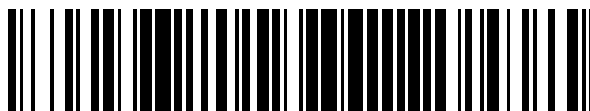


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 997**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/02** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.1998 E 08004542 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1944362**

54 Título: **Métodos para generar preparados de vectores AAV de título elevado sin virus auxiliar**

30 Prioridad:

**05.09.1997 US 925815**  
**16.01.1998 US 71733 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.02.2016**

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 2 557 997 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 de vectores AAV de título elevado sin virus auxiliar

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente al campo de los vectores de virus adenoasociados (AAV) y sus preparados que se pueden utilizar para transferencia de genes. Más específicamente, se refiere a métodos para generar preparados de título elevado de vectores de AAV recombinantes que están sustancialmente exentos de virus auxiliar (p.ej., adenovirus) así como de proteínas celulares.

## Antecedentes

15 Los virus adenoasociados (AAV) tienen características únicas que los hacen atractivos como vectores para terapia génica. Los virus adenoasociados infectan un amplio rango de tipos de células. Sin embargo, no son transformantes y no están implicados en la etiología de ninguna enfermedad humana. La introducción de ADN a células huéspedes receptoras conduce generalmente a la persistencia y expresión a largo plazo del ADN sin interferir el metabolismo normal de la célula.

20 Existen al menos tres características deseables de un preparado de vector AAV recombinante para el uso en transferencia genética, especialmente en terapia génica humana. Primero, es preferible que el vector se genere a títulos suficientemente altos para transducir una proporción efectiva de células del tejido diana. La terapia génica *in vivo* requiere típicamente un elevado número de partículas vectores. Por ejemplo, algunos tratamientos pueden requerir más de  $10^8$  partículas, y el tratamiento de la fibrosis quística por administración directa por vía aérea puede requerir más de  $10^{10}$  partículas. Segundo, es preferible que los preparados vectores estén esencialmente exentos de AAV componente para la replicación (es decir, AAV fenotípicamente de tipo natural que se puede replicar en presencia del virus auxiliar o de funciones del virus auxiliar). Tercero, es preferible que la preparación de vector de rAAV en conjunto esté esencialmente libre de otros virus (tales como los virus auxiliares utilizados para la producción de AAV), así como de virus auxiliar y proteínas celulares, y otros componentes tales como lípidos y carbohidratos, para minimizar o eliminar cualquier riesgo de generar una respuesta inmune en el contexto de la terapia génica. Este último punto es especialmente significativo en el contexto de los AAV, porque el AAV es un virus "dependiente de auxiliar" que requiere coinfección con un virus auxiliar (típicamente adenovirus) u otra provisión de funciones del virus auxiliar para ser replicado y empaquetado efectivamente durante el proceso de la producción de AAV; y, además, se ha observado que el adenovirus genera en el huésped una respuesta inmunitaria en el contexto de las aplicaciones de terapia génica (ver, 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 tratan estas y otras características deseables de las preparaciones de vectores de rAAV, según se describen y se ilustran en detalle más abajo.

40 En otros documentos se dispone de recopilaciones generales de la virología y la genética de los AAV. El lector puede remitirse, entre otros, a Carter, "Handbook of Parvoviruses", Vol. I, pp. 169-228 (1989), y Berns, "Virology", pp.1743-1764, Raven Press, (1990). Lo que sigue es una breve sinopsis para comodidad del lector. El AAV es un virus defectivo para la replicación, lo que significa que depende de un virus auxiliar para completar su ciclo de replicación y empaquetamiento en una célula huésped. El genoma del AAV comprende generalmente los genes de empaquetamiento *rep* y *cap*, siendo otras funciones necesarias aportadas *en trans* por el virus auxiliar y la célula huésped.

50 Las partículas de AAV están formadas por una cápside proteica que tiene tres proteínas de cápside, VP1, VP2 y VP3, que encierran un genoma de ADN lineal de hebra simple de ~4,6 kb. Las partículas individuales empaquetan solo una hebra de molécula de ADN, pero puede ser la hebra plus o la minus. Las partículas que contienen cualquiera de las hebras son infecciosas, y la replicación ocurre por conversión de la hebra simple infecciosa parental a la forma dúplex, y subsecuente amplificación, de la que se desplazan hebras simples de progenie y se empaquetan en cápsides. Las copias de hebra doble o simple de genomas de AAV (a veces denominadas "ADN proviral" o "provirus") pueden ser insertadas en plásmidos o fagémidos bacterianos, y transfectadas a células infectadas por adenovirus.

A modo de ilustración, el genoma lineal del serotipo AAV2 está terminado en cada extremo por una secuencia de repetición terminal invertida (ITR). Entre las ITRs hay tres promotores de transcripción p5, p19 y p40 que se usan para expresar los genes *rep* y *cap* (Laughlin et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5567-5571). Las secuencias ITR se requieren *in cis* y son suficientes para aportar un origen funcional de replicación, integración en el genoma celular, y excisión y rescate eficiente de los cromosomas o plásmidos recombinantes de la célula huésped. Los productos de los genes *rep* y *cap* aportan funciones para la replicación y la encapsidación de genoma viral, respectivamente, y es suficiente que estén presentes *in trans*.

65 El gen *rep* se expresa desde dos promotores, p5 y p19, y produce cuatro proteínas designadas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Solo Rep78 y Rep68 se requieren para la replicación del ADN de doble hebra de AAV, pero Rep52

y Rep40 parecen ser necesarias para la acumulación del ADN de hebra simple de progenie (Chejanovsky et al., Virology 173:120, 1989). Rep68 y Rep78 se enlazan específicamente a la conformación de horquilla de la ITR del AAV y poseen varias actividades enzimáticas requeridas para resolver la replicación en los extremos del AAV. Rep78 y Rep68 exhiben también actividades reguladoras pleiotrópicas que incluyen regulación positiva y negativa de genes de AAV y expresión desde algunos promotores heterólogos, así como efectos inhibidores sobre el crecimiento celular. El gen *cap* codifica las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas comparten una secuencia superpuesta común, pero VP1 y VP2 contienen secuencias terminales amino adicionales transcritas desde el promotor p40 mediante el uso de codones de iniciación alternativos. Las tres proteínas son necesarias para la producción eficaz de la cápside.

Se han introducido genomas de AAV en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como cola de GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), adición de conectores sintéticos que contienen sitios de corte de endonucleasa de restricción (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) o por unión directa de extremos romos (Senepathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). La transfección de tales plásmidos recombinantes de AAV en células de mamífero con un virus auxiliar apropiado tiene como resultado el rescate y la excisión del genoma del AAV exento de cualquier secuencia de plásmido, la replicación del genoma rescatado y la generación de una progenie de partículas de AAV infecciosas.

Se pueden reconstruir vectores de AAV recombinante que comprenden un polinucleótido heterólogo de interés terapéutico mediante la sustitución de porciones de la secuencia codificante de AAV en plásmidos bacterianos por el polinucleótido heterólogo. Los principios generales de la construcción de vectores de rAAV también están disponibles en otros documentos. Ver, p.ej., Carter, 1992, Current Opinions en Biotechnology, 3:533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbiol. and Immunol., 158:97-129). Generalmente las ITRs de AAV se retienen, ya que el empaquetamiento del vector requiere que estén presentes en *cis*. Sin embargo, otros elementos del genoma de AAV, en particular, uno o más de los genes de empaquetamiento, pueden omitirse. El plásmido vector puede empaquetarse en una partícula AAV aportando los genes de empaquetamiento omitidos en *trans* a través de una fuente alternativa.

En una estrategia, la secuencia flanqueada por ITRs de AAV (la secuencia del vector rAAV), y los genes de empaquetamiento de AAV que se deben aportar en *trans*, se introducen en la célula huésped en plásmidos bacterianos separados. Se describen ejemplos de esta estrategia en 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); and Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349(1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828) han descrito un plásmido de empaquetamiento llamado pAAV/Ad, que consiste en las regiones codificante de Rep y Cap entre ITRs procedentes de adenovirus. Se han transducido células epiteliales humanas de la vía aérea de un paciente con fibrosis quística con un vector de AAV preparado utilizando el plásmido de empaquetamiento pAAV/Ad y un plásmido que comprende el gen marcador selectivo *neo* expresado a través del promotor p5 de AAV (Flotte et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349, 1992).

Una segunda estrategia es aportar o bien la secuencia vector, o los genes de empaquetamiento de AAV, en forma de un plásmido episómico en una célula de mamífero utilizada para replicación del AAV. Por ejemplo, la patente de los EE.UU. 5,173,414 describe una línea celular en la que la secuencia vector está presente como un plásmido episómico con alto número de copias. Las líneas celulares se pueden transducir con las funciones de AAV trans-complementarias *rep* y *cap* para generar preparaciones de vector AAV. Esta estrategia no es ideal, porque el número de copias por célula no se puede controlar rigurosamente y el ADN episómico tiene mucha más tendencia a sufrir reordenación, lo que lleva a la producción de productos secundarios de vector.

Una tercera estrategia es aportar o bien la secuencia vector, o los genes de empaquetamiento de AAV, o ambos, integrados de forma estable en el genoma de la célula de mamífero utilizada para la replicación.

El documento WO 97/09441 publica vectores AAV para terapia génica. Tamayose et al., Human Gene Therapy, 7:507:513 (1996) publican una estrategia para preparación a gran escala de vectores AAV recombinantes de título elevado mediante la utilización de líneas celulares de empaquetamiento y cromatografía de columna de celulosa sulfonatada. El documento WO 97/06243 publica la purificación cromatográfica de adenovirus y AAV.

Una técnica ejemplar se resume en la solicitud de patente internacional WO 95/13365 (Targeted Genetics Corporation y Johns Hopkins University) y en la correspondiente Patente de los EE.UU. 5,658,776 (de Flotte et al.). Este ejemplo utiliza una célula de mamífero con al menos una copia intacta de un vector rAAV establemente integrado, comprendiendo el vector una ITR de AAV y un promotor de la transcripción ligado operativamente a un polinucleótido diana, pero en la que la expresión de *rep* es limitante. En una realización preferida, se introduce en la célula un plásmido de empaquetamiento de AAV que comprende el gen *rep* ligado operativamente a un AAV heterólogo, y luego la célula es incubada en condiciones que permiten la replicación y el empaquetamiento de la secuencia vector de AAV en partículas.

Una segunda técnica ejemplar se resume en la solicitud de patente WO 95/13392 (Trempe y col.) . Este ejemplo utiliza una línea celular estable de mamífero con un gen *rep* de AAV ligado operativamente a un promotor heterólogo

para poder expresar proteína Rep funcional. En diversas realizaciones preferidas, el gen *cap* de AAV se puede proporcionar establemente también o puede introducirse transitoriamente (p.ej., en un plásmido). También se puede introducir un vector de AAV recombinante estable o transitoriamente.

5 Otra técnica ejemplar se resume en la solicitud de patente WO 96/17947 (de Targeted Genetics Corporation, J. Allen). Este ejemplo utiliza célula de mamífero que comprende un gen *cap* de AAV establemente integrado, y un gen *rep* de AAV establemente integrado ligados operativamente a un promotor heterólogo e inducibles mediante un virus auxiliar. En varias realizaciones preferidas, un plásmido que comprende la secuencia vector es introducida también  
10 en las células (ya sea de forma estable o transitoria). El rescate de partículas vector AAV se inicia entonces mediante la introducción del virus auxiliar.

15 Estos ejemplos diversos abordan el problema de aportar AAV con un título suficientemente alto, minimizando la recombinación entre vector y componentes de empaquetamiento, y reduciendo o evitando las dificultades potenciales asociadas con la expresión del gen *rep* AAV en la línea celular de mamífero (ya que las proteínas Rep pueden no solo limitar su propia expresión, sino que pueden afectar también el metabolismo celular). Sin embargo, el empaquetamiento de un vector AAV en partículas virales sigue dependiendo de la presencia de un virus auxiliar apropiado para el AAV o de la provisión de funciones de virus auxiliar. Ejemplos de virus auxiliares capaces de apoyar la replicación del AAV son los adenovirus, pero incluyen otros virus como virus del herpes y poxviridae. La  
20 presencia de cantidades significativas de virus auxiliar infeccioso en un preparado de vectores AAV es problemática porque la preparación está destinada para ser administrada a seres humanos. Incluso la presencia de componentes no replicantes de virus auxiliares puede causar en el sujeto tratado una reacción inmunológica inaceptable.

25 Los problemas potenciales provocados por el antígeno del virus auxiliar han sido ilustrados en varios estudios recientes. Bymes et al. (Neuroscience 66:1015,1995) inyectaron un adenovirus humano tipo 5 con delección en la región E1, no replicante, en cerebros de ratas endocrizadas. Se observó una respuesta inflamatoria que se atribuyó a las partículas administradas más que a la expresión de proteínas virales nuevas debidas a la infección viral de las células. La presencia del virus se asoció con un aumento en la expresión de CMH de clase I y una fuerte infiltración de macrófagos y células T. McCoy et al. (Human Gene Therapy 6:1553,1995) instilaron los pulmones de ratones con  
30 adenovirus intacto, adenovirus con genomas incompletos, o adenovirus inactivados con luz ultravioleta. Todos produjeron inflamación pulmonar, y el número de células inflamatorias en el tejido pulmonar fue similar cuantitativamente para las tres formas del virus. Experimentos comparativos que utilizaron constructos de adenovirus en ratones normales e inmunodeficientes realizados por Barr et al. (Gene Therapy 2:151, 1995) indican que la respuesta inmune anti-adenovirus está mediada primariamente por linfocitos T y da lugar a una respuesta de  
35 memoria que afecta a las dosis subsecuentes.

En consecuencia, en el desarrollo de vectores AAV recombinantes tales como los que se usan en terapia génica, son necesarias estrategias que minimicen la cantidad de virus auxiliar, así como proteínas de virus auxiliar y proteínas celulares, presentes en el preparado final, alcanzando al mismo tiempo un título más elevado de AAV de  
40 forma que los métodos se puedan emplear efectivamente en una escala que sea adecuada para la aplicación práctica de técnicas de terapia génica.

Puesto que los títulos elevados de los preparados de vector rAAV son particularmente útiles, pero la producción de títulos mayores de rAAV, particularmente en procedimientos a gran escala, puede llevar a la generación de cantidades significativas de virus auxiliar (p.ej., adenovirus o "Ad"), proteínas de virus auxiliar (p.ej., proteínas Ad) y/o  
45 proteínas celulares contaminantes, se ha hecho especialmente importante diseñar métodos escalables para la producción de rAAV que se puedan utilizar para la generación de preparaciones de título elevado que estén sustancialmente exentas de virus y/o proteínas virales o celulares contaminantes. La presente publicación proporciona métodos para conseguir estos objetivos contrapuestos y demuestra que tales técnicas se pueden  
50 emplear para la producción a gran escala de preparados de vector AAV recombinante.

#### Resumen de la invención

55 Se describen aquí métodos y materiales para la generación de preparados de título elevado de virus adenoasociados (AAV) que están sustancialmente exentos de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar y proteínas celulares y otros componentes.

La invención proporciona un método para generar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV), que comprende las etapas de:

- 60 a) incubar una célula productora de AAV bajo condiciones permisivas para la replicación de AAV, donde la célula productora de AAV comprende:
- (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde dicho gen de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o de encapsidación de AAV;
  - (ii) un pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido heterólogo no-AAV  
65 flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR); y
  - (iii) un virus auxiliar para AAV;

- b) lisar la celda productora tras la incubación de la etapa a) para producir un lisado de células productoras de AAV;
- c) cromatografiar el lisado de células productoras de AAV de la etapa b) mediante varias cromatografías de intercambio de iones que comprenden al menos una cromatografía con carga positiva de intercambio de aniones y al menos una cromatografía con carga negativa de intercambio de cationes, o cromatografiar el lisado de células productoras de AAV de la etapa b) mediante cromatografía de intercambio de aniones seguida de filtración de flujo tangencial para generar una población purificada de partículas de vector rAAV.

