de la columna de intercambio post-aniónico, la membrana de corte de peso molecular 300.000 han resultado mayores rendimientos de unidades replicativas que la membrana de corte de peso molecular 100.000.

Una etapa adicional que se puede emplear para la separación de adenovirus, si se desea, implica el tratamiento de la agrupación de eluyentes con una etapa de inactivación por calor (según se describe en esta memoria) y después filtración (p. ej., antes de someter el preparado a TFF). Sin embargo, los autores de la invención han encontrado que
25 el procedimiento de "intercambio de aniones-a-TFF" descrito anteriormente dio como resultado una preparación de AAV que estaba libre de adenovirus detectable, y dio lugar a mejores rendimientos de AAV purificado.

Series de producción ilustrativas que emplean técnicas de este tipo se describen a continuación.

La descripción anterior proporciona, entre otras cosas, métodos para generar preparados con alto título de vectores de AAV recombinantes que están sustancialmente exentos de virus helper (p. ej., adenovirus) y proteínas celulares.
30 Se entiende que se pueden aplicar variaciones a estos métodos por los expertos en esta técnica sin apartarse del espíritu de esta invención.

Los ejemplos que se presentan a continuación se proporcionan como una guía adicional para un practicante de experiencia normal en la técnica, y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

EJEMPLOS

35 EJEMPLO 1

Métodos generales

Cuantificación de títulos de rAAV en preparados de vectores: ensayo de transferencia en ranura

El ensayo de transferencia en ranura de ADN de rAAV se llevó a cabo como sigue. Se digirieron partes alícuotas de muestras con nucleasa para separar el ADN no encapsidado. Las muestras se desnaturalizaron a continuación en
40 NaOH 0,4 M, EDTA 10 mM con 1,0 μ g/ml de ADN de esperma de salmón a 65 °C. Las muestras y los patrones de rAAV se diluyeron y se filtraron sobre membranas de nilón utilizando un colector de transferencia en ranura y se lavaron con NaOH 0,4 M. El filtro se hibridó con un fragmento de restricción de ADNc de CFTR humano marcado con ³²P. Esta sonda detecta un fragmento de aproximadamente 1,5 kb a partir del vector AAVCF (correspondiente al fragmento EcoRI de 1,488 kb predicho).

45 **Ensato de infectividad por microtitulación para medir rAAV**

El ensayo de infectividad por microtitulación se llevó a cabo como se describió previamente. Atkinson et al. (1998) *Nucleic Acids Research* 26 (11): 2821-2823. En síntesis, se realizó un ensayo de infectividad por microtitulación de

5 alto rendimiento para medir el virus infeccioso como sigue. Partes alícuotas (10 µl) de sobrenadantes exentos de células diluidos en serie se inocularon en células del clon HeLa 37 cultivadas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de tres días, las células infectadas se trataron y se lisaron con una disolución de desnaturalización (adición de 1/10 de volumen de NaOH 4,0 M, 10 µg/ml de ADN de esperma de salmón y EDTA 100 mM). El lisado se transfirió a una placa Silent Monitor BiodyneB (Pall) y se filtró en vacío sobre la membrana de nilón. La membrana se lavó, desnaturalizó e hibridó con un fragmento de restricción de ADNc de CFTR humano marcado con ³²P. Esta sonda detecta un fragmento de aproximadamente 1,5 kb del vector AAVCF (correspondiente al fragmento EcoRI de 1,488 kb predicho). La replicación del vector se cuantificó en relación con una banda de CFTR genómica endógena y se expresa como unidades de replicación. Una unidad de replicación (RU) se define como una intensidad de señal equivalente a la de la banda de CFTR genómica endógena que es de aproximadamente 1,8 kb. La regresión lineal de las normas de vectores conocidos diluidas en serie se utilizó para extrapolar y calcular la concentración de vector en las muestras.

Medios de producción

15 ablas 1 y 2 proporcionan las concentraciones de componentes (en mg/l) de medios adecuados para el cultivo de células y la producción de rAAV (los espacios en blanco indican una concentración cero). En general, es preferible tener niveles séricos reducidos. Por ejemplo, los medios utilizados en estos experimentos contenían suero bovino fetal (FBS) aproximadamente al 1%.

TABLA 1

	Concentración
SALES INORGANICAS	
CaCl ₂ anhidro	200
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1
KCl	400
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
NaCl	4675
NaHCO ₃	1200
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125
OTROS COMPONENTES	
Glucosa	8500
HEPES	3575
Rojo fenol, sal de Na	
Piruvato sódico	110
Pantotenato cálcico	6
Cloruro de colina	6
Ácido fólico	6
Inositol	11
Nicotinamida	6
Piridoxal HCl	2
Piridoxina HCl	4
Riboflavina	0,6
Tiamina HCl	6
F-68	500
AMINOÁCIDOS	
L-alanina	8,9
L-arginina·HCl	236,9
L-asparagina·H ₂ O	17
Ácido L-aspartico	13,3
L-cisteína	72
Ácido L-glutámico	14,7
L-glutamina	1168
Glicina	37,5
L-histidina·HCl·H ₂ O	84
L-isoleucina	157,3
L-leucina	157,2
L-lisina·HCl	218,7
L-metionina	45,1

L-fenilalanina	99
L-prolina	11,5
L-serina	52,5
L-treonina	142,8
L.-triptófano	26,2
L-tirosina	108
L-valina	140,4

TABLA 2

5	<i>Componente</i>	<i>Concentración, mg/L</i>
	CaCl ₂	200
	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1
	KCl	400
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
10	NaCl	4675
	NaHCO ₃	1200
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125
	glucosa	4500
	HEPES	3575
15	piruvato sódico	110
	pantotenato cálcico	4
	cloruro de colina	4
	ácido fólico	4
	inositol	7
20	nicotinamida	4
	piridoxal·HCl	
	piridoxina·HCl	4
	riboflavina	0,4
	tiamina·HCl	4
25	F68	500
	L-alanina	
	L-arginina·HCl	84
	L-asparagina	
	ácido L-aspartico	
30	L-cisteína	48
	L-glutámico	
	L-glutamina	876
	glicina	30
	L-histidina·HCl·H ₂ O	42
35	L-iso-leucina	104,8
	L-leucina	104,8
	L-lisina·HCl	146,2
	L-metionina	30
	L-fenilalanina	66
40	L-prolina	
	L-serina	42
	L-treonina	95,2
	L-triptófano	16
	L-tirosina	72
45	L-valina	93,6

EJEMPLO 2

Efecto del pH sobre la producción de partículas de vector de rAAV en lisados de células productoras

Células JL14 se inocularon a aproximadamente 3×10^5 células/ml en un biorreactor de 3 litros y se cultivaron en 1,5 litros del medio de rAAV mostrado en la Tabla 2. Dos días después de la inoculación del medio de cultivo en el biorreactor con células JL14, el biorreactor se perfundió con medio reciente, comenzando con 0,4 volúmenes por día, a continuación duplicando esta cantidad cada 24 horas a partir de entonces. Después de 5 días, o cuando la densidad celular alcanzó 6×10^6 células/ml, se separaron 3×10^8 células y se cultivaron bajo condiciones estándar,

es decir, permitiendo que el pH variara. Las células restantes en el biorreactor se concentraron en un volumen de 750 ml de medio de cultivo, y se realizó un intercambio de tres volúmenes de medio con medio de producción (es decir, medio como en la Tabla 2) a pH 7,2 para intercambiar el medio, de modo que el volumen final del cultivo celular fuese 750 ml. Adenovirus tipo 5 se cultivó a partir de un material obtenido de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). El adenovirus se diluyó en 750 ml de medio de producción y se añadió a las células (multiplicidad de infección (MOI) = 10), llevando el volumen final a 1,5 litros. Se dejó que la infección con adenovirus procediera durante una hora a 37 °C.

Después de dejar que prosiguiera la infección, 1×10^5 células se transfirieron a cada uno de 5 matraces rotativos separados. El volumen en los cinco matraces se llevó hasta 1,5 litros con medio de producción a un pH de 6,6, 7,0, 7,2, 7,4 y 7,8, respectivamente. Los contenidos de los matraces rotativos se transfirieron a biorreactores separados, que luego se mantuvieron individualmente a pH 6,6, 7,0, 7,2, 7,4 y 7,8. Otros parámetros del medio de cultivo fueron los siguientes: temperatura = 37 °C; concentración de oxígeno disuelto (DO_2) = 30%; y agitación = 150 rpm. Temperatura, pH, DO_2 , densidad celular, osmolaridad y glucosa/lactato se monitorizaron diariamente. Muestras de células fueron recolectadas el día 2 y el día 3 post-infección y se lisaron. Los lisados celulares se sometieron a ensayo mediante el ensayo de transferencia en ranura de partículas resistentes a ADNasa (DRP) y por el ensayo de infectividad por microtitulación.

Las Figuras 1A y 1B son gráficos de barras que representan los resultados de dos experimentos separados, expresados como DRP por célula a los diversos niveles de pH. Las barras en negro representan DRP/células el día 2 después de la infección; las barras sombreadas representan DRP/células el día 3. La DRP/células en los cultivos mantenidos a pH 7,2, pH 7,4 y pH 7,8 disminuyó drásticamente desde el día 2 al día 3 post-infección, mientras que esta reducción no fue tan pronunciada en el cultivo de células de control. La densidad celular total no cambió de forma apreciable bajo estas condiciones de cultivo.

EJEMPLO 3

Efecto del pH sobre la liberación de partículas de vector de rAAV en el medio de cultivo celular

En síntesis, células productoras de AAV se hicieron crecer en biorreactores. Las células fueron infectadas luego con Ad5 a una MOI = 10 y se inocularon en los medios de bajo contenido en suero (véase la Tabla 2) en suspensión en biorreactores de 1,5 litros. Los cultivos se mantuvieron a diversos niveles de pH elevados (7,2 a 8,0). Los cultivos se monitorizaron después diariamente en cuanto al número de células, la viabilidad, el consumo de glucosa, la producción de lactato, pH, osmolaridad y producción de AAV. Tal como se muestra más adelante, se produjo un aumento en la producción de AAV cuando el pH se elevó a 7,4; junto con un aumento aún más drástico en el número de partículas de AAV liberadas en el sobrenadante (que aumentó a medida que el pH se elevaba):

pH del cultivo	Partículas asociadas a Partículas	Partículas del Sobrenadante	Partículas Totales	% asociado a células	% en el Sobrenadante
7,2	4,70E + 12	1,90E + 09	4,70E + 12	100%	0%
7,4	6,50E + 12	1,30E + 13	1,95E + 13	33%	67%
7,6	3,40E + 12	1,50E + 13	1,84E + 13	18%	82%
8,0	1,30E + 12	1,50E + 13	1,63E + 13	8%	92%

En suma, al aumentar el pH, se observó un fuerte incremento en el número de partículas de AAV liberadas en el sobrenadante, y un desplazamiento en el porcentaje de sobrenadante: partículas asociados a células (de casi todas las células asociadas a pH 7,2 para la mayoría del sobrenadante (92%) a pH 8,0).