La invención también proporciona un método para generar una población de partículas rAAV según se describe arriba, donde dicho virus auxiliar es un adenovirus o un virus auxiliar termosensible, y dicha etapa de incubación de la célula productora se efectúa a una temperatura permisiva para la replicación del AAV, pero no permisiva para la replicación del virus auxiliar termosensible.

En este documento también se describe lo siguiente:

Un método para generar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV), que comprende las etapas de: a) proporcionar una célula productora de AAV que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde cada uno de dichos genes empaquetadores de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido no-AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y (iii) un virus auxiliar para AAV; b) incubar la célula productora proporcionada en la etapa a) bajo condiciones que son permisivas para la replicación de AAV; c) lisar la célula productora tras la incubación de la etapa b) para producir un lisado de células productoras de AAV; y d) cromatografiar el lisado de célula productora de AAV de la etapa c) en varias resinas intercambiadoras de iones que comprenden al menos una resina de intercambio de aniones cargada positivamente y al menos una resina de intercambio de cationes cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV, o cromatografiar el lisado de células productoras de AAV de la etapa c) en una resina de intercambio de aniones seguida de filtración de flujo tangencial (TFF).

Un método para generar una población de partículas de rAAV, en el que la incubación de la célula productora se efectúa en un recipiente seleccionado de un grupo consistente en matraz de cultivo tisular, botella roller, matraz spinner, tanque de reacción, fermentador, y biorreactor, utilizando opcionalmente un microportador, y preferiblemente utilizando una línea celular de mamífero adaptada a suspensión.

Un método para generar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV), que comprende las etapas de: a) proporcionar una célula productora de AAV que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde cada uno de dichos genes empaquetadores de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido no-AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y (iii) un virus auxiliar para AAV o una secuencia de polinucleótido de dicho virus auxiliador que codifica al menos una función del virus auxiliador; b) someter la célula productora proporcionada en la etapa a) a un estrés sub-letal; y c) incubar la célula productora estresada del paso b) bajo condiciones que son permisivas para la replicación de AAV. Formas posibles de estrés sub-letal se pueden seleccionar sin limitarse a las del grupo que consiste en estrés nutricional, estrés osmótico, estrés de pH, estrés de temperatura, estrés aeróbico, estrés mecánico, estrés de radiación y estrés tóxico. Un ejemplo no limitante por el que se impone estrés nutricional es cultivando las células productoras en un medio que es deficiente en uno o más aminoácidos. Más abajo se aportan otros ejemplos.

Un método para generar una población de partículas de rAAV, en el que dicha población purificada de partículas vector de rAAV está sustancialmente libre de AAV competente para la replicación y de virus auxiliar y de proteínas celulares.

Un método para generar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV), que comprende las etapas de: a) proporcionar una célula productora de AAV que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde cada uno de dichos genes empaquetadores de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido no-AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y (iii) un virus auxiliar para AAV; b) incubar la célula productora proporcionada en la etapa a) bajo condiciones permisivas para la replicación del AAV y que comprenden inducir un estrés sub-letal en la célula productora de AAV; c) lisar la célula productora tras la incubación de la etapa b) para producir un lisado de célula productora de AAV; y d) purificar el lisado de célula productora de AAV para generar una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV). Métodos apropiados de purificación incluyen los descritos en otras partes de esta publicación. Un procedimiento ejemplar de purificación comprende cromatografiar el lisado de células productoras de AAV de la etapa c) en al menos una resina cromatográfica seleccionada del grupo que consiste en una resina de intercambio de aniones cargada positivamente y una resina de intercambio de cationes cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de vector rAAV (métodos preferidos incluyen intercambio aniónico seguido de intercambio catiónico o filtración de flujo tangencial (TFF)). Procedimientos cromatográficos ilustrativos, que incluyen la cromatografía de intercambio de iones, y la purificación cromatográfica sobre sulfato de heparina se

proporcionan se proporcionan más abajo a modo de ejemplo.

Una célula huésped para producir partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) con alta eficiencia, que comprende: a) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, donde cada uno de dichos genes empaquetadores de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; b) un polinucleótido heterólogo introducido en dicha célula huésped utilizando un pro-vector rAAV, en el que el pro-vector de rAAV comprende el polinucleótido heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV y es deficiente en dicho(s) gen(es) de empaquetamiento de AAV; c) un virus auxiliar tal como un virus auxiliar termosensible (tsHV) para AAV, en el que dicho tsHV es termosensible para la auto replicación.

Una población de partículas de rAAV, producida de acuerdo con el método de producción de esta invención. Preferiblemente, la población de partículas contiene no más de aproximadamente una partícula infecciosa de adenovirus por cada mil partículas infecciosas de rAAV, preferiblemente menos de una por cada  $10^6$  rAAV, aún más preferiblemente menos de aproximadamente una por cada  $10^9$ .

También se describen en el presente documento técnicas de análisis de alto rendimiento que se pueden utilizar, por ejemplo, en la valoración de preparados de virus, así como en el cribado de agentes que afectan a la replicación viral.

Las realizaciones de la invención se resumen en la siguiente descripción.

Descripción breve de las figuras

La Figura 1 es una reproducción a medio tono de un análisis Southern para la producción de vector rAAV, utilizando una sonda para un modelo de gen terapéutico de la CF contenido en el vector. La banda prominente a 1.4 kb indica la presencia de rAAV en la preparación. La función de auxilio fue proporcionada por adenovirus subtipo 5 (Ad5) o por la cepa de adenovirus termosensible ts149.

La Figura 2 es una reproducción a medio tono de un análisis slot blot de la producción de vector rAAV, para cuantificar el nivel de rAAV presente en cada preparación. Cuando la función auxiliar la proporciona el ts149, la cantidad de rAAV producida en condiciones normales de cultivo es varias unidades logarítmicas inferior a la producida en presencia de Ad5.

La Figura 3 es una reproducción a medio tono de un análisis de hibridación Southern de rAAV, que indica que el aumento de nivel de ts149 no mejora el nivel de producción de rAAV.

La Figura 4 es una gráfica de barras que indica un *aumento* drástico de la cantidad de rAAV producido en presencia de ts149 (barras oscuras) si los periodos de cultivo se extienden más allá de los 5 días. Esto contrasta fuertemente con el *descenso* sustancial en rAAV que ocurre más allá del día 5 cuando se utilizan adenovirus no termosensibles para proporcionar la función auxiliar (barras claras).

La Figura 5 es una gráfica lineal que muestra la densidad de células viables (VCD) de células HeLa S3 cultivadas en cultivo de suspensión a 37 °C (círculos) o 32 °C (cuadrados).

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

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

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

La figura 9 es una gráfica de combinación que muestra la purificación de adenovirus en matriz PI de intercambio de aniones, eluida con un gradiente de 800-1300 meq de NaCl a pH 8,0. Barras: actividad viral medida en un análisis de infectividad; línea continua:  $A_{280}$  (una medida de la proteína total); línea de puntos: conductividad del tampón (mS).

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

La figura 11 son dos gráficas de barras, que muestran el efecto del nivel de suero fetal bovino (FBS) en el medio de cultivo sobre la producción de rAAV. La deficiencia de suero en el medio de cultivo es uno de una serie de factores de estrés a los que se pueden someter las células productoras para mejorar la producción de partículas virales.

La Figura 12 es una reproducción a medio tono de un análisis de gel de SDS-poliacrilamida para proteínas AAV durante los pasos de la purificación. El preparado de AAV se sometió a filtración de flujo tangencial tras cromatografía en una columna de intercambio de aniones (POROS 50 PI). El gel teñido de plata muestra las proteínas de cápside de AAV altamente purificadas, VP1, VP2 y VP3 en el material bruto final.

La figura 13 es un cromatograma que muestra la concentración de AAV en una columna de sulfato de heparina. El pico estrecho de absorbancia a 280 nm (eje de la izquierda) a un tiempo de elución de unos 18 minutos representa la fracción de AAV (tras intercambio de aniones y filtración de flujo tangencial) eluida del sulfato de heparina con un gradiente lineal de 0 a 1M NaCl (la conductividad en mS se muestra en el eje derecho).

#### Descripción detallada

En el presente documento se describen métodos y materiales para generar preparados de virus adenoasociados (AAV) de alto título que están sustancialmente exentos de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliares y proteínas celulares y otros componentes.

Diversos métodos para la generación y el procesado de partículas de AAV en células de mamífero se describen más abajo en detalle, y se proporcionan ilustraciones del uso de tales técnicas en los Ejemplos que siguen.

A modo de introducción, es típico emplear una célula huésped o “productora” para la replicación y el empaquetado de vector de rAAV. Tal célula productora (habitualmente una célula huésped de mamífero) comprende generalmente o está modificada para comprender varios tipos diferentes de componentes para la producción de rAAV. El primer componente es el genoma de un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV) (o pro-vector “rAAV”) que puede ser replicado y empaquetado en particular vector por la célula de empaquetamiento huésped. El pro-vector rAAV comprenderá normalmente un pronucleótido heterólogo (o “transgén”), con el que es deseable alterar genéticamente otra célula en un contexto de terapia génica (puesto que el empaquetado de tal transgén en partícula de vector de rAAV puede ser utilizado efectivamente para transferir el transgén a una variedad de células de mamífero). El transgén está flanqueado generalmente por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV que comprenden secuencias que son reconocidas durante la excisión, replicación y empaquetamiento del vector AAV, así como durante la integración del vector en el genoma de una célula huésped. Un segundo componente es un virus auxiliar que puede aportar funciones auxiliares para la replicación del AAV. Aunque se emplea habitualmente adenovirus, también se pueden utilizar otros virus auxiliares, según se conoce en el estado de la técnica. Alternativamente, las funciones del virus auxiliar requeridas se pueden aislar genéticamente de un virus auxiliar y los genes que las codifican se pueden utilizar para aportar funciones de virus auxiliar en *trans*. Los elementos del vector AAV y el virus auxiliar (o las funciones del virus auxiliar) se pueden introducir en la célula huésped ya sea simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Los componentes finales para la producción de AAV que se deben proporcionar en la célula productora son “genes de empaquetamiento AAV” tales como los genes de AAV *cap* y *rep* que proporcionan proteínas de replicación y de encapsidación, respectivamente. Varias versiones diferentes de genes de empaquetamiento de AAV se pueden proporcionar (incluyendo casetes de *rep-cap* naturales así como casetes modificadas *rep* y/o *cap* en las que los genes *rep* y/o *cap* se pueden dejar bajo el control de los promotores nativos o ligados operativamente a promotores heterólogos. Tales genes de empaquetamiento de AAV se pueden introducir ya sea de forma transitoria o estable en la célula de empaquetamiento huésped, según se conoce en el estado de la técnica y se describe en más detalle más abajo.

Después de cultivar las células huéspedes en condiciones que permiten la replicación y encapsidación del AAV, las células y las fracciones sub-celulares se pueden procesar para generar preparados de virus adenoasociado (AAV) de titulación elevada que están sustancialmente exentos de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar y proteínas celulares. Más abajo se aportan descripciones detalladas de técnicas de procesado y protocolos ilustrativos que emplean tales técnicas.

#### Definiciones

Un “vector”, según se utiliza en el presente documento, se refiere a una macromolécula o asociación de macromoléculas que comprende o se asocia con un polinucleótido y que se puede utilizar para mediar la introducción del polinucleótido en una célula. Vectores ilustrativos incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores víricos, liposomas y otros vehículos de introducción de genes.

“AAV” es una abreviación de virus adenoasociado, y se puede utilizar para referirse al propio virus o a sus derivados. El término cubre todos los subtipos y tanto formas que se dan naturalmente como recombinantes, excepto cuando se requiere de otro modo. La abreviación “rAAV” se refiere a virus adenoasociado recombinante, también denominado vector recombinante AAV (o “vector rAAV”).

Un “vector rAAV” según se utiliza en el presente documento se refiere a un vector AAV que comprende una secuencia de polinucleótido de interés para la transformación genética de una célula. En constructos de vectores según se describen en el presente documento, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por el menos una,

preferiblemente dos secuencias de repetición terminal invertida (ITRs) de AAV. El término vector rAAV abarca tanto partículas de vector rAAV como plásmidos de vector rAAV.

5 Un “virus AAV” o “partícula viral AAV” se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de cápside AAV (preferiblemente por todas las proteínas de cápside de un AAV de tipo natural) y un polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido que no sea un genoma de tipo natural de AAV tal como un transgénico que se debe introducir en una célula de mamífero), se denomina típicamente “partícula de vector rAAV”, o simplemente “vector rAAV”.

10 “Empaquetamiento” se refiere a una serie de eventos intracelulares que resultan en el ensamblado y encapsidación de una partícula AAV.

15 Los genes de AAV “*rev*” y “*cap*” se refieren a secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas de replicación y encapsidación de virus adenoasociados. Se han encontrado en todos los serotipos de AAV examinados, y se describen más abajo y en la literatura. *rep* y *cap* de AAV se denominan en este documento “genes de empaquetamiento” de AAV.

20 Un “virus auxiliar” para AAV se refiere a un virus que permite que un AAV (p.ej., AAV de tipo natural) replicado y empaquetado por una célula de mamífero. Se conocen en el estado de la técnica una diversidad de tales virus auxiliares para AAV, incluyendo adenovirus, herpesvirus, y poxvirus tales como vaccinia. Los adenovirus abarcan una serie de subgrupos diferentes, aunque el adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el más comúnmente utilizado. Numerosos adenovirus de origen humano, no humano mamífero y aviar se conocen y están disponibles en depósitos tales como el ATCC. Los virus de la familia herpes incluyen, por ejemplo, los virus del herpes Simplex (HSV) y los virus de Epstein-Barr (EBV), así como citomegalovirus (CMV) y virus pseudorabies (PRV): los cuales también están disponibles en depósitos como el ATCC.

25 El término “tsHV” se refiere a un virus auxiliar termosensible, que puede proporcionar funciones auxiliares para la replicación y el empaquetamiento de AAV pero es termosensible con respecto a su propia replicación (es decir, se puede replicar a una temperatura “permissiva” pero se replica con menor eficiencia, o preferiblemente nada en absoluto, a una temperatura “no permissiva”). La habilidad del tsHV para auxiliar la replicación del AAV puede ser también termosensible, pero los tsHV preferidos para su utilización con esta invención apoyan eficientemente la replicación de AAV a temperaturas a las que el AAV puede replicarse pero que son no permisivas para la replicación del tsHV. Más abajo se describen ejemplos de tales tsHV.

35 Una partícula viral o virus “infeccioso” es aquel que comprende un componente polinucleotídico que puede introducir en una célula, por lo cual la especie vírica es trófica. El término no implica necesariamente ninguna capacidad de replicación del virus. Los análisis para contar partícula virales infecciosas se describen en otra parte de esta publicación y en la literatura.

40 Un virus “competente para la replicación” (p.ej., un AAV competente para la replicación, a veces abreviado como “RCA”) se refiere a un virus fenotípicamente de tipo natural que es infeccioso, y también es capaz de ser replicado en una célula infectada (es decir, en presencia de un virus auxiliar o de funciones de virus auxiliar). En el caso de AAV, la competencia para la replicación requiere generalmente la presencia de genes de empaquetamiento de AAV funcionales. Vectores rAAV preferidos según se describen en el presente documento son incompetentes para la replicación en células de mamífero (especialmente en células humanas) debido a la falta de uno o más genes de empaquetamiento de AAV. Preferiblemente, tales vectores rAAV carecen de toda secuencia de genes de empaquetamiento de AAV para minimizar la posibilidad de que se generen RCA por recombinación entre genes de empaquetamiento de AAV y un vector rAAV que llega. Los preparados de vector rAAV preferidos según se describen en el presente documento son aquellos que contienen pocos o ningún RCA (preferiblemente menos de aproximadamente 1 RCA por cada  $10^2$  partículas de rAAV, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1 RCA por cada  $10^8$  partículas de rAAV, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 1 RCA por cada  $10^{13}$  partículas de rAAV, lo más preferiblemente ninguna RCA).