Para investigar adicionalmente los efectos del pH sobre la producción de vector de rAAV, las células JL14 fueron cultivadas en un biorreactor de perfusión según se describe anteriormente (utilizando los medios descritos en la Tabla 1) a una densidad de 10^7 células/ml. El cultivo celular se concentró hasta un volumen de 750 ml y el medio se intercambió realizando 3 diavolumenes. El volumen total se llevó a 1,5 litros con medio de producción que contiene adenovirus a una MOI de 10. Se dejó que la infección prosiguiera durante una hora.

Después de dejar que prosiguiera la infección, 1×10^5 células se transfirieron a cada uno de 5 matraces rotativos separados. El volumen en los cinco matraces se llevó a 1,5 litros con medio de producción a un pH de 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, y matraces de control (pH no se mantiene en el nivel de partida). Los contenidos de los matraces rotativos se transfirieron a biorreactores separados, que luego se mantuvieron individualmente a pH 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0. Los biorreactores mantuvieron el pH al nivel establecido $\pm 0,05$ unidades de pH. Otros parámetros del medio de cultivo

fueron las siguientes: temperatura = 37 °C; concentración de oxígeno disuelto (DO₂) = 30%; y agitación = 150 rpm. Las células y los sobrenadantes de cultivo (medio de cultivo) se recogieron los días 2 y 3.

Los resultados se muestran en las Figuras 2A y 2B. Las Figuras 2A y 2B son gráficos de barras y representan los resultados, expresados como DRPs totales, de producción de rAAV en biorreactores mantenidos a diversos niveles de pH. Los porcentajes sobre cada una de las barras son porcentajes de las DRPs totales en el lisado celular. La porción en negro de cada una de las barras representa DRPs en lisados celulares, mientras que la parte sombreada de cada una de las barras representa las DRPs en el medio de cultivo celular. El día 2 post-infección, el 29% de los DRPs totales estaba en el medio de cultivo del cultivo mantenido a pH 8,0, mientras que el día 3, post-infección, el porcentaje de DRPs totales en el medio de cultivo se elevó a 92%. El día 3 post-infección, el porcentaje de DRPs totales en el medio de cultivo era de 67% a pH 7,4, de 82% a pH 7,6, de 73% a pH 7,8 y de 92% a pH 8,0. Los cultivos mantenidos a pH 7,2 no dieron ninguna DRP en el medio de cultivo celular en este experimento.

Los lisados celulares del día 2 y día 3 post-infección y el medio de cultivo de los biorreactores mantenidos a pH 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 y 8,0 se sometieron a ensayo en cuanto a las unidades de replicación (RU) utilizando un ensayo de infectividad. Los datos se muestran en las Figuras 3A y 3B. La densidad celular total no cambió de forma apreciable bajo estas condiciones de cultivo.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos de barras que representan las unidades de replicación totales (RU) sometidas a ensayo el día 2 (3A) y el día 3 (3B) post-infección en los medios de cultivo (parte sombreada de cada una de las barras) y lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) cuando los cultivos se mantuvieron a los niveles de pH indicados. Los porcentajes por encima de cada una de las barras indican el porcentaje de RUs totales en el lisado celular. Estos datos demuestran que las partículas de rAAV liberadas en el medio de cultivo celular son funcionales en un ensayo de infectividad.

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa la relación partícula:infectividad (P/I) de partículas de rAAV recolectadas de lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 3 post-infección de biorreactores mantenidos a los niveles de pH indicados. Estos datos indican que la mayoría del vector de rAAV liberado en el medio de cultivo celular es infeccioso.

EJEMPLO 4

Efecto de la osmolalidad sobre la liberación de partículas de vector de rAAV en el medio de cultivo celular

Para evaluar los efectos sobre la liberación de rAAV en el medio de cultivo celular a partir de la osmolalidad del medio de cultivo, células JL14 fueron cultivadas en biorreactores y se infectaron con adenovirus esencialmente según se describe en el Ejemplo 2. La osmolalidad de partida en los biorreactores individuales fue 130, 200, 300, 400 y 500 mOsm, respectivamente. En cada uno de los reactores, el pH se mantuvo a pH 8,0 ($\pm 0,05$); temperatura = 37 °C; DO₂ = 30%; y agitación = 150 rpm. En los días 2, 3 y 4 post-infección, los lisados celulares y los medios de cultivo celular se recogieron y analizaron en cuanto a la producción de vector de rAAV.

Los resultados se muestran en las Figuras 5-7.

Las Figuras 5A, 5B y 5C son gráficos de barras que representan las DRPs totales en lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medios de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (5A), día 3 (5B) y el día 4 (5C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad de partida indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barras indican el porcentaje de DRPs totales en el lisado celular. Estos datos demuestran que cuando el medio de cultivo celular tiene una osmolalidad de partida de 300 mOsm, 41%, 59% y 80% de las DRPs totales están en el medio de cultivo celular los días 2, 3 y 4, respectivamente. Una osmolalidad del medio de cultivo de células de partida de 300 mOsm dio el porcentaje máximo de vector total de rAAV en el medio de cultivo celular, en comparación con otros osmolalidades de partida ensayadas. La densidad celular total no cambió de forma apreciable en estas condiciones de cultivo.

Las Figuras 6A, 6B y 6C son gráficos de barras que representan las RUs totales en los lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (6A), el día 3 (6B) y el día 4 (6C) post-infección en biorreactores en los que el medio de cultivo celular contenía la osmolalidad de partida indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barras indican el porcentaje de las RUs totales en los lisados celulares. Estos datos indican que el vector de rAAV liberado en el medio es infeccioso.

La Figura 7 es un gráfico de barras que representa la relación P/I de partículas de rAAV en medios de cultivo celular los días 3 y 4 a partir de cultivos de biorreactor con las osmolalidades de partida indicadas.

EJEMPLO 5*Efecto de la temperatura sobre la liberación de partículas de vector de rAAV en el medio de cultivo celular*

Células JL14 se hicieron crecer en biorreactores y se infectaron con adenovirus, esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Las células se transfirieron a biorreactores mantenidos individualmente en 31 °C, 34 °C, 37 °C, 39 °C y 42 °C, respectivamente. Estas temperaturas se mantuvieron en $\pm 0,5$ °C. El pH en cada uno de los reactores se mantuvo en 8,0 ($\pm 0,05$); agitación = 150 rpm; DO₂ = 30%. Los días 2, 3 y 4 post-infección, los lisados celulares y los medios de cultivo celular se analizaron en cuanto a partículas de rAAV.

Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

Las Figuras 8A-C son gráficos de barras que representan las DRPs totales en lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (8A), el día 3 (8B) y el día 4 (8C) post-infección en biorreactores en los que se mantuvo el medio de cultivo celular a la temperatura indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barras indican el porcentaje de DRPs totales en el lisado celular. Los datos demuestran que cuando se mantuvo el medio de cultivo a 39 °C, 66%, 67% y 57% de las DRPs totales se encontraron en el medio de cultivo celular los días 2, 3 y 4, respectivamente. Los datos indican, además, que un mayor porcentaje de DRPs se encontró en el medio de cultivo celular cuando los medios de cultivo se mantuvieron a 39 °C, en comparación con 37 °C o 42 °C.

Las Figuras 9A, 9B, y 9C son gráficos de barras que representan las RUs totales en lisados celulares (parte en negro de cada una de las barras) y medio de cultivo celular (parte sombreada de cada una de las barras) el día 2 (9A), el día 3 (9B) y el día 4 (9C) post-infección en biorreactores en los que se mantuvo el medio de cultivo celular a la temperatura indicada. Los porcentajes por encima de cada una de las barras en la Figura 9A indican el porcentaje de RUs totales en el medio de cultivo celular. Los porcentajes por encima de cada una de las barras en la Figura 9A indican el porcentaje de RUs totales en el lisado celular. Estos datos demuestran que cuando el medio de cultivo se mantuvo a 39 °C, el 80%, 97% y 98% de las RUs totales se encontraron en el medio de cultivo celular los días 2, 3 y 4, respectivamente. La densidad celular total no cambió de forma apreciable en estas condiciones de cultivo.

El siguiente Ejemplo se proporciona para fines de referencia y no forma parte de la invención.

EJEMPLO 6*Efecto de los suplementos de medio de cultivo sobre la liberación de partículas de vector de rAAV en el medio de cultivo celular*

Células JL14 se hicieron crecer en biorreactores y se infectaron con adenovirus, esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Las células se transfirieron a biorreactores que contenían diversos medios, como sigue: (1) DMEM; (2) DMEM + 4 g/litro de glucosa; (3) DMEM + 4 g/litro de glucosa + glutamina 4 mM; (4) DMEM + 4 g/litro de glucosa + glutamina 4 mM + aminoácidos + vitaminas ("completo"); (5) 2X DMEM. Todas las osmolalidades de partida se ajustaron a 285-300 mOsm. Otros parámetros eran como sigue: temperatura mantenida a 39 °C; pH se mantenido a 8,0; DO₂ = 30%; y agitación = 150 rpm. Tres días post-infección, el sobrenadante del cultivo celular se sometió a ensayo en cuanto a partículas de vector de rAAV.

Los resultados se muestran en las Figuras 10, 11 y 12.

La Figura 10 es un gráfico de barras que representa las DRPs totales en los medios de cultivo tres días post-infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

La Figura 11 es un gráfico de barras que representa las RUs en los medios de cultivo, tres días después de la infección en cultivos desarrollados en los diversos medios indicados.

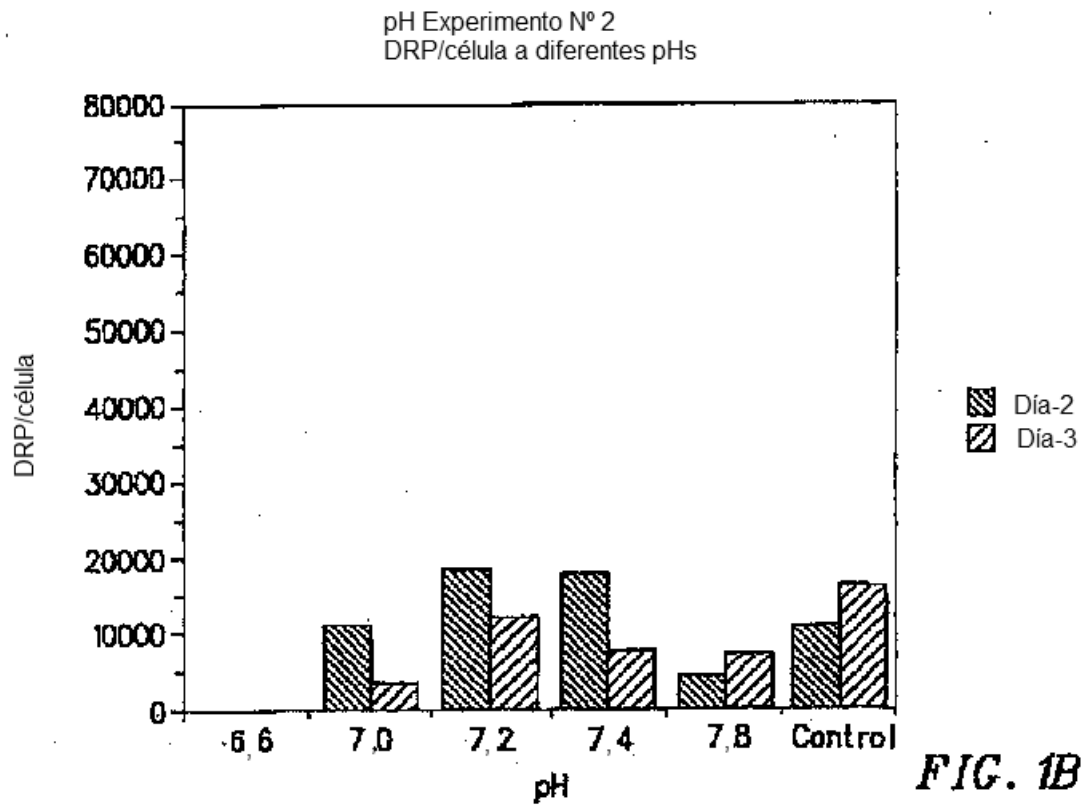
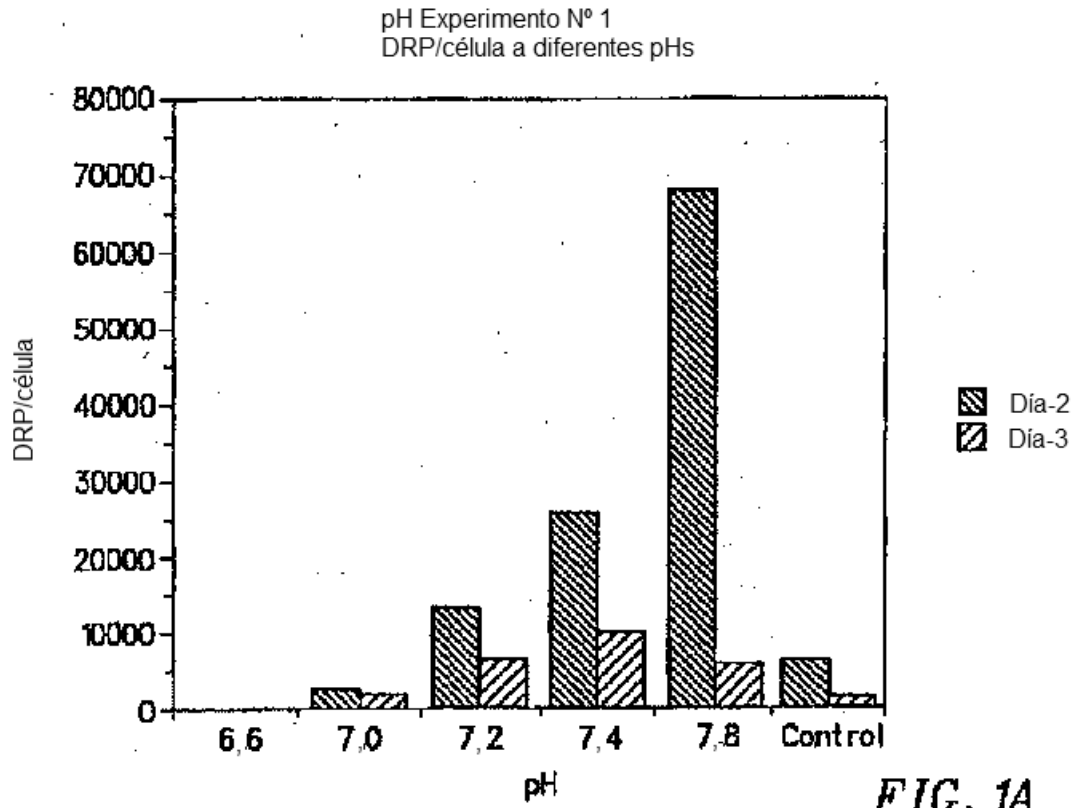
La Figura 12 es un gráfico de barras que representa la relación P/I de partículas virales en el medio de cultivo celular cuando los cultivos se desarrollaron en los diversos medios indicados.

Aunque la invención anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de comprensión, resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones. Por lo tanto, la descripción y los ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención, que está delimitada por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una población de partículas de virus, que comprende la etapa de:
 - a) incubar una célula productora en un medio de cultivo celular y monitorizar y ajustar al menos una condición para fomentar la liberación de partículas de virus de la célula, con lo que las partículas de virus son liberadas de la célula productora al medio de cultivo sin lisar las células, en el que la condición que fomenta la liberación de partículas de virus comprende una o más condiciones seleccionadas de pH, osmolalidad y temperatura, y
 - b) recolectar las partículas virales del medio de cultivo celular sin lisar las células, obteniendo con ello una población de partículas virales; en donde el virus es virus adeno-asociado (AAV).
2. El método de la reivindicación 1, en el que el virus es virus adeno-asociado recombinante (rAAV), y en el que la célula productora comprende:
 - (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV;
 - (ii) un vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido heterólogo no AAV flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y
 - (iii) un virus helper para AAV.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la condición que fomenta la liberación de virus es una combinación de osmolalidad y temperatura.
4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la condición que fomenta la liberación de virus es la osmolalidad.
5. El método de la reivindicación 3 ó 4, en el que la osmolalidad se mantiene en 200 mOsm a 400 mOsm.
6. El método de la reivindicación 3 ó 4, en el que la osmolalidad es 300 mOsm.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la osmolalidad inicial del cultivo celular es 300 mOsm.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que la osmolalidad del cultivo celular se ajusta utilizando NaCl u otra sal, manosa o glucosa, preferiblemente se ajusta utilizando NaCl.
9. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la condición que fomenta la liberación de virus es la temperatura.
10. El método de la reivindicación 3 ó 9, en el que la temperatura es 37 °C a aproximadamente 40 °C.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la temperatura es 39 °C.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células productoras se cultivan durante 48 a 96 horas después de la introducción de la función de virus helper.
13. El método de la reivindicación 2, en el que la función de virus helper se proporciona por virus helper o por una secuencia de polinucleótidos de dicho virus helper que codifica al menos una función de virus helper.
14. Un método de generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho virus helper es un adenovirus, virus herpes o virus de la viruela, opcionalmente en el que dicho virus helper es virus herpes simplex, virus Epstein-Barr, citomegalovirus o virus de la pseudorrabia.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, que comprende, además, las etapas de:
 - c) cromatografiar el medio de cultivo de células productoras de AAV en al menos una cromatografía de intercambio de aniones cargada positivamente; y
 - d) purificar las fracciones cromatográficas que contienen partículas de rAAV de la etapa c) mediante cromatografía de intercambio de cationes o filtración en flujo tangencial para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV.
16. El método de la reivindicación 15, en el que la etapa (d) es una cromatografía de intercambio de cationes.
17. El método de la reivindicación 15, en el que la etapa (d) es una filtración en flujo transversal.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, que comprende, además, las etapas de:
- c) cromatografiar el medio de cultivo de células productoras de AAV en una cromatografía de intercambio de cationes; y
 - d) purificar las fracciones cromatográficas que contienen partículas de rAAV de la etapa c) mediante cromatografía de intercambio de aniones; y
 - e) purificar las fracciones cromatográficas que contienen partículas de rAAV de la etapa d) mediante cromatografía con sulfato de heparina para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV.
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, que comprende, además, las etapas de cromatografiar el medio de cultivo de células productoras de AAV en una pluralidad de cromatografías de intercambio de iones, que comprenden al menos una cromatografía de intercambio de aniones cargada positivamente y al menos una cromatografía de intercambio de cationes cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV.
20. Un método de generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19, en el que dicho vector de rAAV comprende un polinucleótido no AAV heterólogo flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV.
21. Un método de generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19, en el que dicha célula productora de AAV comprende al menos un gen de empaquetamiento de AAV que está establemente integrado en el genoma de dicha célula productora de AAV.
22. Un método de generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19, en el que dicha célula productora de AAV comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV.
23. Un método de generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicho gen *cap* de AAV y gen *cap* de AAV está establemente integrado en el genoma de dicha célula productora de AAV.
24. Un método de generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19, en el que la célula productora es una línea celular de mamífero dependiente de la fijación.
25. Un método de generar una población de partículas de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19, en el que la célula productora es una línea celular de mamífero adaptada en suspensión.