55 El término “polinucleótido” se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de estos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos y análogos de nucleótidos, metilados y puede ser interrumpido por componentes no nucleotídicos. Si existen, las modificaciones a la estructura del nucleótido se pueden introducir antes o después del ensamblado del polímero. El término polinucleótido, según se utiliza en el presente documento, se refiere indistintamente a moléculas de hebra simple o doble. A no ser que se especifique o se requiera otra cosa, cualquier aspecto de la publicación descrita en el presente documento que es un polinucleótido abarca tanto la forma de doble hebra como cada una de las dos formas de hebra simple complementarias conocidas o que se predice construyan la forma de doble hebra.

65 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”, según se aplica a un polinucleótido significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción o unión, y otros procedimientos que tienen como resultado un constructo que es distinto de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen respectivamente réplicas del constructo polinucleotídico original y progenie del constructo del virus original.

Un “elemento de control” o “secuencia de control” es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, incluyendo replicación, duplicación, transcripción, splicing, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar a la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso, y puede estar potenciada o inhibida en la naturaleza. Elementos de control conocidos en el estado de la técnica incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN que bajo ciertas condiciones es capaz de unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante usualmente localizada secuencia abajo (en sentido 3’) del promotor.

“Ligado operativamente” se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos, donde los elementos se relacionan de una forma que les permite funcionar del modo esperado. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente a una región codificante si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Podría haber residuos que intervienen entre el promotor y la región codificante, mientras esta relación funcional se mantenga.

Un “vector de expresión” es un vector que comprende una región que codifica un polipéptido de interés, y se usa para efectuar la expresión de la proteína en una célula diana. Un vector de expresión también comprende elementos de control ligados operativamente a la región codificante para facilitar la expresión de la proteína en la diana. La combinación de elementos de control en un gen o genes a los que están ligados operativamente para la expresión se denomina a veces una “casete de expresión”, de las cuales un gran número se conoce y está disponible en el estado de la técnica o se puede construir sin problemas a partir de componentes que están disponibles en el estado de la técnica.

“Heterólogo” significa derivado de una entidad genotípicamente diferente de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y ligado operativamente a una secuencia codificante a la que naturalmente no se encuentra ligada es un promotor heterólogo.

“Alteración genética” se refiere a un proceso en el que un elemento genético es introducido en una célula de forma diferente a 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. Una alteración genética se puede efectuar, por ejemplo, transfectando una célula con un plásmido recombinante u otro polinucleótido mediante cualquier proceso conocido en el estado de la técnica, tal como electroporación, precipitación de fosfato cálcico, o contacto con un complejo liposoma-polinucleótido. Una alteración genética también se puede efectuar, por ejemplo, por transducción o infección con un virus o vector vírico de ADN o ARN. Preferiblemente, el elemento genético es introducido en un cromosoma o mini-cromosoma en la célula; pero cualquier alteración que cambia el fenotipo y/o el genotipo de la célula y de su progenie está incluido en este término.

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, tal célula está alterada “heredablemente”, porque se ha introducido una alteración genética que además puede ser heredada por la progenie de la célula alterada.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan de forma indistinta en esta publicación para denominar polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que ha sido modificado; por ejemplo, formación de puente disulfuro, glicosilación, lipidación o conjugación con un componente marcador.

Polipéptidos tales como “CFTR”, “p53”, “E1A” y similares, cuando se mencionan en el contexto de la terapia génica y de sus composiciones, se refieren al polipéptido correspondiente intacto, o cualquier fragmento o derivado suyo sometido a ingeniería genética, que conserva la función bioquímica deseada de la proteína intacta. De manera similar, las referencias a los genes CFTR, p53, E1A, y a otros de tales genes para el uso en terapia génica (típicamente denominados “transgenes” a introducir en una célula receptora), incluyen a los polinucleótidos que codifican el polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado sometido a ingeniería genética que posee la función bioquímica deseada.

Un plásmido, virus u otra sustancia “aislada” se refiere a una preparación de la sustancia desprovista de al menos algunos de los otros componentes que pueden estar también presentes donde la sustancia o una sustancia similar ocurre naturalmente o a partir de donde se prepara inicialmente. Así, por ejemplo, una sustancia aislada se puede preparar utilizando una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una mezcla original. El enriquecimiento

se puede medir de manera absoluta, tal como peso por volumen de solución, o se puede medir en relación a una segunda sustancia, potencialmente interferente, presente en la mezcla original. Los enriquecimientos crecientes de los aspectos de esta publicación son crecientemente más preferidos. Así, por ejemplo, un enriquecimiento del doble es preferido, un enriquecimiento de 10 veces más es más preferido, un enriquecimiento de 100 veces más es más preferido, un enriquecimiento de 1000 veces más es incluso más preferido.

Se dice que una preparación de AAV está "sustancialmente exenta" de virus auxiliar si la proporción de partícula infecciosas de AAV respecto a partícula infecciosas de virus auxiliar es de al menos  $10^2:1$  aproximadamente; preferiblemente al menos  $10^4:1$  aproximadamente; más preferiblemente al menos  $10^6:1$  aproximadamente; aún más preferiblemente al menos  $10^8:1$  aproximadamente. Preferiblemente los preparados están también exentos de cantidades equivalentes de proteínas de virus auxiliar (es decir, proteínas tal como estarían presentes como resultado de tales niveles de virus auxiliar si las impurezas de partículas de virus auxiliar mencionadas más arriba estuvieran presentes en forma disgregada). La contaminación por proteína vírica y/o celular se puede observar generalmente como la presencia de bandas reveladas con Coomassie en geles SDS (p.ej., la aparición de bandas distintas a las correspondientes a las proteínas de cápside de AAV VP1, VP2 y VP3).

Cuando se utiliza "eficiencia" para describir la producción, replicación o empaquetamiento vírico, se hace referencia a propiedades útiles del método: particularmente, la tasa de crecimiento y el número de partículas víricas producidas por cada célula. Producción de "alta eficiencia" indica producción de al menos 100 partículas víricas por célula; preferiblemente al menos unas 10'000 y más preferiblemente el menos unas 100'000 partículas por célula, a lo largo del periodo de cultivo especificado.

Un "individuo" o "sujeto" tratado de acuerdo con esta publicación hace referencia a vertebrados, particularmente miembros de una especie de mamíferos, e incluye pero no se limita a animales domésticos, animales de deportes y primates, incluyendo humanos.

"Tratamiento" de un individuo o célula es cualquier tipo de intervención realizada para intentar alterar el curso natural del individuo o de la célula en el momento en el que se inicia el tratamiento. Por ejemplo, se podría iniciar el tratamiento de un individuo para disminuir o limitar la patología causada por cualquier condición patológica, incluyendo (pero no limitándose a ello) una deficiencia genética heredada o inducida, una infección por un organismo vírico, bacteriano o parasítico, una condición neoplásica o aplásica, o una disfunción del sistema inmune, tal como autoinmunidad o inmunosupresión. El tratamiento incluye (pero no se limita a ello) la administración de una composición, tal como una composición farmacéutica, y la administración de células compatibles que han sido tratadas con una composición. El tratamiento puede ser realizado ya sea de manera profiláctica o terapéutica; es decir, ya sea previamente o subsecuentemente a la iniciación de un evento patológico contacto con un agente etiológico.

#### Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, salvo indicación contraria, técnicas convencionales de biología molecular, virología, cultivo de células animales, y bioquímica que se pertenecen al estado de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda edición (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); "Current Protocols in Protein Science" (John E Coligan, et al. eds. Wiley and Sons, 1995); y "Protein Purification: Principles and Practice" (Robert K. Scopes, Springer-Verlag, 1994).

#### Selección y preparación de vectores de aav y genes de empaquetado AAV

Un vector recombinante de AAV descrito en el presente documento comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, no-AAV) de interés, en lugar de los genes *rep* y/o *cap* de AAV que normalmente forman el grueso del genoma de AAV. Como en el genoma del AAV tipo natural, sin embargo, el pro-vector rAAV está flanqueado preferiblemente por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV según se menciona más arriba. Las variaciones en las que un constructo de rAAV está flanqueado por solo una ITR individual (típicamente modificada) también se han descrito en el estado de la técnica y se pueden emplear en conexión con la presente invención.

Se dispone de virus adenoasociados de cualquier serotipo, puesto que los diversos serotipos están funcionalmente y estructuralmente relacionados, incluso a nivel genético (ver, p.ej., Blacklow, pp. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease", J.R. Pattison, ed. (1988); y Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974). Todos los serotipos AAV exhiben aparentemente propiedades similares de replicación mediadas por genes homólogos *rep*; y generalmente todos llevan tres proteínas de cápside relacionadas tales como las expresadas en AAV2. Adicionalmente, el grado de relación es sugerido por análisis heteroduplex que revela una extensa hibridación cruzada entre serotipos a lo largo de todo el genoma; y la presencia de segmentos análogos que forman lazos, en los extremos que corresponden a ITRs. Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada serotipo están sometidas a un control regulatorio similar. Entre los diversos serotipos AAV, el AAV2 es el más comúnmente utilizado.

Un vector AAV descrito en este documento comprenderá típicamente un polinucleótido que es heterólogo al AAV. Típicamente, el polinucleótido es de interés debido a una capacidad para proporcionar una función a una célula diana en el contexto de terapia génica, tal como regulación positiva o negativa de la expresión de un cierto fenotipo. Generalmente, tal polinucleótido heterólogo o "transgén" será suficientemente largo como para proporcionar la función o secuencia codificante deseada. Para la encapsidación en partículas AAV2, preferiblemente el transgén tendrá menos de unas 5 kb, aunque se pueden emplear otros serotipos y/o modificaciones que permitan empaquetar secuencias más largas en las partículas víricas AAV.

Si se desea la transcripción del polinucleótido heterólogo en la célula diana en cuestión, se puede unir operativamente a su propio promotor o a uno heterólogo, dependiendo por ejemplo del nivel y/o especificidad de transcripción deseados en la célula diana, según se conoce en el estado de la técnica. Varios tipos de promotores y potenciadores son válidos para su utilización en este contexto. Los promotores constitutivos aportan un nivel regular de transcripción genética, y son preferidos cuando se desea que el polinucleótido terapéutico se exprese de forma regular. Los promotores inducibles exhiben generalmente baja actividad en ausencia del inductor, y son regulados positivamente en presencia del inductor. Pueden ser preferibles cuando se desea expresión solo en ciertos momentos o en ciertas localizaciones, o cuando se desea valorar el nivel de expresión utilizando un agente inductor. Los prootores y potenciadores también pueden ser específicos de un tejido: es decir, exhiben su actividad solo en ciertos tipos de células, presumiblemente debido a elementos reguladores de genes encontrados únicamente en esas células.

Ejemplos ilustrativos de promotores son el promotor tardío SV40 del virus de simio 40, el elemento polihédrico potenciador/promotor del Baculovirus, la timina kinasa del Herpes Simplex (HSV tk), el promotor temprano inmediato del Citomegalovirus (CMV) y varios promotores retrovirales incluyendo elementos LTR. Promotores inducibles incluyen promotores inducibles de iones de metales pesados (tales como el promotor del virus del tumor mamario del ratón (mMTV) o diversos promotores de hormona de crecimiento), y los promotores del fago T7 que son activos en presencia de la RNA polimerasa del T7. A modo de ilustración, ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen diversos promotores de surfactina (para expresión en el pulmón), promotores de miosina (para expresión en el músculo) y promotores de albúmina (para expresión en el hígado). Se conoce una amplia variedad de otros promotores y están generalmente disponibles en el estado de la técnica, y las secuencias para muchos de tales promotores están disponibles en bases de datos de secuencias tales como la base de datos GenBank.

Si se desea la traslación también en la célula diana, el polinucleótido heterólogo comprenderá preferiblemente también elementos de control que facilitan la traducción (tales como un lugar de unión en el ribosoma o "RBS" y una señal de poliadenilación). Consecuentemente, el polinucleótido heterólogo comprenderá generalmente al menos una región codificante ligada operativamente a un promotor adecuado, y puede comprender también, por ejemplo, un potenciador ligado operativamente, un sitio de unión a ribosoma y una señal de poli-A. El polinucleótido heterólogo puede comprender una región codificante, o más de una región codificante bajo el control del mismo o diferentes promotores. A la unidad entera, que contiene una combinación de elementos de control y región codificante, se la denomina a menudo un casete de expresión.

El polinucleótido heterólogo es integrado por técnicas recombinantes dentro de o preferiblemente en lugar de la región codificante del genoma del AAV (es decir, en lugar de los genes de AAV *rep* y *cap*), pero generalmente está flanqueado en ambos lados por regiones de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. Esto significa que aparece una ITR tanto secuencia arriba como secuencia abajo de la secuencia codificante, ya sea en yuxtaposición directa, preferiblemente (aunque no necesariamente) sin ninguna secuencia interviniente de origen AAV para reducir la probabilidad de recombinación que podría regenerar un genoma de AAV competente para la replicación. Hay evidencia reciente que sugiere que un único ITR puede ser suficiente para efectuar las funciones normalmente asociadas con configuraciones que comprenden dos ITRs (documento WO 94/13788), y constructos de vector con solo un ITR pueden por tanto emplearse en conjunción con los métodos de empaquetamiento y producción de la presente invención.

Los promotores nativos para *rep* son auto-reguladores, y pueden limitar la cantidad de partículas AAV producidas. El gen *rep* puede también estar ligado operativamente a un promotor heterólogo, se aporte *rep* como parte del constructo vector o por separado. Cualquier promotor heterólogo que no esté fuertemente regulado secuencia abajo por la expresión del gen *rep* es apropiado; pero se prefieren promotores inducibles porque la expresión constitutiva del gen *rep* puede tener un impacto negativo en la célula huésped. Una amplia variedad de promotores inducibles se conocen en el estado de la técnica; incluyen, a modo de ilustración, promotores inducibles de ion de metal pesado (tales como promotores de metalotioneína); promotores inducibles de hormona esteroidea (tales como el promotor de MMTV o los promotores de hormona del crecimiento); y promotores tales como los del fago T7 que están inactivos en presencia de la RNA polimerasa de T7. Una subclase especialmente preferida de promotores inducibles son los inducidos por el virus auxiliar que se utiliza para complementar la replicación y el empaquetamiento del vector rAAV. Se han descrito también numerosos promotores inducibles por virus auxiliar, incluyendo el promotor de gen temprano de adenovirus que es inducible por la proteína E1A de adenovirus; el promotor tardío mayor de adenovirus; el promotor de herpesvirus que es inducible por proteínas de herpesvirus tales como VP16 o 1CP4; así como los promotores inducibles de vaccina o poxvirus.

Los métodos para identificar y comprobar promotores inducibles por virus auxiliar se han descrito en una solicitud en tramitación junto con la presente y de propiedad común, publicada como WO96/17947 por Targeted Genetics Corporation (Allen et al.). Así, se conocen en el estado de la técnica métodos para determinar si promotores candidatos son o no son inducibles por virus auxiliar, y si serán útiles o no para la generación de células de empaquetamiento de alta eficiencia. En pocas palabras, uno de tales métodos implica sustituir el promotor p5 del gen *rep* de AAV con el promotor putativo inducible por virus auxiliar (ya sea conocido en el estado de la técnica o identificado utilizando técnica bien conocida tales como unión a genes reporteros sin promotor). Los genes *rep-cap* de AAV (con p5 sustituido), preferiblemente ligados a un marcador seleccionable positivo tal como un gen de resistencia a antibiótico, se integran entonces establemente en una célula huésped apropiada (tal como las células HeLa o A549 ejemplificadas más abajo). Las células que son capaces de crecer relativamente bien bajo condiciones de selección (p.ej., en presencia del antibiótico) se prueban entonces en cuanto a su capacidad para expresar los genes *rep* y *cap* al añadir un virus auxiliar. Como prueba inicial para la expresión de *rep* y/o *cap*, las células se pueden cribar fácilmente utilizando inmunofluorescencia para detectar proteínas Rep y/o Cap. La confirmación de las capacidades y eficiencias de empaquetamiento se pueden entonces determinar mediante pruebas funcionales sobre la replicación y el empaquetamiento de vectores rAAV entrantes. Utilizando esta metodología, un promotor inducible por virus auxiliar derivado del gen metalotioneína del ratón ha sido identificado como un sustituto apropiado para el promotor p5, y se ha utilizado para producir altos títulos de partículas rAAV (según se describe en el documento WO96/17947, Targeted Genetics Corporation).

Dados los límites relativos de tamaño de encapsidación de diversos genomas AAV, la inserción de un polinucleótido heterólogo grande en el genoma requiere la eliminación de una porción de la secuencia de AAV. La eliminación de uno o más genes de AAV es en cualquier caso deseable, para reducir la probabilidad de generar AAV competente para la replicación ("RCA"). Por consiguiente, las secuencias codificantes o promotoras de *rep*, *cap* o ambos, preferiblemente se eliminan, puesto que las funciones proporcionadas por estos genes se pueden proporcionar en *trans*.

Se dice que el vector resultante es "defectivo" en estas funciones. Para replicar y empaquetar el vector, las funciones ausentes se complementan con un gen de empaquetado, o una pluralidad de ellos, que codifican juntos las funciones necesarias para los diversos productos genéticos *rep* y/o *cap* ausentes. Preferiblemente, los genes de empaquetamiento o casetes de genes no están flanqueados por ITRs de AAV y preferiblemente no comparten ninguna homología sustancial con el genoma del rAAV. Así pues, para minimizar la recombinación homóloga durante la replicación entre la secuencia vector y los genes de empaquetado proporcionados se forma separada, es deseable evitar la superposición de las dos secuencias de polinucleótidos. El nivel de homología y la correspondiente frecuencia de recombinación aumenta con 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 se puede determinar teóricamente y confirmar experimentalmente, según se conoce en el estado de la técnica. Sin embargo, típicamente se puede reducir o eliminar la recombinación si la secuencia que se superpone es menor de unos 25 nucleótidos si es al menos idéntica en un 80% en toda su longitud, o menor de unos 50 nucleótidos seguidos si es idéntica en al menos un 70% en toda su longitud. Por supuesto, son preferibles niveles incluso menores de homología puesto que reducirán más la probabilidad de recombinación. Parece que, incluso sin ninguna homología superpuesta, existe una cierta frecuencia residual de generar RAC. Se pueden obtener reducciones incluso mayores en la frecuencia de generación de RCA (p.ej., por recombinación no homóloga) "separando" las funciones de replicación y encapsidación del AAV, según se describe por Allen et al. en la solicitud de patente de los EE.UU. 08/769,728, presentada el 18 dic 1996, publicada internacionalmente como WO98/27204 el 25 jun 1998 (Targeted Genetics Corporation).

El constructo de vector de rAAV, y los constructos de genes de empaquetamiento complementario se pueden implementar en esta invención de numerosas formas diferentes. Partículas víricas, plásmidos y cualquier célula huésped establemente transformada se pueden utilizar para introducir tales constructos en la célula de empaquetamiento, tanto de forma transitoria como estable.

En cierta realización de esta invención, el vector de AAV y el/los gen(es) complementario(s) de empaquetamiento, si los hay, se proporcionan en forma de plásmidos bacterianos, partículas de AAV o cualquier combinación de ellos. En otras realizaciones, ya sea la secuencia del vector de AAV, el/los gen(es) complementario(s) de empaquetamiento, o ambos, se proporcionan bajo la forma de células eucariotas genéticamente alteradas (de forma preferiblemente heredable). El desarrollo de células huéspedes alteradas de forma heredable para expresar la secuencia del vector de AAV, los genes de empaquetamiento, o ambos, proporciona una fuente asentada del material que se expresa a un nivel confiable.

Así pues, se pueden utilizar diversas células diferentes alteradas genéticamente en el contexto de esta invención. A modo de ilustración, una célula huésped de mamífero se puede utilizar con al menos una copia intacta de un vector de rAAV establemente integrado. Un plásmido de empaquetamiento de AAV que comprende al menos un gen *rep* de AAV ligado operativamente a un promotor se puede utilizar para proporcionar funciones de replicación (según se describe en una solicitud de propiedad común de Flotte et al., ahora patente de los EE.UU. 5,658,776). Alternativamente, una línea celular estable de mamífero con un gen *rep* de AAV ligado operativamente a un

promotor se puede utilizar para proporcionar funciones de replicación (ver, p.ej., Trempe et al., (USSN 08/362,608, 9 ene 1995, WO95/13392, 18 may 1995); Burstein et al., (USSN 08/770,122, presentada el 18 dic 1996, WO98/23018, 25 jun 1998); y Johnson et al., (USSN 08/254,358, presentada el 6 jun 1994, emitida como U.S. No. 5,656,785, 19 ago 1997)). El gen *cap* de AAV, que proporciona las proteínas de encapsidación según se describe arriba, se puede proporcionar junto con un gen *rep* de AAV o por separado (ver, p.ej., las solicitudes y patentes referenciadas más arriba, así como Allen et al., USSN 08/769,728, presentada 18 dic 1996, WO98/27204 el 25 jun 1998 (Targeted Genetics Corporation)). Otras combinaciones son posibles y se incluyen en el alcance de esta invención.

#### Introducción de material genético en células

Según se describe en el estado de la técnica, y se ilustra tanto en el presente documento como en las referencias citadas más arriba, se puede introducir material genético en células (tales como células "productoras" de mamífero para la producción de a) utilizando cualquier variedad de medios para transformar o transducir tales células. A modo de ilustración, tales técnicas incluyen por ejemplo transfección con plásmidos bacterianos, infección con vectores víricos, electroporación, precipitación de fosfato cálcico, e introducción utilizando cualquiera de diversas composiciones con base lipídica (un proceso a menudo denominado "lipofección"). Se han descrito métodos y composiciones para realizar estas técnicas en el estado de la técnica y están ampliamente disponibles.

La selección de células apropiadamente alteradas se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica de la literatura. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido utilizadas para alterar la célula se pueden introducir simultáneamente con uno o más marcadores detectables o seleccionables según se conoce en el estado de la técnica, o ligadas operativamente a ellos. A modo de ilustración, se puede emplear un gen de resistencia a un fármaco como un marcador seleccionable. Las células resistentes al fármaco se pueden entonces escoger y cultivar, y luego probar la expresión de la secuencia deseada, es decir, un producto de gen de empaquetamiento, o un producto del polinucleótido heterólogo, según sea el caso. La prueba de adquisición, localización y/o permanencia de un polinucleótido introducido se puede realizar utilizando técnicas basadas en la hibridación de ADN (tales como hibridación Southern y otros procedimientos según se conocen en el estado de la técnica). La prueba de expresión se puede realizar sin problemas mediante análisis Northern del ARN extraído de las células alteradas genéticamente, o por inmunofluorescencia indirecta del correspondiente producto genético. La comprobación y confirmación de las capacidades y eficiencias de empaquetamiento se pueden obtener introduciendo en la célula los demás componentes funcionales de AAV y un virus auxiliar, para probar la producción de partículas de AAV. Cuando una célula está alterada de forma heredable con una pluralidad de constructos de polinucleótidos, en general es más conveniente (aunque no esencial) introducirlos en la célula por separado, y validar cada paso en serie. Las referencias que describen tales técnicas incluyen las citadas en este documento.

#### Selección y preparación de virus auxiliares

Según se describe más arriba, el AAV es un parvovirus defectivo para la auto-replicación, y generalmente debe depender de un virus auxiliar para proporcionar ciertas funciones de replicación. Se ha identificado una serie de tales virus auxiliares, entre los que se incluyen adenovirus, virus del herpes (incluyendo sin limitarse a HSV1, citomegalovirus y HHV-6), y poxvirus (particularmente vaccinia). Cualquiera de tales virus se puede utilizar con esta invención.

Frecuentemente el virus auxiliar será un adenovirus de un tipo y subgrupo que puede infectar la célula huésped. El adenovirus humano del subgrupo C, particularmente los serotipos 1, 2, 4, 6 y 7, se usan comúnmente. Generalmente se prefiere el serotipo 5.

Las características y los patrones de crecimiento del adenovirus se conocen en el estado de la técnica. El lector se puede referir, por ejemplo, a Horowitz, "Adenoviridae and their replication", pp 771-816 en "Fundamental Virology", Fields et al., eds. El genoma de adenovirus empaquetado es una molécula lineal de ADN, ligado a través de ITRs de adenovirus a las terminaciones derecha e izquierda a través de un complejo de proteína terminal para formar un círculo. Las regiones de control y codificación para componentes tempranos, intermedios y tardíos se solapan en el genoma. Genes de la región temprana están implicados en la replicación del genoma del adenovirus, y están agrupados dependiendo de su ubicación en las regiones E1, E2, E3 y E4.

Aunque no es esencial, en principio es deseable que la cepa de virus auxiliar sea defectiva para la replicación en el sujeto que en última instancia debe recibir la terapia génica. Así, cualquier virus auxiliar residual presente en una preparación rAAV será incompetente para la replicación. Los adenovirus de los que se ha eliminado la región E1A o ambas regiones E1A y E3 no son infecciosos para la mayoría de las células humanas. Pueden ser replicados en una línea celular permisiva (p.ej., la línea celular humana 293) que es capaz de complementar la actividad perdida. Las regiones de adenovirus que parecen estar asociadas con la función auxiliar, así como las regiones que no lo parecen, se han identificado y descrito en la literatura (ver, p.ej., P. Colosi et al., WO97/17458, y las referencias citadas en ese documento).

#### Utilización de un virus auxiliar sensible a las condiciones

Según se describe en el presente documento, un virus auxiliar "sensible a las condiciones" puede también ser empleado para proporcionar la actividad de virus auxiliar. Tal cepa de virus auxiliar tiene que tener como mínimo la propiedad de ser capaz de apoyar la replicación del AAV en una célula huésped al menos bajo un conjunto de condiciones en las que él mismo no experimenta replicación genómica efectiva. Cuando la actividad del virus auxiliar se proporcionada como partículas de virus intacto, generalmente también es necesario que el virus sea capaz de replicación es una célula huésped bajo un segundo conjunto de condiciones. El primer conjunto de condiciones diferirá del segundo conjunto de condiciones en 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 cambio en una condición ambiental tal como la temperatura. Lo más conveniente es que la diferencia entre las dos condiciones sea la temperatura, y tal virus sensible a las condiciones se denomina por tanto virus auxiliar termosensible (tsHV).

Para los objetivos de esta publicación, un virus auxiliar "termosensible" o "ts" es uno capaz de replicar su material genético en una célula eucariótica en cierto rango de temperatura (el rango de temperatura "permisivo"), típicamente aproximadamente 15 °C - 35 °C y preferiblemente aproximadamente 20 °C - 32 °C. Sin embargo, a la temperatura "no permisiva", incluso cuando las otras condiciones se mantienen iguales, la velocidad de replicación del material genético es sustancialmente inferior, al menos 10 veces inferior; habitualmente al menos unas 100 veces inferior; y preferiblemente al menos unas 1000 veces inferior. Esta temperatura es típicamente aproximadamente 35 °C - 50 °C, generalmente aproximadamente 42 °C. En un ejemplo típico de tal virus auxiliar ts, el virus es capaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente bajas tales como temperaturas de aproximadamente 20 °C - 32 °C, pero es incapaz de replicación eficaz a temperaturas relativamente altas tales como temperaturas de aproximadamente 37 °C - 42 °C. Se entiende que la célula infectada por virus puede sin embargo exhibir algún proceso metabólico atribuible al virus a la temperatura no permisiva, incluyendo pero no limitándose a función auxiliar para producción de AAV.

Un virus auxiliar termosensible se puede producir en grandes cantidades cultivando células infectadas a una temperatura permisiva. Se puede entonces producir el vector AAV cultivando células que comprenden elementos vectores y el virus auxiliar termosensible a una temperatura no permisiva. La preparación del vector estará sustancialmente exenta de componentes de virus auxiliar.

Se ha descrito un gran número de variantes de adenovirus termosensibles en la literatura; ver, 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); entre otros. El análisis de complementación indica que tales variantes pertenecen a una pluralidad de grupos de complementación diferentes (Ginsberg et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34:419, 1974). Esto sugiere que varias etapas del ciclo de replicación del adenovirus se pueden volver termosensibles.

Puesto que la función auxiliar para replicación de AAV requiere que solo parte del ciclo del adenovirus esté intacta, comprobar la función auxiliar de diversos mutantes a temperaturas no permisivas proporciona un método para mapear la función auxiliar. Por ejemplo, Ishibashi et al. (Virology 45:317, 1971) reportaron que variantes de adenovirus aviar termosensibles apoyan la replicación de AAV1 y AAV2. Ito et al. reportaron que el mutante ts13 termosensible del adenovirus humano 7 (Ad7ts13) auxilia la replicación de AAV a la temperatura no permisible tan eficazmente como la cepa natural. Drake et al. (Virology 60:230, 1974) reportaron la complementación de la síntesis de antígenos de AAV4 por 3 grupos de mutantes termosensibles del virus de herpes simplex tipo 1 (HSV1). Handa et al. (J. Gen. Viro. 29:239, 1975) reportaron actividad auxiliar para producción de virus AAV1 por adenovirus humanos mutantes Ad5ts36, Ad5ts125, Ad5ts149, Ad12tsA275, Ad12tsB221, y Ad12tsC295. Ostrove et al. (Virology 104:502, 1980) reportaron que los mutantes termosensibles Ad5ts125, Ad5ts135, Ad5ts157, Ad5ts116, y Ad5ts142, y el conjunto de huéspedes mutantes hr6, pero no el hr3, apoyan la replicación de AAV. Mayor et al. (J. Gen. Virol. 35:545, 1977) reportaron que Ad31ts13 pero no Ad31ts94 apoyaron la producción de AAV1 a la temperatura no permisiva.

Straus et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:742, 1976) reportaron que Ad5ts125 apoyó la replicación de AAV2 bajo condiciones en las que los propios adenovirus no se replicaron. Utilizaron esta propiedad para estudiar intermediarios de ADN formados durante la replicación de AAV. Myers et al. (J. Virol. 35:65, 1980) realizaron un estudio cuantitativo sobre la función de auxilio y mostraron que Ad5ts149 apoyaba la producción de 20'000 partículas de AAV infecciosas por célula a la temperatura no permisiva, mientras que Ad5ts107 producía solo ~100 partículas por célula. Puesto que Ad5ts107 tiene una mutación en la región que codifica la proteína de unión a ADN de 72 kDa, concluyeron que esa proteína jugaba un papel en la expresión del ARN de AAV. Más recientemente, Carter et al. (Virology 191:473, 1992) propusieron que se requiere una proteína de 72kDa completamente funcional para la expresión posttranscripcional de los genes de AAV *rep* y *cap*.

Según se subraya en la sección de antecedentes, la existencia de adenovirus termosensibles se conoce desde hace bastante. Sin embargo, no ha habido aprendizaje o sugerencia efectiva en relación al uso actual de virus auxiliares condicionales en la generación de vectores de AAV recombinante, como los que se pueden utilizar para terapia génica.