REACTOR CFTR JL-14 pH EXPERIMENTO Nº 3
DISTRIBUCIÓN DE VECTOR EN CÉLULAS/SOBR.
DRPs TOTALES EN CULTIVO DÍA 2

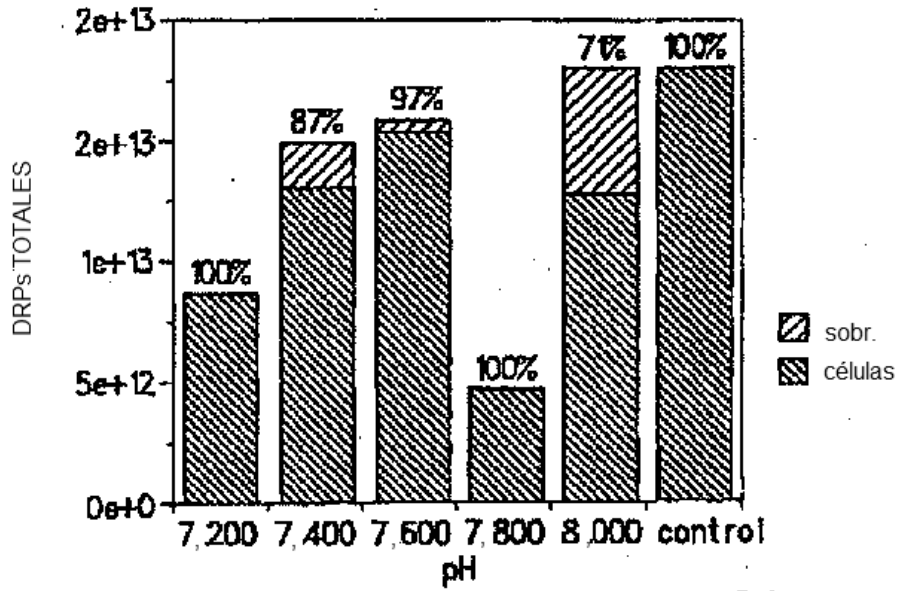


FIG. 2A

REACTOR CFTR JL-14 pH EXPERIMENTO Nº 3
DISTRIBUCIÓN DE VECTOR EN CÉLULAS/SOBR.
DRPs TOTALES EN CULTIVO DÍA 3

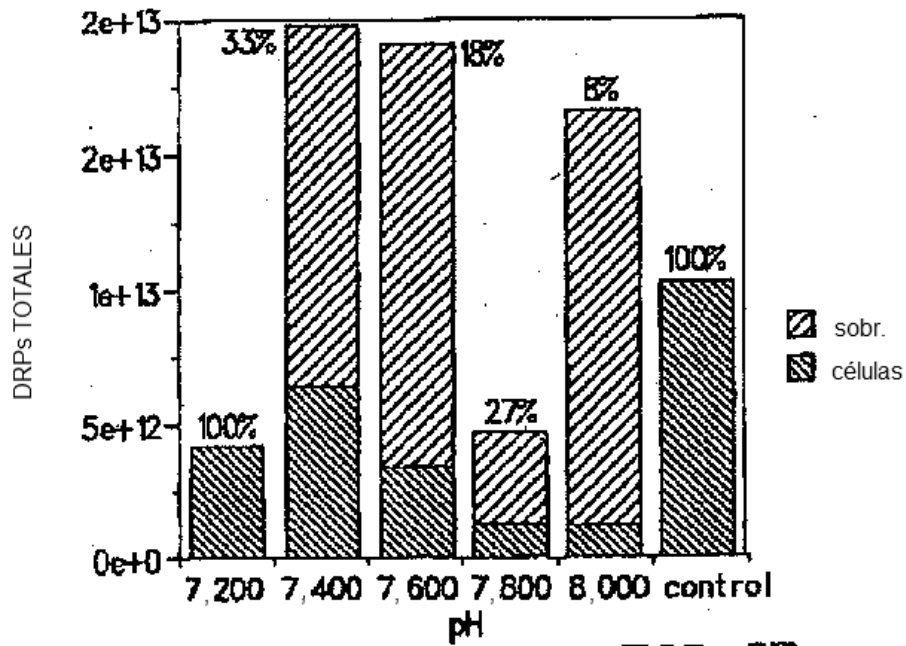


FIG. 2B

REACTOR CFTR JL-14 pH EXPERIMENTO N° 3
DISTRIBUCIÓN DE VECTOR EN CÉLULAS /SOBR.
RUs TOTALES EN CULTIVO DÍA 2

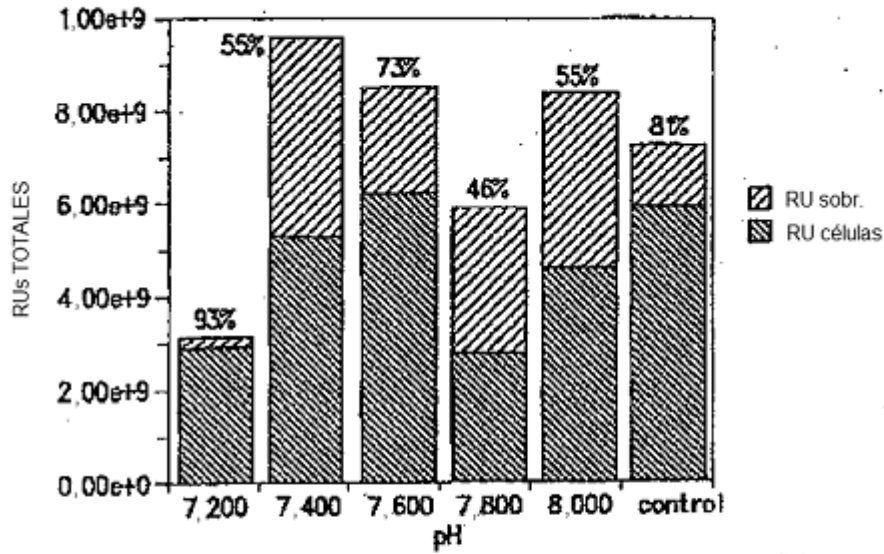


FIG. 3A

REACTOR CFTR JL-14 pH EXPERIMENTO N° 3
DISTRIBUCIÓN DE VECTOR EN CÉLULAS /SOBR.
RUs TOTALES EN CULTIVO DÍA 3

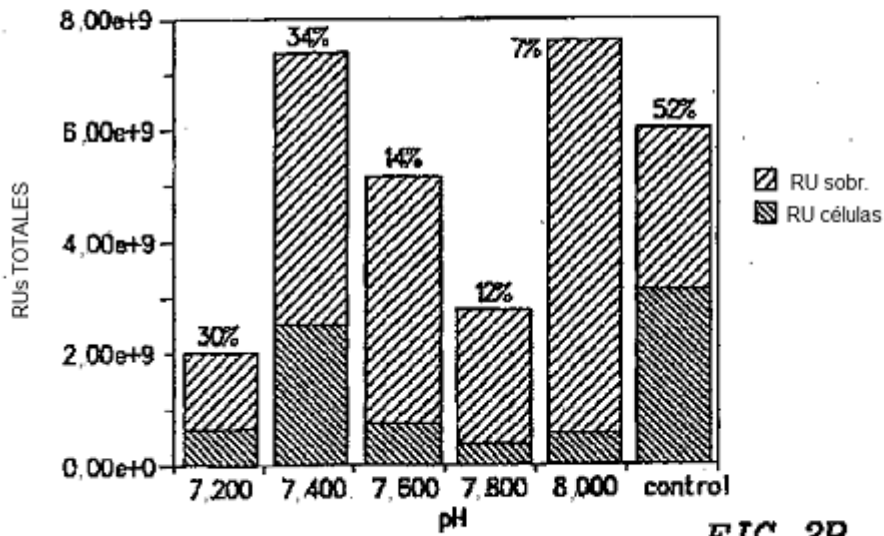


FIG. 3B

REACTOR CFTR JL-14 pH EXPERIMENTO nº 3
DÍA 3 PARTÍCULA A INFECTIVIDAD
SOBRENADANTE Y CÉLULAS

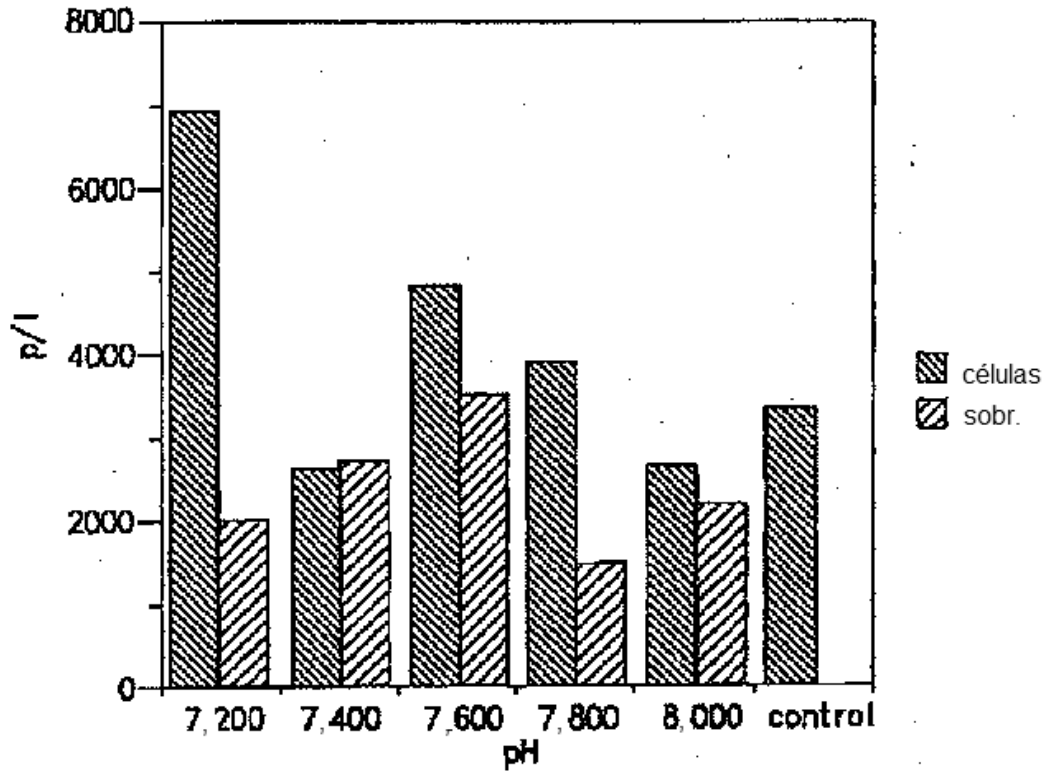


FIG. 4

BIORREACTOR CFTR JL-14 EXPERIMENTO
OSMOLALIDAD DE PRODUCCIÓN INICIAL
DÍA 2 PRODUCCIÓN TOTAL DE DRP

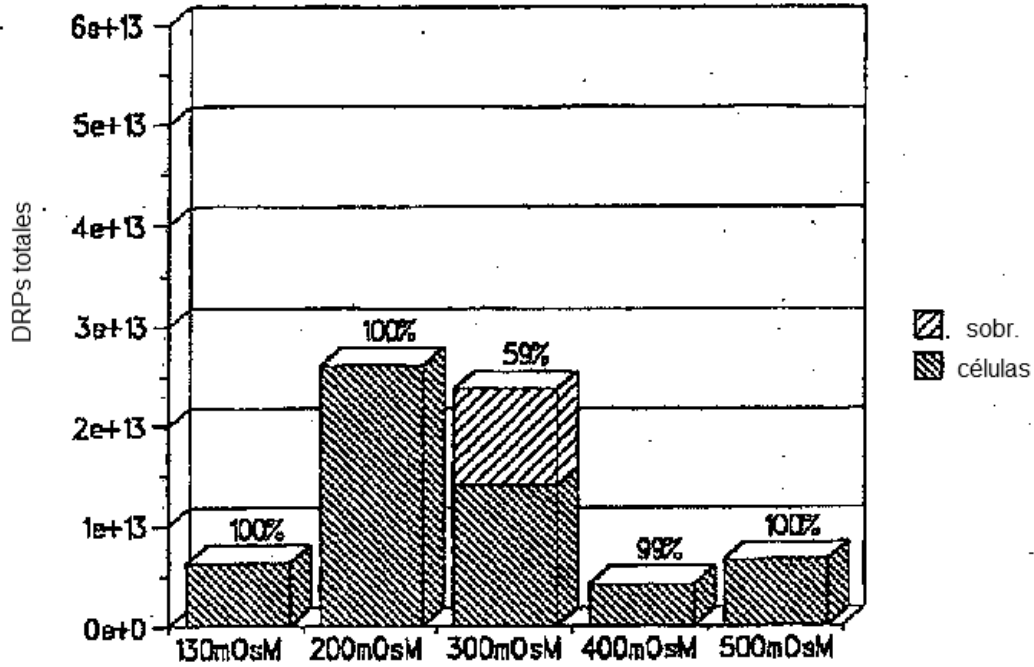


FIG. 5A

BIORREACTOR CFTR JL-14 EXPERIMENTO
OSMOLALIDAD DE PRODUCCIÓN INICIAL
DÍA 3 PRODUCCIÓN TOTAL DE DRP

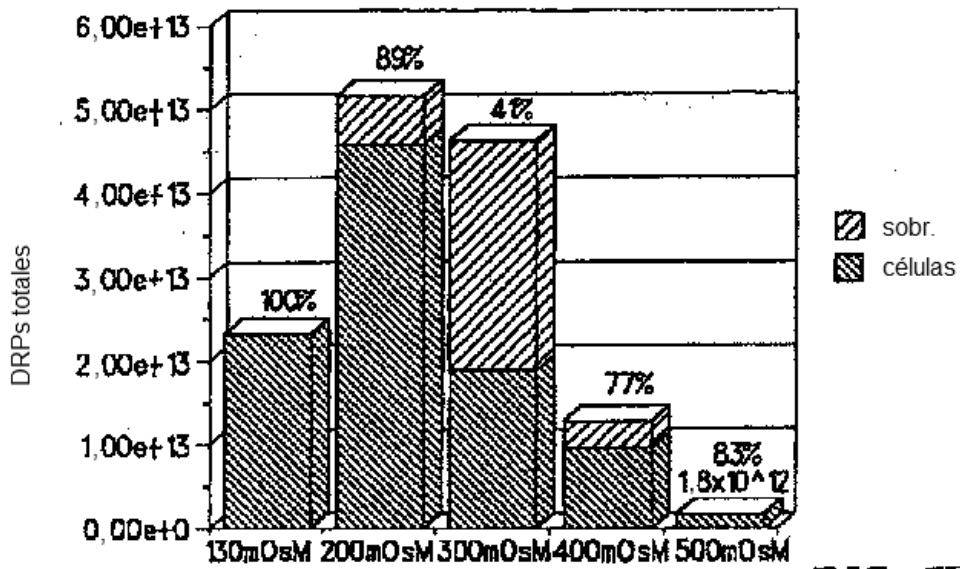


FIG. 5B

BIORREACTOR CFTR JL-1 EXPERIMENTO
 OSMOLALIDAD DE PRODUCCIÓN INICIAL
 DÍA 4 PRODUCCIÓN TOTAL DE DRP

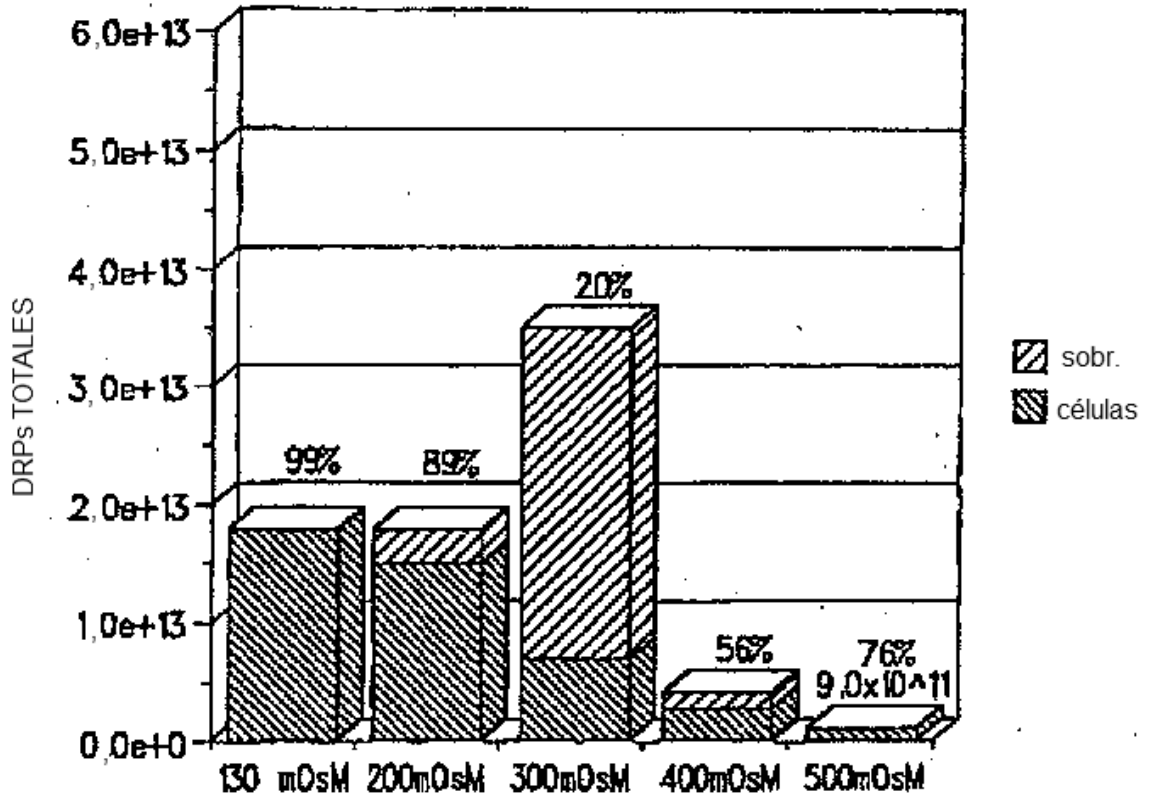


FIG. 5C

BIORREACTOR CFTR JL-14 EXPERIMENTO
OSMOLALIDAD DE PRODUCCIÓN INICIAL
DÍA 2 DE PRODUCCIÓN TOTAL DE RU

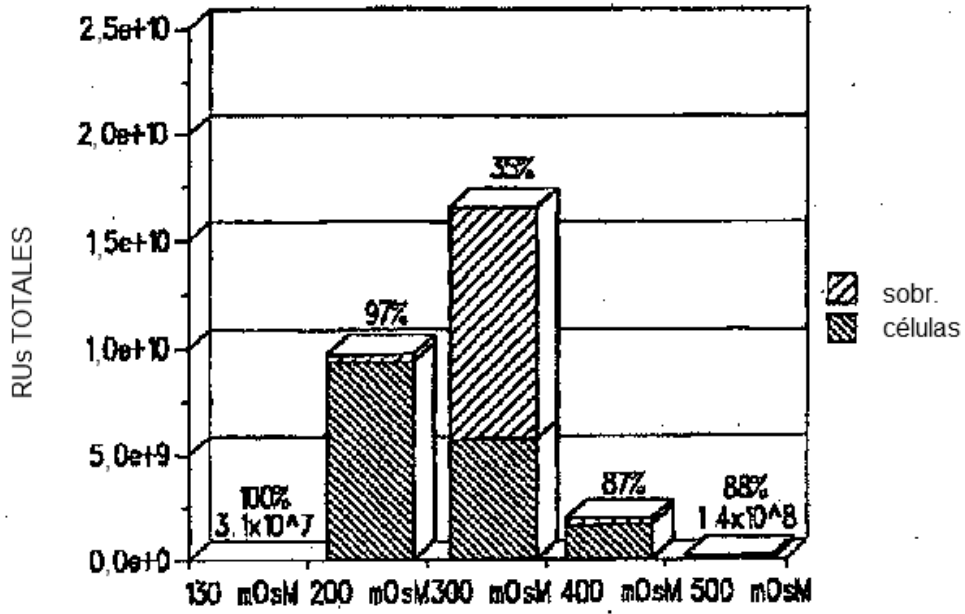


FIG. 6A

BIORREACTOR CFTR JL-14 EXPERIMENTO