Parte de la explicación puede ser la dificultad para obtener títulos factibles de AAV cuando se utilizan vectores recombinantes. Entre otras cosas, las proteínas Rep de AAV aparentemente regulan secuencia abajo su propia expresión a través del promotor p5 (Tratschin et al., Mol. Cell Biol. 6:2884, 1986). Además, se ha observado que la expresión del gen *rep* en líneas celulares de empaquetamiento tales como las que se pueden utilizar para la producción de vector AAV recombinante, tiende a inhibir el crecimiento y/o el metabolismo de la célula (ver, p.ej., Targeted Genetics Corporation, WO96/17947, por Allen et al.).

Las diferencias entre la generación de vectores AAV de tipo natural y vectores AAV recombinantes tiende a ser bastante dramática si se considera en términos de producción. En particular, se ha observado que la producción de vectores AAV recombinantes tiende a ser sustancialmente inferior a la producción de partículas de AAV de tipo natural, y que la presencia o generación de cantidades incluso pequeñas de contaminación con AAV de tipo natural tiende a resultar en una producción preferente de virus de tipo natural que eventualmente puede superar en número a los vectores de AAV recombinante.

Estos fenómenos quedan adicionalmente ilustrados por los resultados descritos en los ejemplos 1 y 2 de esta publicación, y en la Figura 1. Se reporta en otro lugar que el adenovirus termosensible mutante ts149 apoya la replicación de partículas AAV (Myers et al., J. Virol. 35:65, 1980). Sin embargo, el Ejemplo 2 muestra que cuando este mutante se utiliza para apoyar la producción de un vector de AAV con un promotor heterólogo bajo condiciones normales, el nivel de producción es *varios órdenes de magnitud* inferior al apoyo con adenovirus de tipo natural.

Esta publicación muestra que un virus auxiliar termosensible se puede de hecho utilizar para preparar vectores de AAV recombinantes con títulos factibles, venciendo los aparentes obstáculos de producción. Las descripciones que siguen ilustran como seleccionar un virus auxiliar termosensible y optimizar las condiciones para aportar suficiente AAV para los propósitos de la terapia génica.

En particular, se muestra que extender el periodo de replicación para AAV cuando se utiliza un tsAd como auxiliar aumenta dramáticamente la cantidad de vector AAV que se produce (Ejemplo 3). Esto es opuesto a la intuición, porque extender el periodo de replicación cuando se utiliza un Ad de tipo natural del mismo modo *disminuye* la cantidad de vector AAV en al menos un orden de magnitud. El experto en la materia que quiere optimizar las condiciones de producción probaría lógicamente tiempos de cultivo más cortos y concentraciones más elevadas de virus auxiliar; en el presente documento se muestra que ambas cosas son inefectivas.

También se describen en este documento métodos mejorados de cultivo y separación para preparar cantidades cuantitativas de adenovirus termosensibles. Aunque no se requiere estrictamente para la práctica de ciertas realizaciones de esta invención, los preparados de adenovirus termosensibles obtenidos mediante estos métodos son particularmente adecuados para la producción de AAV, entre otros, con fines de terapia génica.

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

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

Un virus auxiliar ejemplar para utilizar con esta invención el adenovirus termosensible ts149 del serotipo Ad5 (Ad5ts149). Según se muestra en la sección de ejemplos, en condiciones optimizadas, esta cepa puede utilizarse para producir rAAV a niveles que igualan o superan los apoyados por Ad5 de tipo natural. El ts149 tiene una sola transición de C-G a A-T en posición 7563 (Roovers et al., Virus Genes 4:53, 1990). Esto tiene como resultado un cambio del aminoácido leucina en el residuo 411 de la ADN polimerasa a fenilalanina. La ADN polimerasa está contenida en la unidad de transcripción E2 del adenovirus. Sin embargo, otros mutantes de ts que se cartografían en esta región son menos adecuados. En particular, la unidad de transcripción E2 comprende también la región de

codificación de la proteína de unión a ADN de 72 kDa (DBP). Una cepa que no produce DBP detectable (Add/802) apoya la replicación de AAV, pero a un nivel que está reducido en un orden de magnitud (Carter et al., *Virology* 191:473, 1992). Adts125, que comprende también una mutación que se cartografía en la región que codifica DBP, apoya la replicación de AAV (Straus et al., *J. Virol.* 17:140, 1976), aunque los niveles son generalmente mucho menores que con Ad5 de tipo natural (Myers et al., *J. Virol.* 35:65, 1980). Por consiguiente, los vectores de adenovirus termosensibles adecuados para utilizar en la presente invención incluyen aquellos para los que la sensibilidad se cartografía en la región E2A del genoma, preferiblemente en la región que codifica ADN polimerasa.

El experto puede determinar fácilmente qué cepas víricas son adecuadas para utilizar como virus auxiliar realizando un ensayo de replicación de rAAV usando un panel de cepas de virus auxiliar candidatas en una célula candidata en condiciones que sean no permisivas para la autorreplicación del auxiliar. Para variantes termosensibles, se realiza el cribado a la temperatura no permisiva según las propiedades conocidas de la cepa. Las temperaturas no permisivas son generalmente mayores que las temperaturas permisivas, típicamente de aproximadamente 35 °C - 50 °C, preferiblemente de 38 °C - 45 °C, más preferiblemente de aproximadamente 39,5 °C. Se prefieren las variantes que apoyan la replicación de AAV a un nivel que está dentro de un orden de magnitud del apoyado por el correspondiente virus de tipo natural. Al realizar el cribado, el experto debe incorporar las demás enseñanzas de esta publicación. En particular, cribar cultivando durante tiempos que procuran una replicación de AAV máxima con virus de tipo natural es insuficiente. Se debe establecer una matriz cinética en la que se usan los virus auxiliares candidatos durante periodos más largos, y comparar entonces con el virus de tipo natural en el momento de recolección máxima. Se proporciona una ilustración más detallada de este análisis en el Ejemplo 3 de esta publicación.

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

En un aspecto, se introduce en la célula huésped a utilizar para la replicación del vector de rAAV el genoma del virus auxiliar (o como mínimo, las regiones del genoma del virus auxiliar que codifican la función auxiliar) en forma de un plásmido de ADN o una pluralidad de plásmidos que proporcionan las funciones complementarias. En el estado de la técnica se conocen procedimientos para la manipulación experimental de adenovirus. El lector se remite a Graham et al., "Manipulation of adenovirus vectors" en: Murray EJ, ed. *Methods in molecular biology: Gene transfer and expression protocols*, vol 7. Clifton, NJ: The Human Press, 1991:109-128, que proporciona protocolos detallados para la propagación, titulación y purificación de adenovirus, contransfección y recombinación in vivo. Los plásmidos de adenovirus están disponibles comercialmente en Microbix Biosystems Inc., Toronto, Canadá.

En otro aspecto, se transfecta establemente la célula huésped con genes de adenovirus, o se altera genéticamente para proporcionar las funciones necesarias para la replicación de rAAV. Como alternativa, la célula huésped se puede alterar genéticamente con solo una porción del genoma de adenovirus, y se infecta o transfecta posteriormente con una partícula o plásmido de adenovirus. Las solicitudes de patente WO 95/27071 y WO 95/34671 describen células huéspedes alteradas hereditariamente para proporcionar una función adenovírica que complementa la propiedad de replicación de diversos constructos de adenovirus defectivos.

En otra realización más, la célula huésped usada para replicación de AAV se infecta con un virus auxiliar que es capaz de autorreplicación, pero no en condiciones no permisivas. Se puede utilizar cualquier preparación de la cepa requerida que proporcione una MOI suficiente. Cuiéndose a las GMPs y a otros requisitos regulatorios, y para facilitar el aumento de escala con fines comerciales, las preparaciones de virus auxiliar comprenden preferiblemente una alta densidad de partículas infecciosas y están sustancialmente exentas de desechos celulares y otros contaminantes. Las propiedades deseables incluyen las siguientes:

- Una densidad de al menos  $10^6$  UI/mL, preferiblemente de al menos aproximadamente  $10^8$  UI/mL, más preferiblemente de al menos aproximadamente  $10^{10}$  UI/mL, determinada en un ensayo de TCID<sub>50</sub>.

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

- Menos de un 20%, preferiblemente menos de aproximadamente un 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente un 1% de contaminación por material que no es de adenovirus a nivel de proteína o ADN, detectado por geles de SDS teñidos para proteína o geles de agarosa de productos de digestión con nucleasa de restricción teñidos con bromuro de etidio.

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

Se puede preparar virus auxiliar en cualquier célula que sea permisiva de la replicación vírica. Para adenovirus, las células preferidas incluyen células 293 y células HeLa. Tradicionalmente, cuando estas células se han usado para



replicación de adenovirus, se han usado en cultivos en placa. Sin embargo, según se muestra en el Ejemplo 4, estos procedimientos apoyan generalmente la replicación de adenovirus termosensibles a niveles que son una o dos unidades logarítmicas menores que para adenovirus de tipo natural.

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

15 La filtración de flujo tangencial es una técnica usada en el estado de la técnica para procesar grandes volúmenes de células de mamífero con el fin de perfundirlas, concentrarlas y recolectarlas. Ver, por ejemplo, Dorin et al., *Biotechnol. Prog.* 6:494, 1990; Maiorella et al., *Biotechnol. Bioeng.* 37:121, 1991. Se recomienda utilizar esta técnica con cultivos en suspensión para la preparación de virus auxiliar para utilizar en la presente invención. El Ejemplo 5 demuestra que las células HeLa S3 soportan fuerzas de cizalladura de  $750-1500 \text{ s}^{-1}$ , permitiendo la concentración de las células y la diafiltración del medio usado.

20 Se recolecta el virus del cultivo desde el medio usado o mediante microfluidificación de las células. El nivel de virus auxiliar producido en el cultivo es típicamente de al menos  $10^7$  UI/mL, y preferiblemente de al menos aproximadamente  $3 \times 10^7$  UI/mL.

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

35 Producción de una célula huésped que comprende virus auxiliar y AAV

Varios criterios influyen en la selección de las células para su uso en la producción de partículas de rAAV según se describen en el presente documento. Como cuestión inicial, la célula debe permitir la replicación y empaquetamiento del vector de rAAV al utilizar el virus auxiliar seleccionado. Sin embargo, puesto que la mayoría de células de mamífero pueden ser productivamente infectadas por AAV, y muchas pueden ser infectadas también por virus auxiliares tales como adenovirus, resulta evidente que una gran variedad de células de mamífero y líneas celulares satisfacen eficazmente estos criterios. Entre ellas, las células y líneas celulares más preferidas son aquellas que pueden cultivarse fácilmente para facilitar la producción de gran escala de preparados de vector de AAV recombinante. Sin embargo, de nuevo muchas de dichas células satisfacen eficazmente este criterio. Cuando se desea una producción a gran escala, la elección del procedimiento de producción influirá también en la selección de la célula huésped. Por ejemplo, según se describe con más detalle a continuación y en el estado de la técnica, algunas técnicas de producción y recipientes o cámaras de cultivo están diseñados para el crecimiento de células adherentes o unidas, mientras que otros están diseñados para el crecimiento de células en suspensión. Por tanto, en el último caso, la célula huésped preferiblemente estaría adaptada o sería adaptable al crecimiento en suspensión. Sin embargo, incluso en el caso de células y líneas celulares que se consideran adherentes o dependientes de anclaje, es posible (según se describe más abajo) 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.

55 Cuando se utiliza un virus auxiliar termosensible, la célula debe ser capaz de replicar eficazmente el vector de rAAV en condiciones que sean no permisivas para la replicación del virus auxiliar. A modo de ilustración, cuando se utiliza el adenovirus ts149 como virus auxiliar ts (según se describe e ilustra más abajo), la célula debe ser capaz de apoyar la replicación y el empaquetamiento de rAAV a temperaturas bien por encima de  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , preferiblemente de aproximadamente  $39,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las células 293 humanas son un ejemplo de línea celular que satisface estos criterios, pero numerosas otras células y líneas celulares son capaces de replicar rAAV a esta temperatura relativamente elevada.

65 En última instancia, el virus auxiliar, 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. Cuando se proporcionan separadamente del vector uno o más genes de empaquetamiento de AAV, se proporciona una célula huésped que comprende: (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, 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 provector de rAAV, donde dicho vector o provector de rAAV comprende dicho polinucleótido heterólogo flanqueado por al menos una ITR de AAV y es deficiente de dicho gen o genes de empaquetamiento de AAV; y (iii) un virus auxiliar o secuencias que codifican las funciones de virus auxiliar necesarias. Debe observarse, sin embargo, que uno o más de estos elementos pueden combinarse en un único replicón. A modo de ilustración, un virus auxiliar puede comprender también un provector de rAAV o un gen de empaquetamiento de AAV.

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

De forma similar, si el vector de AAV y/o los genes de empaquetamiento se introducen transitoriamente en la célula de empaquetamiento (en contraposición a introducirse establemente), se introducen preferiblemente a un nivel suficiente para alterar genéticamente la mayoría de las células en cultivo. Las cantidades requeridas generalmente son del orden de 10 µg por cada 10<sup>6</sup> células, si se suministran como plásmido bacteriano, o de 10<sup>8</sup> partículas por 10<sup>5</sup> células si se suministran como partícula de AAV. La determinación de la cantidad óptima es un ejercicio de titulación rutinaria que está dentro de las habilidades normales del experto.

Estos elementos pueden introducirse en la célula simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Cuando la célula es alterada hereditariamente por cualquiera de los elementos, la célula puede seleccionarse y dejarse proliferar antes de introducir el siguiente elemento.

En una realización preferida, el virus auxiliar se introduce en último lugar en la célula para recuperar y empaquetar un vector de rAAV residente. Generalmente, la célula estará ya suplementada 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 establemente en la célula. Se aprecia fácilmente que son posibles otras combinaciones. Dichas combinaciones están incluidas dentro del alcance de la invención.

Una vez se proporciona a la célula huésped los elementos necesarios, se cultiva la célula en condiciones permisivas para la replicación de AAV, para permitir la replicación y empaquetamiento del vector de rAAV. El tiempo de cultivo se ajusta preferiblemente para corresponder a los niveles de producción máximos, y es típicamente de 3-6 días. Preferiblemente, se producen al menos 100 partículas víricas por célula; más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 por célula, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 10.000 por célula. Preferiblemente, se producen al menos 0,5 x 10<sup>6</sup>, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup>, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 2 x 10<sup>6</sup> UR/mL vectores de AAV por 2 x 10<sup>5</sup> células durante el periodo de cultivo. Opcionalmente, pueden usarse métodos de producción a gran escala tales como cultivo en suspensión y filtración de flujo tangencial. Se recolectan entonces las partículas de AAV y se aíslan de las células usadas para prepararlas.

Las preparaciones de partículas de rAAV descritas en este documento comprenden preferiblemente una alta densidad de partículas de AAV infecciosas y están sustancialmente exentas de virus auxiliar, proteínas de virus auxiliar y desechos celulares y otros contaminantes. Las propiedades deseables incluyen las siguientes:

- Una concentración de al menos 10<sup>7</sup>, preferiblemente de al menos aproximadamente 10<sup>8</sup>, más preferiblemente de al menos aproximadamente 10<sup>9</sup> UR/mL, determinada en un ensayo de replicación o comparación de hibridación cuantitativa con un patrón conocido.

- No más de 10<sup>3</sup>, preferiblemente no más de aproximadamente 10<sup>2</sup>, más preferiblemente no más de aproximadamente 10<sup>1</sup> partículas infecciosas de virus auxiliar por 10<sup>8</sup> UR de partículas de rAAV.

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

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

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

Los procedimientos resumidos en esta publicación son adecuados para preparar lotes experimentales pequeños o lotes preparativos de 10-100 L o más. Para preparaciones de lotes a gran escala, también es deseable la siguiente

propiedad:

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

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

En las siguientes secciones y en ejemplos posteriores se proporcionan técnicas ejemplares para generar preparados de virus auxiliares y AAV que exhiben diversas propiedades deseables según se describen más arriba.