OSMOLALIDAD DE PRODUCCIÓN INICIAL
DÍA 3 DE PRODUCCIÓN TOTAL DE RU

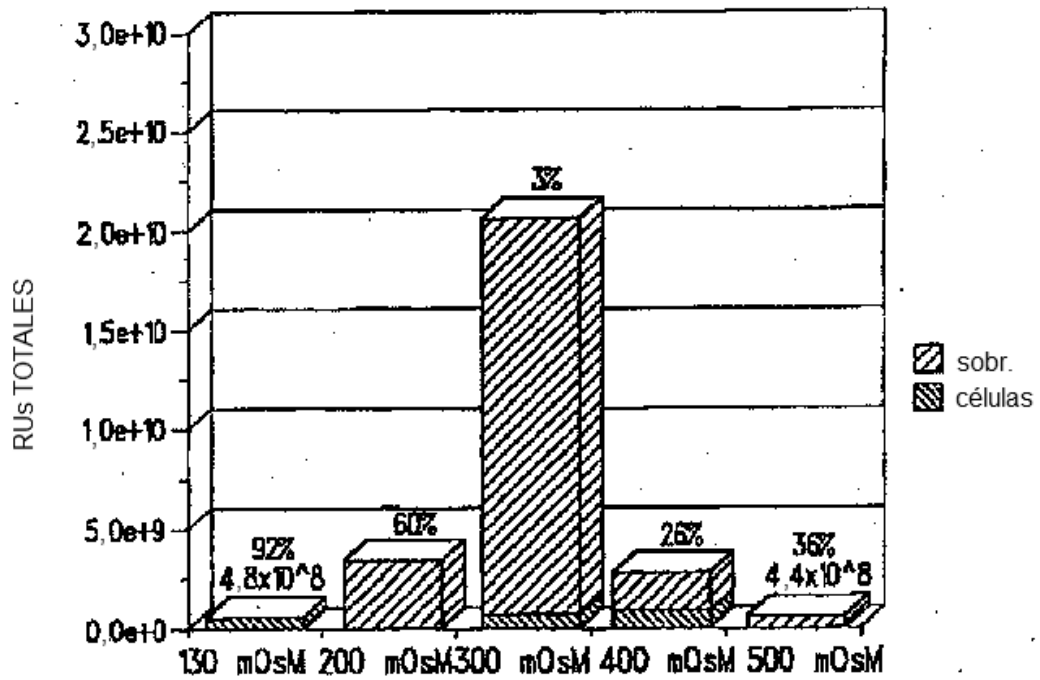


FIG. 6B

BIORREACTOR CFTR JL-14 EXPERIMENTO
OSMOLALIDAD DE PRODUCCIÓN INICIAL
DÍA 4 PRODUCCIÓN TOTAL DE RU

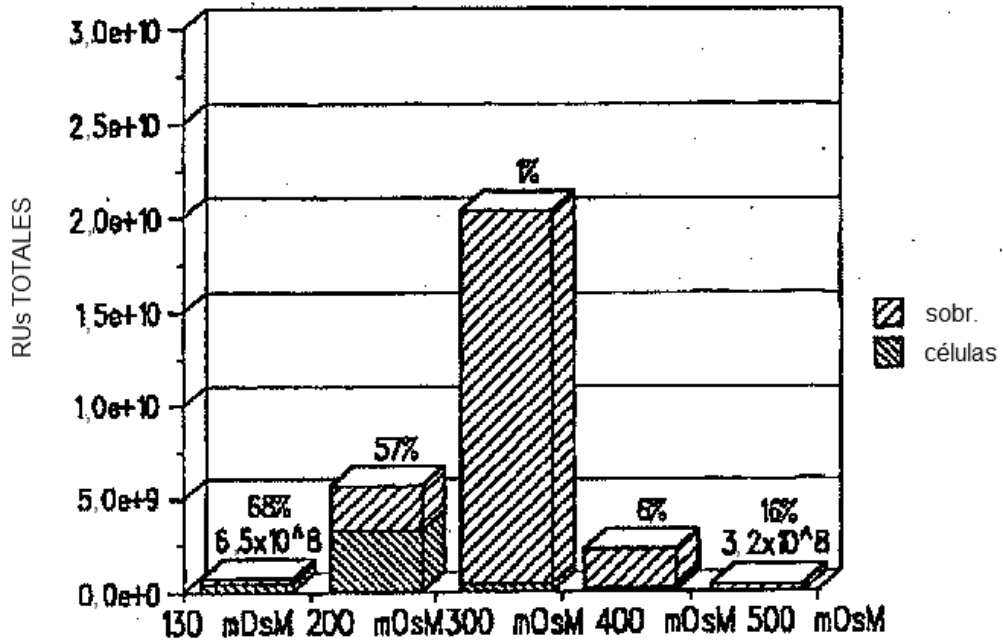


FIG. 6C

BIORREACTOR CFTR JL-14 EXPERIMENTO
OSMOLALIDAD DE PRODUCCIÓN INICIAL
PARTÍCULA A INFECTIVIDAD TOTAL

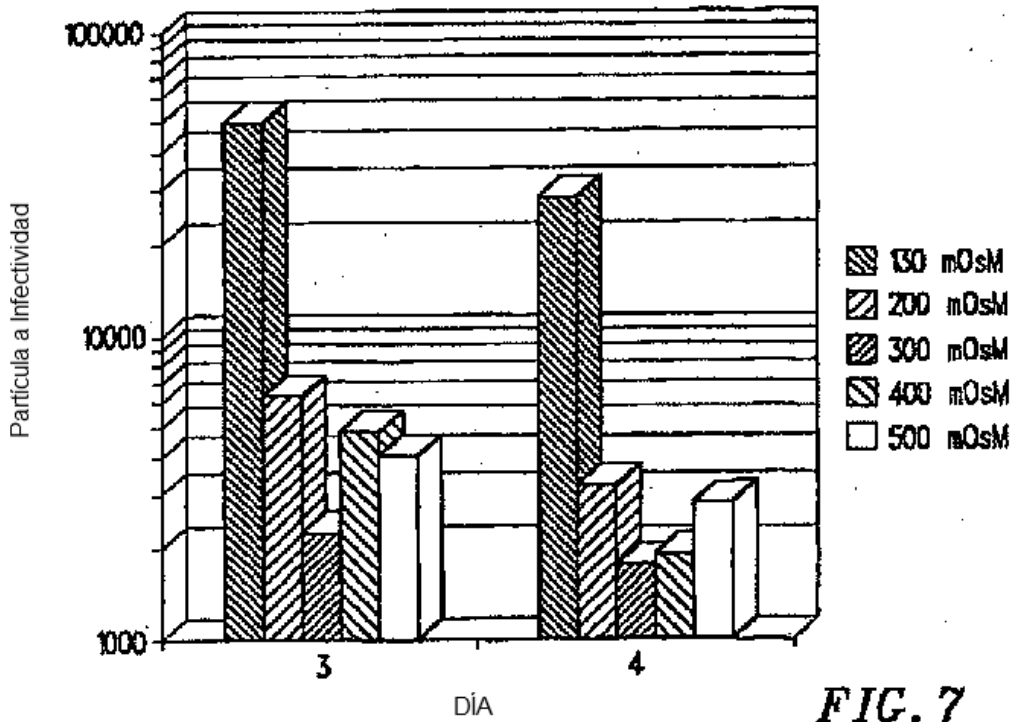
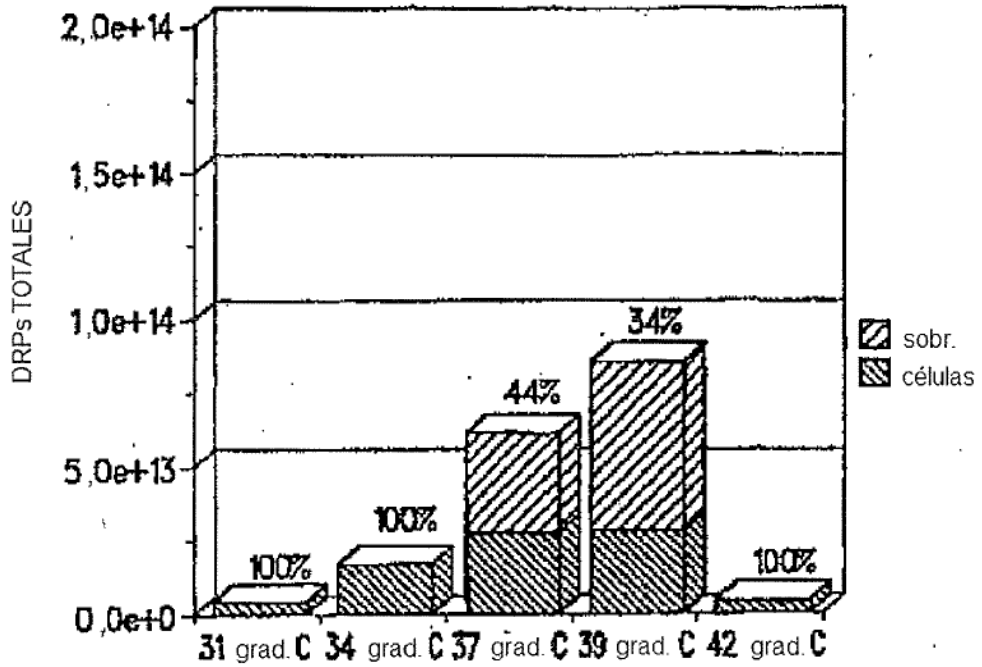


FIG. 7

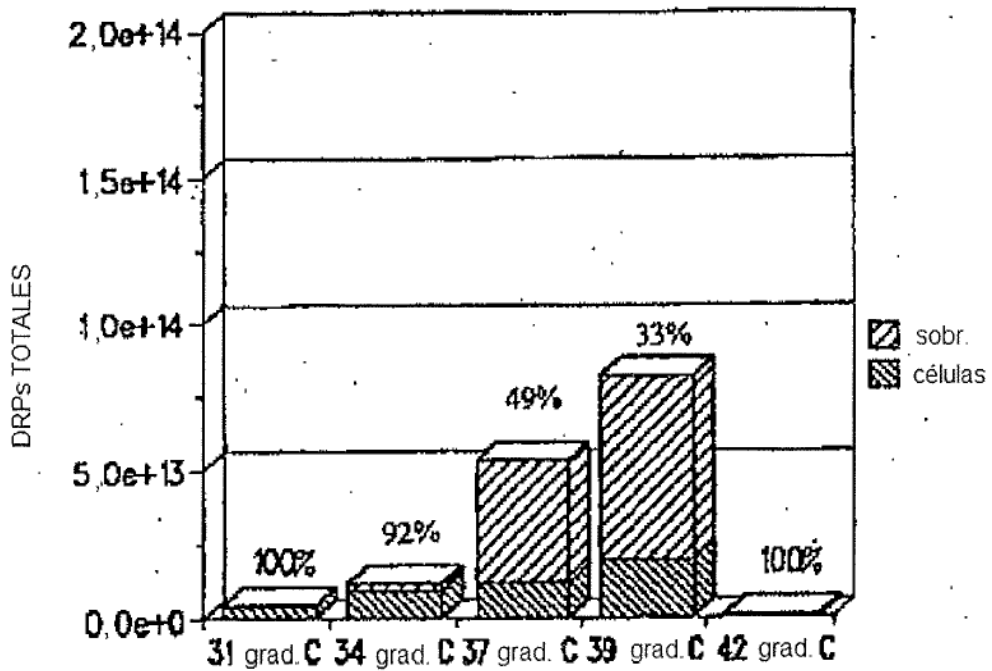
REACTOR CFTR JL-14 EXP. TEMPERATURA
DÍA 2 PARTICULAS RESISTENTES A DNASA TOTALES



Caso

FIG. 8A

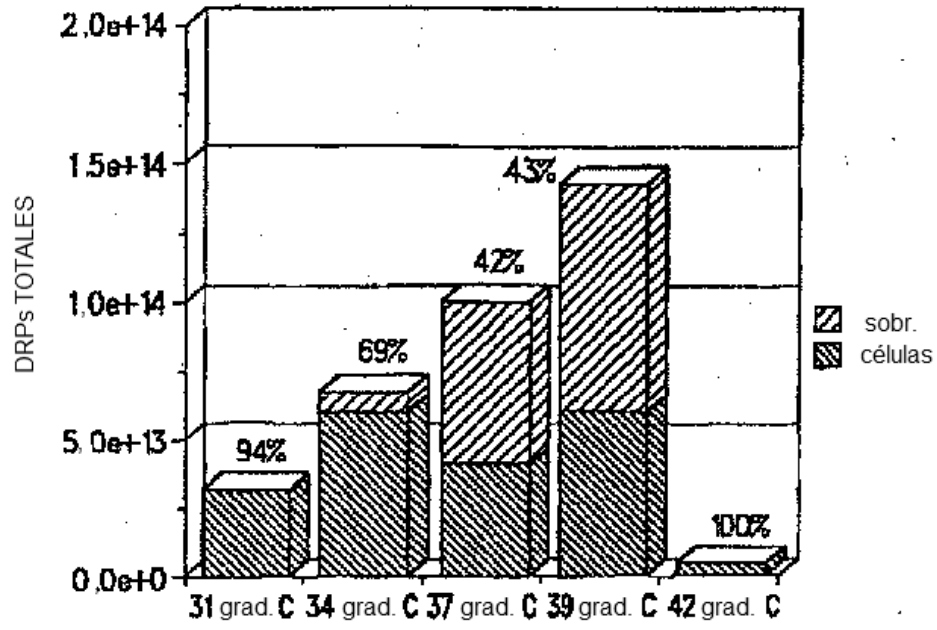
REACTOR CFTR JL-14 EXP. TEMPERATURA
DÍA 3 PARTICULAS RESISTENTES A DNASA TOTALES



Caso

FIG. 8B

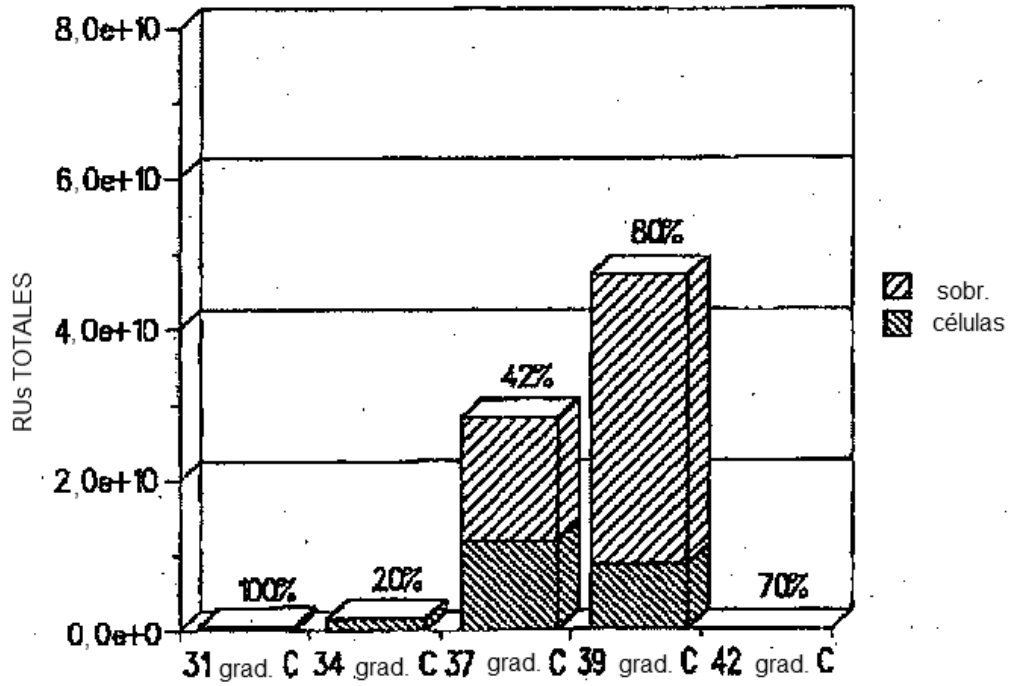
REACTOR CFTR JL-14 EXP. TEMPERATURA
DÍA 4 PARTÍCULAS RESISTENTES A DNASA TOTALES



Caso

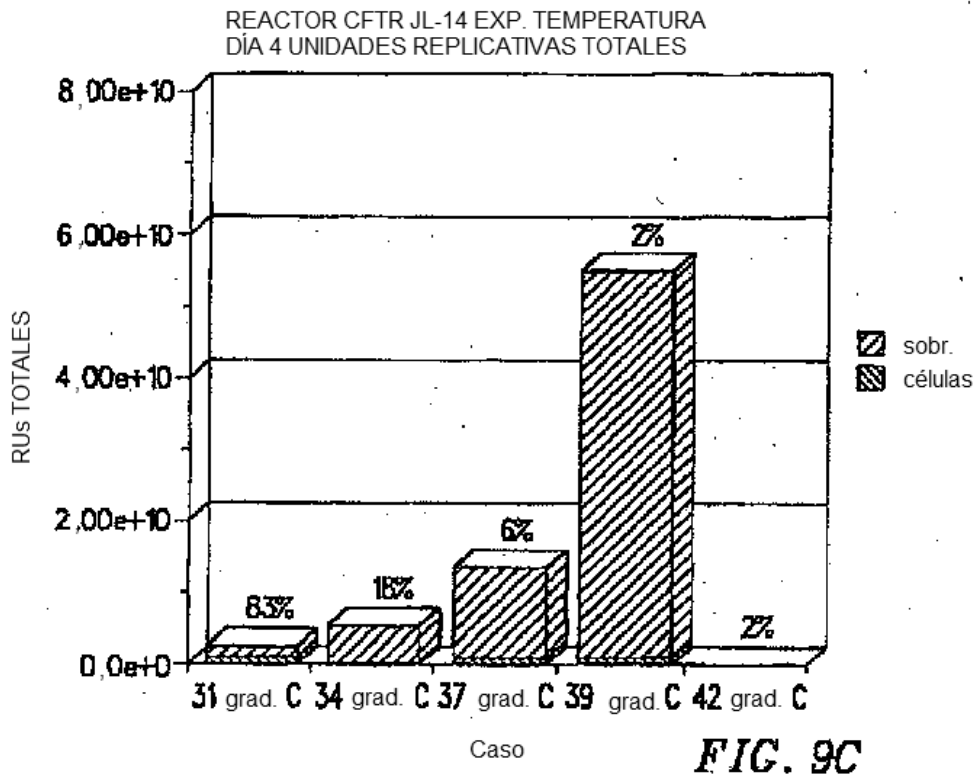
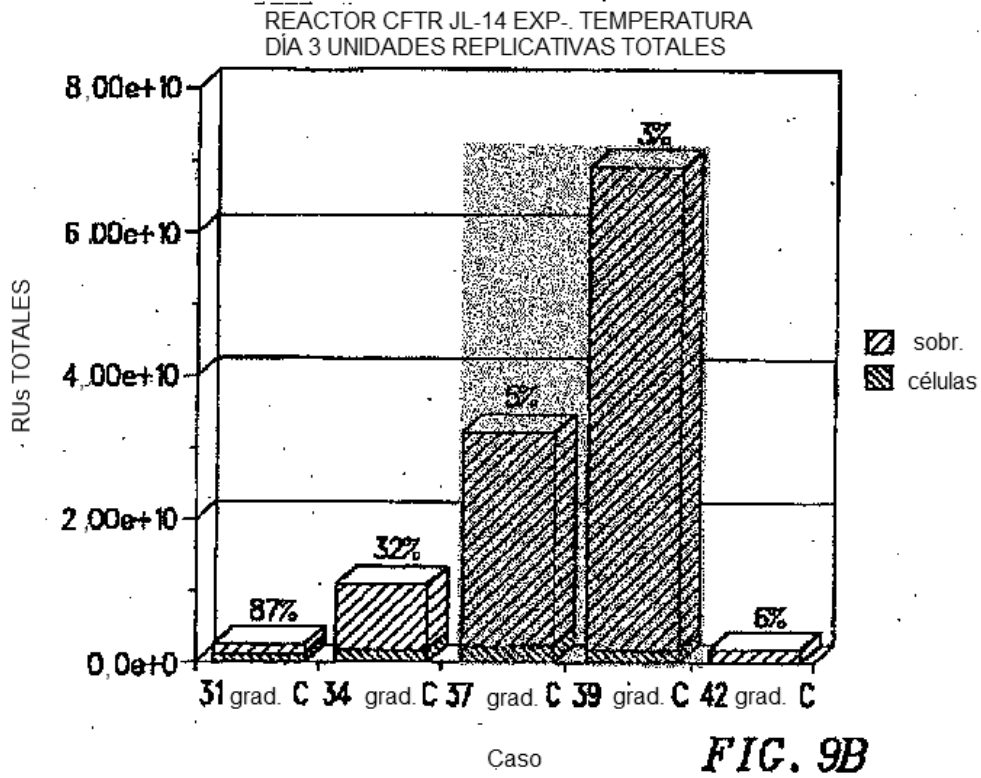
FIG. 8C

REACTOR CFTR JL-A4 EXP. TEMPERATURA
DÍA 2 UNIDADES REPLICATIVAS TOTALES

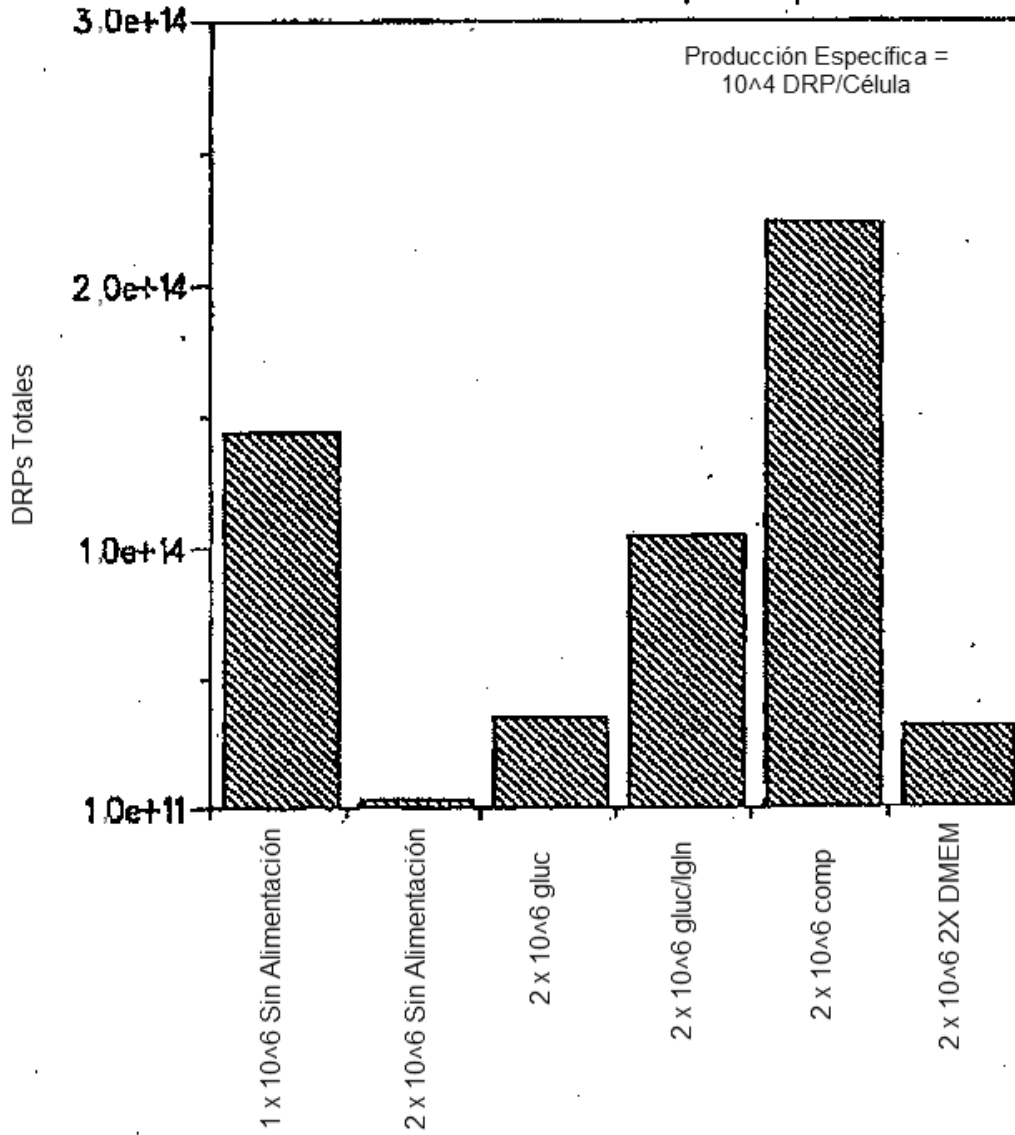


Caso

FIG. 9A



CFTR JL-14 Experimento de Alimentación II
DRPs Totales - Día 3 Sobr.