Se conocen en el estado de la técnica diversos métodos para la determinación del título infeccioso de un preparado vírico. Sin embargo, un método preferido para la determinación del título es un ensayo de titulación de alto rendimiento según se proporciona en el presente documento. En un ensayo de titulación de alto rendimiento ejemplar, se establece una matriz de pocillos de cultivo que comprenden cada uno una alícuota de células de mamífero y una alícuota de preparación vírica (así como pocillos de control que comprenden, por ejemplo, células solas, virus solo y nada). La matriz de pocillos de cultivo puede estar, por ejemplo, en forma de un recipiente de microtitulación. Típicamente, se añaden a las células alícuotas (p.ej., alícuotas diluidas en serie) del preparado vírico a titular, y entonces se incuban las células y virus en condiciones que permitan la replicación del virus (típicamente, condiciones de crecimiento adecuadas para la célula huésped de mamífero). Después de la replicación del virus, generalmente se libera el ácido nucleico vírico mediante la lisis de las células de mamífero (utilizando condiciones o agentes que promuevan la lisis según sea necesario). En realizaciones preferidas, el ácido nucleico (incluyendo ácido nucleico vírico) en la multiplicidad de lisados se transfiere y fija a una membrana en condiciones de unión al ácido nucleico (lavando de forma adecuada para retirar las proteínas y otros contaminantes). La membrana es preferiblemente un duplicado o imagen especular de la matriz de cultivos en la que los pocillos individuales de la matriz original se representan subsecuentemente por "conjuntos" de ácido nucleico (del lisado de cada pocillo de cultivo) que se unen en las correspondientes posiciones en la membrana. Puede usarse entonces la hibridación de la membrana con una sonda marcada específica de virus (o específica de inserto vírico) para identificar y cuantificar la cantidad relativa de ácido nucleico específico de virus en cada uno de los puntos de la matriz, y en correspondencia, en cada uno de los pocillos de cultivo originales. Las condiciones y materiales para transferencia, unión, lavado e hibridación de ácido nucleico se pueden adaptar a partir de técnicas de biología molecular rutinarias tales como hibridación "dot blot" (según se describe en la literatura, ver p.ej. las técnicas biológicas moleculares en Sambrook et al., supra, y Ausubel et al., supra). Se presentan más abajo aplicaciones ilustrativas de estas técnicas.

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

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

En diversos aspectos preferidos de la presente publicación, se emplean métodos de producción y purificación para la generación de virus auxiliares adecuados para el uso en la producción de vectores de rAAV según se describen en el presente documento. Un virus auxiliar habitualmente utilizado para la producción de AAV es el adenovirus, típicamente Ad5, aunque se pueden emplear también otros virus auxiliares según se examinan en el presente documento y en la literatura.

Con fines de ilustración, es conveniente dividir el examen de la producción y purificación de virus en las fases "anterior" y "posterior". El proceso "anterior" designa generalmente la producción del virus en células huéspedes adecuadas y la liberación o retirada del virus de las células para producir una preparación de virus "bruta" tal como un lisado. El procesamiento "posterior" puede emplearse para purificar la preparación de virus bruta (p.ej., para aislarlo de proteínas celulares y/u otros contaminantes).

Se conocen una variedad de técnicas para la producción y el procesamiento de virus auxiliares, incluyendo adenovirus (p.ej., centrifugación en CsCl, así como otras técnicas tales como las descritas en el documento WO

96/27677). El virus auxiliar producido utilizando tales técnicas se puede emplear entonces en la producción de vectores de rAAV según se describe en el presente documento.

5 Las siguientes secciones describen, con fines de ilustración, técnicas que pueden emplearse para la producción de adenovirus, aunque en el estado de la técnica se conocen otras técnicas y pueden emplearse en el presente documento.

(i) Virus auxiliares anteriores

10 El virus auxiliar, tal como Ad5, se puede producir fácilmente infectando células de mamífero (p.ej., células humanas). En los ejemplos ilustrativos descritos más abajo, las células crecen en medios y recipientes de cultivo adecuados para el crecimiento de la célula huésped, se concentran antes de la infección y luego se infectan con virus auxiliar (p.ej., a una MOI de 1-5) con agitación suave. Después de la infección, las células pueden resuspenderse en medio reciente e incubarse durante un periodo de tiempo adicional (típicamente aproximadamente 2 días) para permitir la replicación y empaquetamiento del virus auxiliar. Después de la incubación, las células pueden recolectarse y lisarse para liberar el virus auxiliar. Después de la lisis, se trata preferiblemente el lisado celular con una nucleasa para degradar el ácido nucleico libre (p.ej., ácido nucleico celular) sin degradar el ácido nucleico que está encapsidado en partículas víricas. El lisado puede clarificarse (p.ej., mediante filtración y/o centrifugación) y puede someterse también a técnicas de purificación adicionales para purificar y concentrar el virus auxiliar en la preparación según se describe e ilustra más abajo.

20 Como ejemplo ilustrativo de dicho proceso, las células pueden crecer en medios a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/mL en un recipiente tal como un matraz spinner. Después de la incubación, las células pueden concentrarse entonces a aproximadamente  $10^7$  células/mL e infectarse con Ad5 a 1-2 unidades infecciosas/célula con agitación suave. Las células pueden resuspenderse entonces en medio a aproximadamente  $10^6$  células/mL y dejarse produciendo virus durante un periodo de incubación de aproximadamente 2 días. Las células pueden recolectarse entonces, resuspenderse en medio o tampón (p.ej., a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/mL) y luego disgregarse, p.ej. mediante lisis mecánica tal como pasar a través de un microfluidificador a 8000 psi o técnica equivalente (p.ej., congelación-descongelación o sonicación). El lisado puede tratarse con una nucleasa (p.ej., benzonasa) durante 1 hora a 37 °C. El lisado puede clarificarse a través de un filtro, tal como un filtro de 1,0  $\mu\text{m}$ , o mediante centrifugación. Más abajo se describen adicionalmente técnicas análogas y modificaciones de las mismas.

35 (ii) Virus auxiliares posteriores

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

40 A modo de ilustración, el filtrado de adenovirus según se describe anteriormente puede cargarse en una resina de intercambio aniónico, tal como una resina de amino o imino con carga en N (p.ej., POROS 50 PI, o cualquier resina basada en DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria o PEI) en una columna de cromatografía equilibrada con tampón (tal como TMEG, también designado en el presente documento como tampón de cromatografía A: Tris 50 mM (pH 8,0),  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EDTA 1 mM, 5% de glicerol).

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

50 El pico de adenovirus puede identificarse en las fracciones mediante un ensayo de infectividad o mediante una hibridación de ácido nucleico o inmunoensayo, según se ha descrito en la literatura. El pico puede esterilizarse por filtración a través de un filtro estéril de 0,2  $\mu\text{m}$ . Opcionalmente, el pico puede concentrarse mediante filtración de flujo tangencial, por ejemplo en una unidad Filtron Ultrasette o Millipore Pellicon. El pico o concentrado puede diafiltrarse en este sistema en un tampón adecuado, tal como PBS + 5% de sacarosa. Alternativamente, el adenovirus puede dejarse en el tampón de elución. El producto de adenovirus final puede esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y almacenarse para su uso. Según se describe e ilustra en el presente documento, puede emplearse también un virus auxiliar termosensible (tal como un adenovirus termosensible).

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

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

65 Como con los virus auxiliares, es conveniente con fines de ilustración dividir el examen de la producción y purificación de AAV en fases de proceso "anteriores" y "posteriores", designando el proceso "anterior" generalmente la producción de AAV en células huéspedes adecuadas y la liberación o retirada del virus de las células para

producir una preparación de AAV “bruta”. El procesamiento “posterior” puede emplearse para purificar el preparado de AAV (p.ej., para aislar el AAV de proteínas celulares y/u otros contaminantes).

5 En aspectos preferidos de la presente invención, se realiza el procesamiento anterior y posterior de AAV de una manera diseñada para reducir sustancialmente y/o eliminar las proteínas celulares contaminantes, así como cualquier virus auxiliar contaminante (p.ej. Ad) o proteínas de virus auxiliar, cualquiera de las cuales podría contribuir a la provocación de una respuesta inmunitaria si estuvieran presentes a niveles sustanciales en el preparado final de vector de rAAV a usar para transferencia génica.

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

(i) Procesamiento anterior de AAV

15 El vector de AAV puede producirse 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 provector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y un virus auxiliar para AAV (p.ej., un adenovirus). Estos componentes pueden introducirse en la célula en una variedad de configuraciones, según se describe más arriba y se ilustra más abajo. Puesto que el AAV se puede replicar y empaquetar en una variedad de células de mamífero, hay un gran número de líneas celulares que pueden modificarse y emplearse para la producción de AAV.

25 A modo de ilustración, el vector de AAV puede producirse 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 y de propiedad común con la presente de Targeted Genetics Corporation, J. Allen et al., WO 96/17947), que se ha modificado por ingeniería genética para contener un constructo de *rep* y/o *cap*, así como un constructo de vector. Opcionalmente, se puede transfectar una línea celular tal como C12 o c137 que contiene un constructo de *rep* y/o uno de *cap* con un plásmido que contiene un constructo de vector tal como ptgAAV-CF. O puede transfectarse una célula con un plásmido que contiene *rep* y *cap*, tal como pRS5, así como un plásmido que contiene un constructo de vector. La célula puede infectarse con adenovirus o transfectarse con ADN que contiene genes de adenovirus.

35 Puede generarse una variedad de dichas células “productoras” de AAV, según se describe en las referencias citadas en el presente documento y en la literatura.

Las células productoras de AAV pueden cultivarse condiciones (incluyendo medios, temperatura y similares) que son generalmente adecuadas para el crecimiento de células de mamífero, y que son generalmente también permisivas de replicación de AAV. Por ejemplo, se prefiere el medio de suspensión DMEM/F12 para el crecimiento de células y se prefiere el medio DMEM solo para la producción de vector de AAV. Según se conoce en la materia, algunos tipos celulares y líneas celulares tienden a ser dependientes de unión, mientras que otros son capaces de crecimiento en suspensión y muchas células dependientes de unión pueden “adaptarse” también al crecimiento en suspensión mediante ciclado de las células en condiciones de suspensión como medio para enriquecer en y seleccionar en última instancia variantes que sean capaces de crecimiento en suspensión. Por consiguiente, el cultivo de células para la producción de AAV puede realizarse en cualquiera de una variedad de recipientes, dependiendo en parte de si la línea productora seleccionada es relativamente dependiente de unión o está adaptada a suspensión. Dichos recipientes para el crecimiento de células dependientes de unión incluyen, por ejemplo, matraces de cultivo tisular, botellas roller, microportadores y biorreactores (tales como biorreactores de fibra hueca, de lecho empaquetado o lecho fluidificado). Los recipientes para líneas celulares de mamífero adaptadas a suspensión incluyen, por ejemplo, matraces spinner, tanques de reacción y fermentadores de levantamiento por aire.

50 La replicación de AAV transcurre durante un periodo de tiempo así como hasta un punto del ciclo de crecimiento en que la producción vírica es óptima, preferiblemente con crecimiento logarítmico de medio a tardío (típicamente de uno a tres días), tras lo cual las células pueden recolectarse y lisarse para liberar el virus de progenie. Por ejemplo, las células se pueden resuspender en medios de crecimiento a aproximadamente  $1-10 \times 10^6$  células/mL, y dejar producir durante 48 horas. Entonces se pueden recolectar las células (p.ej., mediante centrifugación) y resuspender en tampón (p.ej., TMEG (o “tampón de cromatografía A”): Tris 50 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, 5% de glicerol) a aproximadamente  $1-10 \times 10^6$  células/mL.

60 El AAV puede replicar a un alto número de copias (p.ej.,  $10^5-10^6$  genomas/célula) en células transducidas si las proteínas Rep de AAV y funciones de virus auxiliar necesarias se proporcionan con relativa simultaneidad. Si se proporcionan también proteínas Cap, las partículas de AAV se ensamblan en el núcleo de las células infectadas, donde tienden a ensamblarse en matrices cristalinas. La primera etapa en la recuperación de producto es por lo tanto la disgregación celular. Aunque pueden usarse congelación-descongelación y/o sonicación para disgregar las células (como con adenovirus), dichas técnicas no son muy adecuadas para la preparación a gran escala. Es por tanto preferible a este respecto la lisis mecánica, usando técnicas tales como microfluidificación. Pueden emplearse también detergentes y otros agentes químicos para mediar o facilitar la lisis. Se ha encontrado que el tratamiento de

lisados con nucleasas (tales como benzonasa) es provechoso para reducir la viscosidad y mejorar la filtrabilidad. La clarificación, por ejemplo mediante microfiltración para separar el vector de al menos una porción del desecho celular, es también provechosa para promover la recuperación y la purificación.

5 A modo de ilustración, las células pueden lisarse mecánicamente después del periodo de incubación mediante pasada secuencial a través de un microfluidificador (típicamente aproximadamente a 8000 psi usando dos pasadas). Otras técnicas empleadas comúnmente incluyen ciclos de congelación-descongelación y sonicación, como es conocido en el estado de la técnica. El lisado puede tratarse también con una nucleasa para degradar el ácido nucleico (tal como ácido nucleico celular o vírico) que no está eficazmente “protegido” gracias a estar empaquetado en una partícula vírica. Se emplea típicamente digestión con benzonasa durante aproximadamente 1 hora a 37 °C. También se puede clarificar el lisado. Los procedimientos para clarificación incluyen paso a través de un filtro, tal como un filtro de 1,0 µm, y centrifugación.

15 Se puede emplear beneficiosamente la filtración de flujo tangencial (TFF) para procesar y recolectar grandes volúmenes de células. La TFF puede usarse para perfundir, concentrar y recolectar células animales. Por ejemplo, la TFF puede usarse para procesar células en condiciones de flujo laminar a tasas de cizallamiento de pared medias de hasta 3000 por segundo (ver, p.ej., Maiorella, B., et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 37:121-126, 1991). La concentración a gran escala de virus usando ultrafiltración TFF se ha descrito por R. Paul et al. *Human Gene Therapy*, 4:609-615, 1993.

20 Se describen más abajo marchas de producción ilustrativas que emplean dichas técnicas.

#### (ii) Procesamiento posterior de AAV

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

35 Hemos descubierto una combinación de procedimientos que son tanto escalables como notablemente eficaces para la generación de preparaciones de AAV que están sustancialmente exentas de partículas de virus auxiliares, así como de proteínas de virus auxiliares y celulares y otros de tales contaminantes. Nuestra combinación preferida de procedimientos emplea procedimientos cromatográficos de intercambio de iones, lo que contrasta con diversos procedimientos mencionados en la literatura para la purificación potencial de, p.ej., AAV o Ad. En particular, tales procedimientos según se describen en la literatura emplean típicamente un solo tipo de separación iónica, a veces en combinación con otras clases de procedimientos cromatográficos (ver, p.ej., K. Tamayose et al., *Human Gene Therapy* 7:507-513 (1996) y WO96/27677, 12 de septiembre de 1996). Sin embargo, en el caso de la producción de AAV, hemos encontrado que una combinación de cromatografía de intercambio iónico secuencial opuesto es particularmente eficaz para la generación de preparaciones de AAV que están sustancialmente exentas de partículas y proteínas de virus auxiliares, así como de proteínas celulares.

50 A la vista de estos descubrimientos, parece que el AAV no solo está “adaptado” tanto a la cromatografía de intercambio de aniones como de cationes, sino que dicha combinación de ambos intercambios iónicos opuestos es particularmente eficaz para eliminar todos los contaminantes diversos de partículas y proteínas que aparecen típicamente en la generación de preparados de vector de AAV. Se puede emplear cualquiera de una variedad de resinas de intercambio de cationes y de aniones junto con estos procedimientos, cuyas propiedades fundamentales son la disponibilidad de grupos cargados negativa y positivamente, respectivamente, con los que el AAV puede unirse al menos en cierto grado (lo más preferiblemente en un grado que difiere sustancialmente de la afinidad de unión relativa de uno o más de los contaminantes referidos más arriba, es decir partículas y proteínas de Ad, así como proteínas celulares de mamífero). Sin desear estar obligado por teoría alguna, se cree que la etapa de intercambio de aniones es particularmente eficaz para separar el AAV del adenovirus, mientras que se cree que ambas etapas (pero especialmente la etapa de intercambio de cationes) son particularmente eficaces para separar el AAV de las proteínas celulares. También hemos empleado intercambio de aniones seguido de filtración de flujo tangencial, según se describe e ilustra más abajo. Según se describe adicionalmente más abajo, hemos encontrado que las preparaciones de AAV pueden concentrarse considerablemente mediante cromatografía en sulfato de heparina.