Caso

FIG. 10

CFTR JL-14 Experimento de Alimentación II
RUs Totales - Día 3 Sobr.

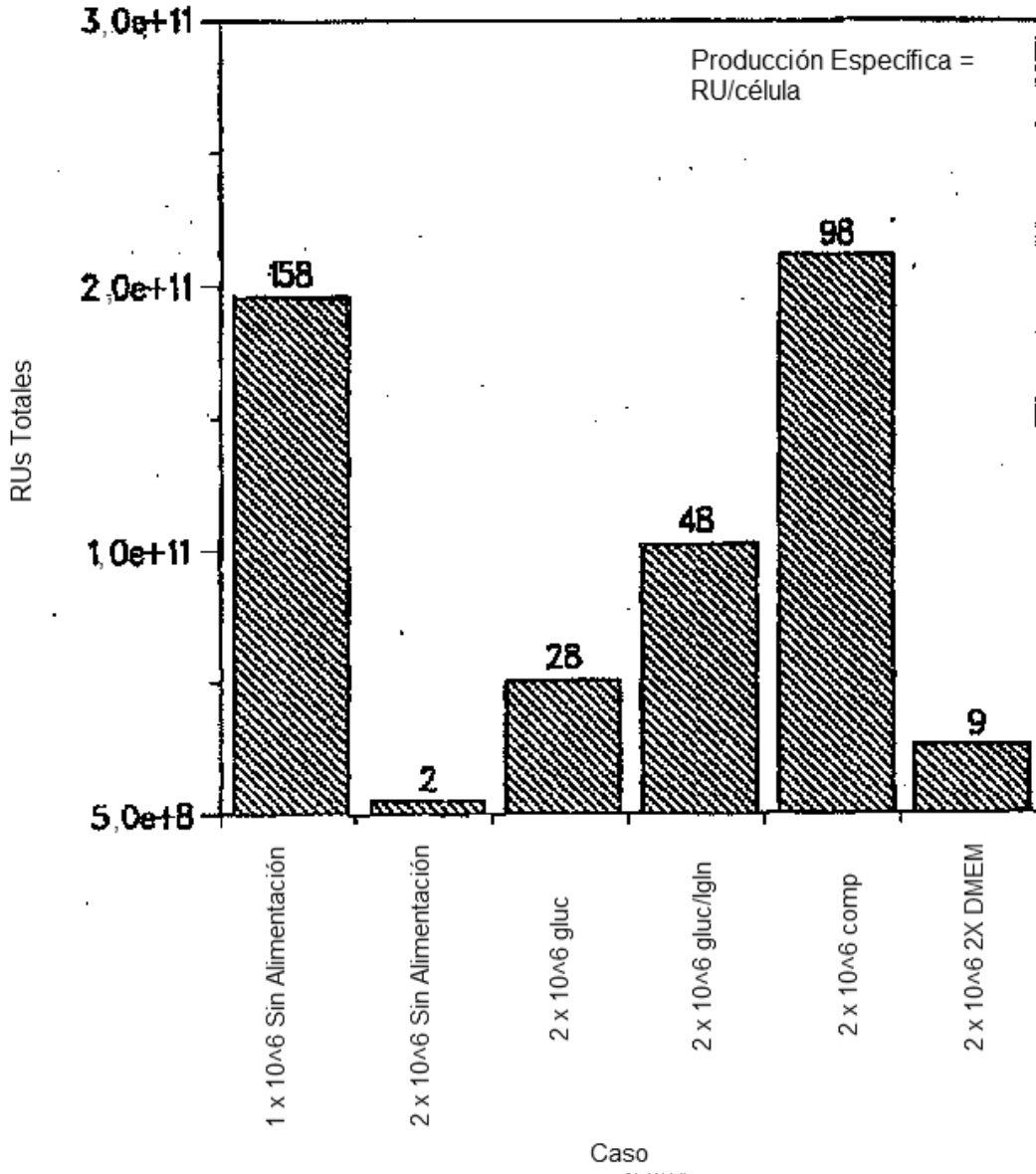


FIG. 11

CFTR JL-14 Experimento de Alimentación II
relación P/I - Día 3 Sobr.

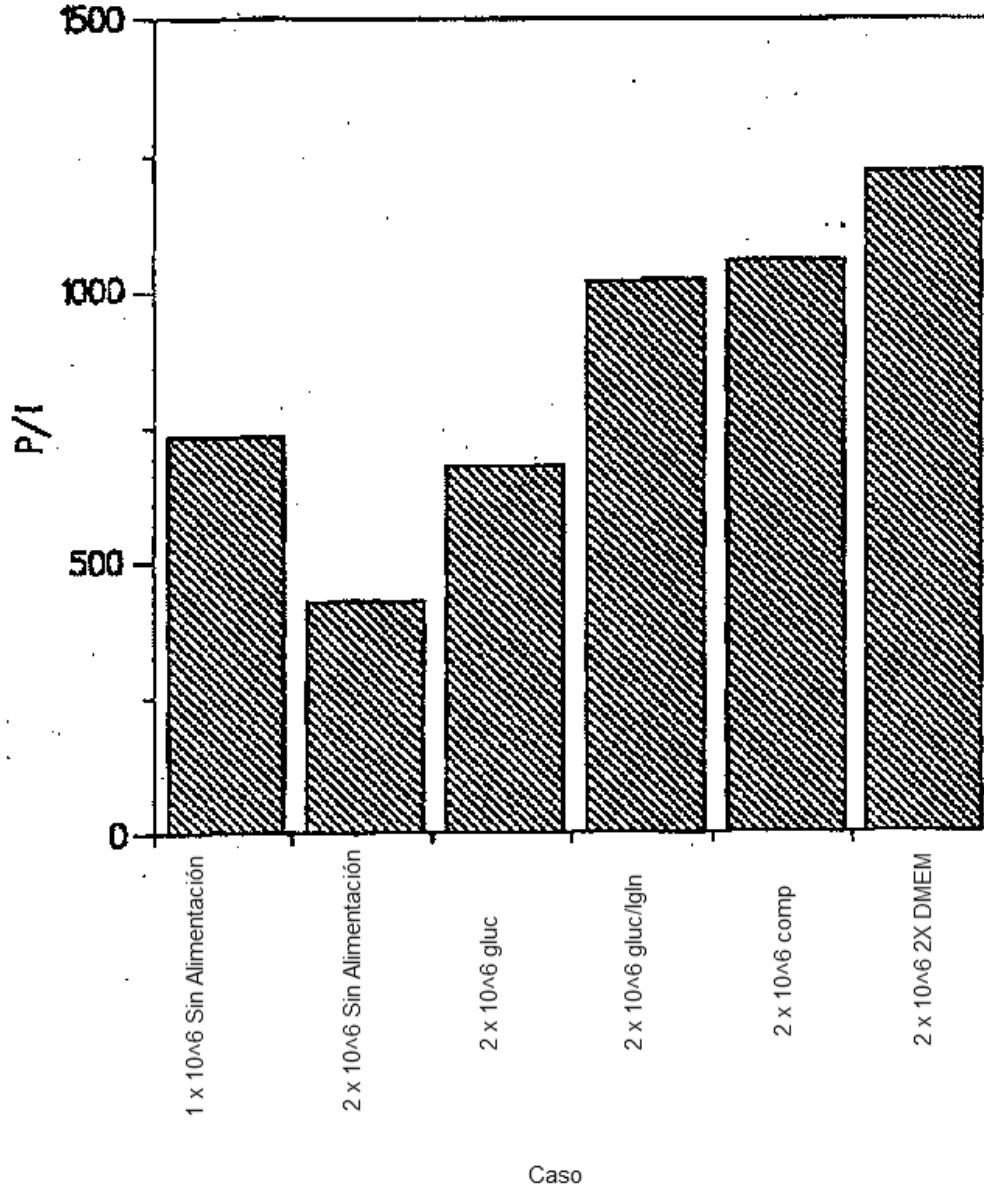


FIG. 12

Hidrolizado de Lactoalbúmina con Sales de Earle (ELH)		Base Cat. N°	11250	11800
Componente		1X Líquido	mg/L	Poivo
				mg/L
SALES INORGÁNICAS:				
CaCl ₂ (anhid.)	200,00			200,00
KCl	400,00			400,00
MgSO ₄ (anhid.)	97,67			97,70
NaCl	6800,00			6800,00
NaHCO ₃	2200,00			--
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140,00			140,00
OTROS COMPONENTES:				
D-glucosa	1000,00			1000,00
Hidrolizado de lactoalbúmina	6500,00			5000,00
Rojo Fenol	10,00			10,00

Disoluciones de Aminoácidos en MEM		Base Cat. N°	11136	21135
Componente		50X Líquido	50X Líquido	50X Líquido
AMINOÁCIDOS:				
L-arginina	6320,00	mg/L	mg/L	mg/L
L-cisteína	1200,00			6320,00
L-glutamina	--			1200,00
L-histidina-HCl-H ₂ O	2100,00			14600,00
L-isoleucina	2625,00			2100,00
L-leucina	2620,00			2625,00
L-lisina HCl	3625,00			2620,00
L-metionina	755,00			3625,00
L-fenilalanina	1650,00			755,00
L-treonina	2380,00			1650,00
L-triptófano	510,00			2380,00
L-tirosina	1800,00			510,00
L-valina	2340,00			1800,00
				2340,00

Referencias:

1. Eagle, H. (1955) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 362.
2. Eagle, H. (1959) Science 130, 432

FIG. 13A

Disoluciones de Vitamon en MEM ²	
Base Cat. N°	11120 50X Líquido
Componente	mg/L
NaCl	8500,00
D-pantotenato de Co	100,00
Cloruro de Colina	100,00
Ácido Fólico	100,00
i-Inositol	200,00
Nicotinamida	100,00
Piridoxal-HCl	100,00
Riboflavina	10,00
Tiamina HCl	100,00

Disolución de Aminoácidos No Esenciales en MEM ²	
Base Cat. N°	11140 100X Líquido
Componente	mg/L
AMINOÁCIDOS:	
L-arginina	890,00
L-asparagina	1500,00
L-aspartico	1330,00
L-glutamina	1470,00
Glicina	750,00
L-prolina	1150,00
L-serina	1050,00

FIG. 13B