65 A modo de ilustración, puede cargarse un lisado de AAV clarificado, según se describe más arriba, en una columna de intercambio de aniones cargada positivamente tal como una resina de amino o imino N-cargada (p.ej., POROS 50 PI o cualquier resina basada en DEAE, TMAE, amina terciaria o cuaternaria o 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 puede lavarse con un tampón (tal como el tampón de cromatografía A/TMEG). La columna puede eluirse con un gradiente de concentración creciente de NaCl y las fracciones pueden recogerse y ensayarse la presencia de AAV y/o contaminantes.

5 Se pueden usar otros procedimientos en lugar de o, preferiblemente, además de los procedimientos de intercambio de aniones y de cationes descritos más arriba, basados en asociaciones intermoleculares mediadas por rasgos distintos de la carga como se conoce en el estado de la técnica. Dichos otros procedimientos incluyen asociaciones intermoleculares basadas en pares de ligando-receptor (tales como interacciones anticuerpo-antígeno o lecitina-carbohidrato), así como separaciones basadas en otros atributos de las moléculas, tales como cromatografía de tamizado molecular basado en tamaño y/o forma. Por tomar un único ejemplo, se puede cargar el preparado de AAV filtrado o parcialmente purificado en una columna que contiene un anticuerpo específico de AAV. Esta columna puede unirse a AAV. La columna puede aclararse con tampón para retirar las proteínas contaminantes y eluirse entonces con un gradiente o etapa de concentración creciente de NaCl, y pueden recogerse las fracciones. Alternativamente, dicha columna puede eluirse con un tampón de pH diferente al del tampón de carga.

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

20 Este conjunto puede inyectarse en una columna de intercambio de aniones cargada positivamente y/o en una columna de intercambio de cationes cargada negativamente (tales como las consideradas más arriba). 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 pueden recogerse las fracciones. Los picos de AAV y adenovirus pueden identificarse en las fracciones mediante un ensayo de infectividad o mediante una hibridación de ácido nucleico o inmunoensayo. Los picos pueden agruparse basándose en los resultados de cualquiera de estos ensayos.

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

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

45 Una etapa adicional que puede emplearse para la retirada del adenovirus, si se desea, implica tratar el conjunto de eluyentes con una etapa de inactivación térmica (según se describe en el presente documento) y luego filtrarlo (p.ej., antes de someter la preparación a TFF). Sin embargo, hemos encontrado que el procedimiento de "intercambio de aniones a TFF" descrito más arriba daba como resultado una preparación de AAV que estaba exenta de adenovirus libres detectables y daba como resultado mejores rendimientos de AAV purificado.

Se describen más abajo marchas de producción ilustrativas que emplean dichas técnicas.

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

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

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

Para nuestra sorpresa, la reposición de estos aminoácidos agotados dio como resultado una brusca caída de la producción de AAV. Por ejemplo, en los experimentos descritos más abajo, suplementar el medio estándar (DMEM) con asp y glu adicionales reducía la eficacia de producción en más de un orden de magnitud (de aproximadamente 1800 partículas resistentes a DNasa (DRP) por célula a aproximadamente 140 DRP por célula), aunque se potenciaba ligeramente la viabilidad.

Otro componente común de los medios para el crecimiento de células productoras de mamífero es el componente sérico, tal como suero fetal bovino (FBS), que se incluye típicamente en los medios a un nivel de aproximadamente un 10%. Según se describe más abajo, cuando se aumentaba el nivel sérico para la producción de AAV (al 20%), la producción de vector de AAV caía más de 2 veces. En contraposición, cuando las células se sometían a niveles crecientemente menores de suero, la producción de vector de AAV aumentaba drásticamente. Por ejemplo, cuando los niveles de suero se reducían a un décimo de los niveles de partida normales (es decir al 1%), la producción de vector aumentaba en más de 4 veces.

Sin desear estar obligado por teoría alguna, parece ahora que estresar las células productoras, metabólicamente o por otros medios según se describen más abajo, puede potenciar drásticamente la producción de vector de AAV.

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

Según se ha observado más arriba, las células productoras pueden ser sometidas también a un estrés subletal alterando el pH. Según se ejemplifica a continuación, hemos encontrado que el estrés de pH inducido elevando el pH del medio no solo aumentaba el AAV, sino que causaba también un drástico desplazamiento de las proporciones relativas de AAV que se liberaban al medio de cultivo. Según se describe adicionalmente a continuación, esta técnica puede usarse por tanto para facilitar la purificación de AAV así como para potenciar la producción.

Se proporcionan más abajo procedimientos ilustrativos para optimizar la producción de AAV empleando diversas condiciones de estrés, así como resultados que demuestran que la aplicación de una variedad de diferentes condiciones de estrés se puede usar para potenciar eficazmente los niveles de producción de AAV.

#### Uso de rAAV para terapia génica

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

La terapia génica puede realizarse para potenciar el nivel de expresión de una proteína particular, ya sea dentro de una célula o secretada por ella. Los vectores descritos en este documento se pueden utilizar para alterar



genéticamente las células, ya sea para marcaje génico, reposición de un gen que falta o es defectivo o inserción de un gen terapéutico. Alternativamente, puede proporcionarse un polinucleótido a la célula que reduzca el nivel de expresión. Esto puede utilizarse para la supresión de un fenotipo indeseable, tal como el producto de un gen amplificado o sobreexpresado durante el transcurso de una malignidad, o un gen introducido o sobreexpresado durante el transcurso de una infección microbiana. Los niveles de expresión pueden reducirse suministrando un polinucleótido terapéutico que comprenda una secuencia capaz de formar, por ejemplo, un híbrido estable con el gen diana o transcrito de ARN (terapia anticodificante), capaz de actuar como ribozima para escindir el ARNm relevante o capaz de actuar como reclamo de un producto del gen diana.

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

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

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

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

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

La decisión de si usar terapia in vivo o ex vivo, y la selección de una composición, dosis y vía de administración

particular dependerá de una serie de diferentes factores incluyendo, pero sin limitación, los rasgos de la afección y el sujeto que se está tratando. La valoración de dichos rasgos y el diseño de un régimen terapéutico apropiado son en última instancia responsabilidad del facultativo que prescribe.

5 La descripción anterior proporciona, entre otros, procedimientos para generar preparados de título alto de vectores de AAV recombinante que están sustancialmente exentas de virus auxiliares (por ejemplo adenovirus) y de proteínas celulares. Se entiende que los expertos en la materia pueden aplicar variaciones a estos métodos sin abandonar el espíritu de la presente invención.

10 Los ejemplos presentados a continuación se proporcionan como guía adicional para un profesional de habilidad corriente en la materia y no se pretende que sean limitantes en modo alguno.

## EJEMPLOS

### 15 EJEMPLO 1

Producción ilustrativa de vector de AAV recombinante utilizando un virus auxiliar de tipo natural (Ad5) y un virus auxiliar termosensible (Ad ts149)

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

25 El plásmido ptgAAVCF consiste en la ITR de AAV2 izquierda; un cDNA regulador transmembrana de fibrosis quística completo; una secuencia de poliadenilación sintética basada en la secuencia de poliadenilación  $\beta$ -globina de ratón; secuencias de AAV2 secuencia abajo de las secuencias de codificación de *cap*; y la ITR de AAV2 derecha en un esqueleto de plásmido pBR322 (Afione et al., 1996). El plásmido de empaquetamiento pGEM-RS5 se derivó del plásmido pHIV *rep* (Antoni et al., 1991) y consiste en las regiones U3 y R de LTR de VIH-1; las regiones *rep* y *cap* de AAV2 incluyendo los promotores p19 y p40; secuencias de plásmidos pBR322 y pGEM para replicación y selección bacteriana; y una pequeña región de ADN celular repetitivo Alu humano secuencia arriba de la LTR de VIH.

El adenovirus de tipo 5 se cultivó a partir de una disolución madre obtenida de la American Type Culture Collection (Rockville, Md). El Ad5ts149 (Ensinger et al., J. Virol. 10:328,1972) se obtuvo de Harold S. Ginsberg.

35 Se produjeron disoluciones madre de trabajo de Ad5 y Ad5ts149 (ts149) a 37 °C y 32 °C, respectivamente, infectando células 293-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y 1, respectivamente. Después de 4 horas, se volvieron a alimentar los cultivos con medio reciente y se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con 10% de CO<sub>2</sub>. Después de 72 horas, se retiraron las células, se compactaron a 1000 g a 15 °C y se resuspendieron en PBS que contenía MgCl<sub>2</sub> 0,1 g/L y CaCl<sub>2</sub> 0,1 g/L. Se congeló y descongeló entonces la suspensión celular tres veces, se cizalló tres veces a través de una aguja de calibre 18 y se clarificó mediante centrifugación a 1000 g a 15 °C. El lisado clarificado se trató entonces con DNasa I a una concentración final de 2 mg/mL durante 30 minutos a 37 °C. El lisado tratado se depositó en capas sobre un gradiente de etapa discontinua de CsCl en agua que comprendía 4,0 mL de CsCl (1,25 g/cm<sup>3</sup>) en una capa sobre 2,0 mL de CsCl (1,40 g/cm<sup>3</sup>) en agua y se centrifugó a 35.000 rpm durante 1 a 2 horas en un rotor Beckman SW41. Se retiró la banda de adenovirus de cada tubo, se agrupó, se diluyó en CsCl a 1,35 g/cm<sup>3</sup> en agua y se centrifugó durante una noche a 35.000 rpm en un rotor Beckman SW55. Se agrupó la banda de adenovirus, se ajustó a 10% de glicerol y se dializó extensamente frente a tampón Tris 10 mM a pH 7,5 suplementado con MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM y 10% de glicerol.

50 Se mantuvieron células 293-1 (ATCC CRL 1573) en matraces de cultivo tisular en una incubadora humidificada con 10% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM rico en glucosa (JRH) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Hyclone). Para este ejemplo, se inocularon las células 293-1 a 4,4 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo de tejido con DMEM suplementado con 10% de FBS y L-glutamina 2,0 mM y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una incubadora humidificada con 10% de CO<sub>2</sub>.

55 Se infectaron entonces las células (aproximadamente 10<sup>7</sup> células por matraz) con disoluciones madre de trabajo de Ad5 o ts149 durante 1 hora a una MOI de 5, seguido de la transfección transitoria de plásmidos de vector y de empaquetamiento. Se efectuó la cotransfección transitoria de plásmido del vector ptgAAVCF y plásmido del auxiliar pGEM-RS5 utilizando LIPOFECTAMINE™ (Gibco). En ese proceso, se mezclaron 37,5 µg de cada plásmido junto con 150 µl de LIPOFECTAMINE™ y se diluyeron en 4,75 mL de MEM exento de suero. Se retiró el inóculo de adenovirus y la mezcla de plásmido-LIPOFECTAMINE™ se añadió a las células y se incubó durante 4 horas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a la temperatura apropiada. Se retiró la mezcla de plásmido-LIPOFECTAMINE™ del cultivo después de 4 horas y se reemplazó por medio reciente.

65 Se cultivaron células infectadas con virus de tipo natural a 37 °C y se incubaron células infectadas con Adts149 a 39,5 °C. Después de 72 horas, se recolectaron las células, se compactaron y se resuspendieron en Tris 10 mM a pH 7,5. La suspensión se lisó entonces mediante sonicación en un baño de agua y hielo usando un sonicador de copa y

husillo de Branson utilizando 4 pulsos de 15 segundos y se ensayó el rAAVCF y la producción de adenovirus.

## EJEMPLO 2

### 5 Cuantificación de los títulos de rAAV y de adenovirus en preparados de vector

Se ensayó en lisados celulares del ejemplo precedente la producción del vector rAAVCF mediante el ensayo de replicación de C37 y se analizó la producción de adenovirus mediante hibridación slot-blot.

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

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

35 Se realizó el ensayo de slot blot de ADN de adenovirus como sigue. Se desnaturalizaron alícuotas de muestras en NaOH 0,4 M, EDTA 10 mM con ADN de esperma de salmón 1,0 µg/mL a 65 °C. Se diluyeron muestras y patrones de adenovirus y se filtraron por membranas de nailon utilizando un colector de slot blot y se lavaron con NaOH 0,4 M. Se hibridó el filtro con una sonda marcada con <sup>32</sup>P correspondiente a la secuencia del gen E1A de adenovirus. El genoma de Ad5 completo está disponible en Genbank con el número de acceso X02996. Utilizamos un fragmento de SspI-XbaI de 1 kb (correspondiente a los nucleótidos 339-1339) y analizamos las manchas en un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Se consideró que un equivalente genómico era equivalente a una partícula de adenovirus.

45 La Figura 1 muestra los resultados del ensayo de replicación del vector de rAAVCF en lisados preparados con Ad5 o ts149 a temperaturas permisivas (37 °C) y no permisivas (39,5 °C). La producción de vector recombinante se apoyó con ts149 a 39,5 °C, pero la productividad fue de aproximadamente 2 a 3 veces menor que con Ad5.

La Figura 2 muestra los resultados del ensayo de slot blot para determinar la cantidad de adenovirus. La producción de genomas de adenovirus se redujo 3-4 unidades logarítmicas por el uso de mutante termosensible en comparación con el de tipo natural.

## 50 EJEMPLO 3

Optimización de la función auxiliar para mejorar la producción de rAAV

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

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

65 La Figura 3 muestra los resultados del ensayo de replicación de rAAVCF realizado en lisados celulares preparados con ts149 a diversas MOI. Aumentar la MOI de ts149 no recuperó la productividad de vector a los niveles

observados con Ad5 (según muestra la intensidad de la banda de hibridación de 1,4 kb). Sin embargo, se observó un mayor nivel de producción de vector en el punto temporal de 96 horas. La concentración de ts149 en el lisado detectada por el análisis de slot blot aumentó al aumentar la MOI, pero siguió siendo de 3 a 4 unidades logarítmicas menor en comparación con Ad5.

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

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

El siguiente ejemplo se aporta únicamente con fines de referencia y no forma parte de la invención.

#### EJEMPLO 4

Ensayo de títulos víricos y técnicas de ensayo de alto rendimiento

Las disoluciones madre de adenovirus termosensibles y de tipo natural usadas en los ejemplos precedentes se produjeron en células 293-1 en matraces de cultivo tisular. En este ejemplo, los niveles de adenovirus producidos por células 293-1 se cuantificaron mediante el ensayo de punto final TCID<sub>50</sub> o ensayo de infectividad.

El ensayo de TCID<sub>50</sub> se realizó como sigue: se sembraron  $1,0 \times 10^3$  células 293-1 en placas de microtitulación de 96 pocillos, se infectaron con diluciones en serie de disolución madre de adenovirus y se dejaron incubar a 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se inocularon 8 duplicados de 100 µl de cada dilución en las células. Tres días después de la infección, se fijaron las células con metanol, se lavaron con PBS y se tiñeron con anticuerpo anti-hexón conjugado con FITC (Biosign) seguido de tinción con yoduro de propidio para visualizar los núcleos celulares. Después de aclarar con PBS, se examinó la placa con microscopio fluorescente y se puntuó la presencia de células que contienen hexones. Se calculó el título en el punto final usando una distribución de Poisson. Una dilución de virus que proporciona un 50% de muestras de duplicados positivos de hexones tiene 0,5 UI/100 µl de inóculo. El título infeccioso es el producto de la inversa de esta dilución, 0,5 UI/100 µl y 10 (factor de conversión a mL), dando el título infeccioso final por mL.

Se realizó un ensayo de infectividad por microtitulación de alto rendimiento para medir los virus infecciosos como sigue. Se inocularon alícuotas (10 µl) de sobrenadantes exentos de células diluidos en serie en células HeLa crecidas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 3 días, se trataron las células infectadas y se lisaron con una disolución de desnaturalización (adición de un décimo de volumen de NaOH 4,0 M, ADN de esperma de salmón 10 µg/mL y EDTA 100 mM). Se transfirió el lisado a una placa Silent Monitor BiodyneB (Pall) y se filtró a vacío en membrana de nailon. Se lavó la membrana, se desnaturalizó, se hibridó con un fragmento de restricción de cADN de E1A de adenovirus marcado con <sup>32</sup>P y se analizó en un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Se usó el análisis de regresión lineal de patrones de adenovirus diluidos en serie para calcular los títulos de adenovirus infecciosos en las muestras, usando patrones de adenovirus titulados por el ensayo de TCID<sub>50</sub>.

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

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

| TABLA 1: Producción de adenovirus |               |                                      |                                 |
|-----------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Adenovirus                        | Línea celular | Productividad específica (UI/célula) | Ensayo                          |
|                                   | 293-1         | 10                                   | Microtitulación de infectividad |

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

- 5 Un preparado de virus Ad5 de título conocido mostró un intervalo lineal que se extendía de 12,5 a 500 UI/pocillo basándose en la regresión lineal en el ensayo de microtitulación de infectividad.

10 Combinar un ensayo de infectividad vírica con un formato de matriz de microtitulación según se describe más arriba dio como resultado una técnica que es tanto rápida como cuantitativa, y que es altamente adecuada para automatización.

15 El ensayo de infectividad de alto rendimiento descrito más arriba puede aplicarse también al ensayo de otros virus (p.ej., rAAV y wtAAV). El ensayo puede efectuarse esencialmente según se describe más arriba usando células de mamífero apropiadas (p.ej., células C37 de HeLa para rAAV o células 293 para wtAAV) y en condiciones permisivas para la replicación del virus a ensayar (p.ej., en presencia de virus auxiliar de rAAV y wtAAV); y entonces se pueden preparar los lisados y se pueden transferir los ácidos nucleicos de dichos lisados a una membrana según se describe más arriba. La hibridación de la membrana que contiene la matriz de conjuntos de ácidos nucleicos unidos (estando liberado cada conjunto de las células del correspondiente pocillo de cultivo) se efectúa típicamente con una sonda específica de virus adecuada (p.ej., una sonda específica de *rep* y/o *cap* de AAV podría usarse para detectar wtAAV o una sonda específica de un transgén insertado podría usarse en el caso de un vector de AAV recombinante).

25 El ensayo de infectividad de alto rendimiento anteriormente descrito exhibía una respuesta lineal en la determinación de los títulos de rAAV en un intervalo relativamente amplio de concentraciones. Por ejemplo, cuando se hicieron diluciones 1:2 en serie de una preparación vírica de título conocido (determinado mediante un ensayo de centro infeccioso modificado), partiendo de 2400 unidades infecciosas o "UI/pocillo", y se usó como patrón para la determinación del título de dos preparaciones de tgAAVCF purificado de título desconocido, cada una de las cuales estaba diluida en serie 1:5, el ensayo de microtitulación mostró un intervalo lineal que se extendía de 75 a 600 UI/pocillo basándose en la regresión lineal. La determinación del título de wtAAV empleó preferiblemente un formato de dilución limitante (p.ej., cuando se ensayaron ocho diluciones limitantes en serie de un preparado de wtAAV de título conocido, el título determinado por el ensayo de microtitulación fue esencialmente el mismo que el determinado por el ensayo de TCID<sub>50</sub> estándar,  $3 \times 10^9$  UI/mL).

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

45 El siguiente ejemplo se aporta únicamente con fines de referencia y no forma parte de la invención.

### 50 Ejemplo 5

Desarrollo de cultivos de suspensión para producir virus auxiliares

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

60 N3S de 293 y S3 de HeLa son variantes en suspensión de las líneas celulares de riñón embrionario humano 293-1 y carcinoma epitelioide humano HeLa respectivamente. Se efectuó el cultivo en suspensión en matraces spinner de 500 mL (Bellco) con volúmenes de trabajo de 250 a 300 mL. Las células S3 de HeLa (ATCC 2.2-CCL) se

mantuvieron en DMEM/F-12 con HEPES 15 mM suplementado con 7,5% de FBS y L-glutamina 2,0 mM. Las N3S de 293-1 (Microbix Biosystems Inc.) se sometieron a pases con Joklik MEM suplementado con 7,5% de FBS y L-glutamina 2,0 mM. Se agitaron los matraces spinner a 50-65 rpm.

5 Se evaluó el rendimiento del crecimiento en el siguiente experimento. Se sometieron N3S de 293 y S3 de HeLa en serie a pases en suspensión en matraces spinner de 500 mL duplicados y se monitorizó el crecimiento y viabilidad celular. Se inocularon los matraces a densidades celulares de 2 a  $5 \times 10^5$  células/mL y se cultivaron entonces durante 2 a 3 días. Para controlar las diferencias de densidad de siembra, se compararon los niveles de duplicación de población (PDLs) para los cultivos duplicados. El PDL medio fue de  $2,0 \pm 0,49$  (media de SD) y de  $1,1 \pm 0,62$  para  
10 S3 de HeLa y N3S de 293, respectivamente (n= 14). Se observaron consistentemente duplicaciones celulares mayores con las células S3 de HeLa. La morfología celular en suspensión era drásticamente diferente para las dos líneas. Las células HeLa crecieron como células individuales o agregados pequeños. En contraposición, las células N3S de 293 formaban agregados grandes de 50 a 100 células cada uno. Se observaron números significativos de células no viables en el centro de las grandes agrupaciones. Se subcultivaron las disoluciones madre mediante centrifugación seguida de disgregación suave con una pipeta, liberando las células no viables de los agregados. Las viabilidades de cultivo iniciales de N3S de 293 eran consistentemente menores en comparación con S3 de HeLa.

Basándose en el crecimiento, viabilidad y morfología celular en suspensión, se seleccionó la línea celular S3 de HeLa para un desarrollo adicional del proceso. Se evaluaron crecimiento y viabilidad a temperaturas permisivas. Se sembraron células S3 de HeLa en matraces spinner de 500 mL a  $5 \times 10^5$  células/mL y se monitorizaron diariamente durante 7 días.

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

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

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

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

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

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

La Figura 7 muestra la producción de ts149 por cultivos de células S3 de HeLa. Se muestreó diariamente el cultivo y se prepararon lisados mediante congelación-descongelación para análisis de la producción vírica por el ensayo de infectividad de adenovirus. La producción de virus alcanzó  $\sim 4,5 \times 10^7$  UI/mL de cultivo aproximadamente el día 3-5. El día 7, se recogieron las células mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón TMEG y se lisaron mediante microfluidificación (MF). El título infeccioso del lisado microfluidificado fue comparable a los de la muestra de lisado congelada-descongelada, indicando que la recuperación mediante microfluidificación era comparable a los procedimientos de congelación-descongelación.

El siguiente ejemplo se aporta únicamente con fines de referencia y no forma parte de la invención.

## EJEMPLO 6

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

La purificación mediante gradientes de CsCl es costosa para la producción a gran escala. Este ejemplo ilustra la purificación de ts149 mediante cromatografía de intercambio iónico.

Se efectuó la cromatografía en una estación de trabajo de cromatografía Perseptive Biosystem BIOCAD™. La resina usada era un intercambiador de aniones débil de polietilenimina (PI) (POROS™ 50 PI). Se equilibró la columna con TMEG (Tris 50 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, 5% de glicerol). Se monitorizó pH, conductividad y densidad óptica a 280 nm de la cromatografía en línea.

Se recolectó la suspensión de S3 de HeLa infectada con ts149 a una MOI de 2 y se centrifugó. Se resuspendió el sedimento en TMEG y se lisó mediante cavitación a 3000 PSI usando un microfluidificador (Microfluidics). Se clarificó el lisado mediante filtración a través de un filtro de jeringuilla de 5 µm (Millex SV) seguida de un filtro de jeringuilla de 0,45 µm (Acrodisc). Se cargó el lisado clarificado en una columna de intercambio de aniones POROS™ 50 PI de 1,6 mL procesada a 1 mL/min. Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de TMEG con NaCl 900 mM y se eluyó el ts149 con un gradiente lineal de NaCl 900 a 1300 mM. Se recogieron fracciones de 0,5 mL y se ensayó mediante el ensayo de infectividad y slot blot la presencia de adenovirus.

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

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

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

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

Este tipo de enfoque es inherentemente escalable y adaptable a las Buenas Prácticas de Fabricación actuales.

Se proporcionan a continuación ilustraciones ejemplares adicionales de dichas técnicas.

El siguiente ejemplo se aporta únicamente con fines de referencia y no forma parte de la invención.

#### EJEMPLO 7

5

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

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

10

En un proceso ejemplar “de primera generación” para la producción de virus auxiliar, se cultivaron células de mamífero en 40 matraces T225 y luego se infectaron con Ad5 a una MOI de aproximadamente 1. Después de incubar, se recolectaron las células mediante centrifugación y se lisaron mediante congelación-descongelación y pase a través de una aguja. Se sometió el lisado a tratamiento con DNasa I y se procesó entonces en un gradiente de etapas de CsCl y un gradiente isopícnico. El material purificado se dializó y se esterilizó por filtración.

15

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

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

20

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

25

30

Usando este proceso de segunda generación, obtuvimos aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  partículas (o aprox.  $5 \times 10^{12}$  unidades infecciosas) a partir de  $1 \times 10^{10}$  células.

La **Figura 9** ilustra los resultados del procesamiento posterior de virus auxiliar utilizando cromatografía de intercambio de aniones según se describe más arriba. Barras: actividad vírica medida en un ensayo de infectividad; línea continua:  $A_{280}$ ; línea de puntos: conductividad del tampón (mS).

35

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

#### Ejemplo 8

40

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

##### A. Producción y procesamiento de rAAV ilustrativos de primera generación

45

En un proceso ejemplar “de primera generación” para la producción de vector de rAAV, se cultivaron células de mamífero en 40 matraces T225 y luego se infectaron con Ad5 a una MOI de aproximadamente 5. Después de incubar, se recolectaron las células mediante centrifugación y se lisaron mediante sonicación. Se sometió el lisado a tratamiento con DNasa 1 y se procesó entonces en una serie de dos gradientes de CsCl. Se dializó el material purificado y se esterilizó por filtración. Usando este proceso de primera generación, obtuvimos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades replicativas URs a partir de  $4 \times 10^8$  células.

50

##### B. Producción y procesamiento de rAAV ilustrativos de segunda generación

55

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

60

La Figura 10 muestra los resultados del fraccionamiento secuencial en columnas de intercambio iónico: en primer lugar, en una matriz de intercambio de aniones (panel superior) y luego en una matriz de intercambio de cationes (panel inferior). Barras: actividad vírica medida en un ensayo de infectividad para adenovirus o AAV; línea continua:

65



A<sub>280</sub> (una medida de la proteína total); línea de puntos: conductividad del tampón (mS). Como resulta evidente por las fracciones analizadas, es posible obtener niveles extremadamente altos de separación entre AAV y adenovirus, así como entre AAV y material absorbente de A280 (mayormente proteínas) utilizando las técnicas de la presente invención. En particular, los resultados revelaron que los vectores de AAV pueden retenerse tanto en columnas de intercambio de aniones como de cationes y que la elución diferencial de AAV usando intercambio tanto de aniones como de cationes daba como resultado una capacidad potenciada drásticamente de separar AAV de todos los contaminantes principales de interés (incluyendo adenovirus así como proteínas celulares).

En otro proceso ejemplar de segunda generación para la producción de vector de rAAV, se preparó el filtrado según se describe más arriba y se procesó entonces en una columna de intercambio de aniones, seguida de agrupamiento de las fracciones eluyentes que contienen AAV, y se sometieron entonces los eluyentes de intercambio de aniones agrupados a filtración de flujo tangencial (TFF). Según se describe a continuación, se encontró que este procedimiento de intercambio de aniones a TFF daba como resultado un preparado altamente concentrado y purificado de AAV.

Un análisis detallado del AAV obtenido usando dicha tecnología de segunda generación, usando técnicas según se describen más arriba y en el estado de la técnica (incluyendo ensayos de infectividad, análisis de slot blot y electroforesis en gel con SDS) proporcionó la confirmación adicional de que el material era de alta calidad y estaba sustancialmente exento de partículas adenovíricas contaminantes (y proteína y ADN de adenovirus) y también sustancialmente exento de proteínas y ADN celulares contaminantes. Los geles de SDS revelaron la presencia de bandas correspondientes a VP1, VP2 y VP3 (es decir, las proteínas de cápside de AAV). No eran visibles otras bandas después de tinción con Coomassie. Estos datos son consistentes con los resultados de los análisis de fraccionamiento de columna según se muestra en las Figuras 10-11.

Como procedimiento de intercambio de aniones a TFF ilustrativo, el siguiente es un proceso de purificación y concentración ejemplar que parte de un litro de fracciones agrupadas de cromatografía de intercambio de aniones. Si se desea (según se observa más arriba), este conjunto puede someterse a inactivación térmica seguida de una etapa de filtración (p.ej., utilizando un filtro de 0,22 µm). Para la filtración de flujo tangencial (TFF), empleamos un sistema Pellicon XL esterilizado equipado con una membrana de corte de peso molecular de 300.000 que funcionaba a 40/0 para presiones de entrada y salida. Se cargó un litro de material agrupado en el sistema a un volumen de 500 mL y se concentró entonces a 250 mL. Se efectuó la diafiltración con 5 diavolúmenes (1250 mL) de disolución de Ringer modificada + 5% de glicerol. Después de la diafiltración, se concentró el retenido a un volumen final de 14 mL. El tiempo de proceso total fue de aproximadamente 3,25 horas (no incluyendo el tiempo de esterilización). Los geles de SDS teñidos con plata, los slot blot y los ensayos de infectividad confirmaron que la preparación de AAV (que contenía aproximadamente 10<sup>10</sup> unidades replicativas) estaba sustancialmente exenta de adenovirus contaminantes así como de proteínas adenovíricas y celulares.

Los siguientes son resultados de dicho procedimiento que muestran el título vírico infeccioso y total como UR (unidades replicantes) y DRP (partículas resistentes a DNasa) respectivamente:

| TFF DE 300K               | Volumen | UR totales             | DRP totales            | P/I  | % de UR | % de DRP |
|---------------------------|---------|------------------------|------------------------|------|---------|----------|
| Conjunto de entrada       | 1000 mL | 8,9 x 10 <sup>10</sup> | 3,1 x 10 <sup>14</sup> | 3483 | 100     | 100      |
| Producto bruto purificado | 12,5 mL | 7,3 x 10 <sup>10</sup> | 2,3 x 10 <sup>14</sup> | 3103 | 82      | 74       |

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

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

Se detallan en la siguiente tabla medios ejemplares para el crecimiento de adenovirus auxiliar y para preparar rAAV:

TABLA 2:

|  | <u>Medio Ad</u> | <u>Medio rAAV</u> |
|--|-----------------|-------------------|
| <b>SALES INORGÁNICAS</b>                             |                 |                   |
| CaCl   | 116,61          |                   |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 0,00125         | 0,00125           |
| Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O | 0,05            | 0,05              |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0,417           | 0,417             |
| KCl  | 311,8           | 311,8             |
| MgCl <sub>2</sub>                                    | 28,61           |                   |
| MgSO <sub>4</sub>                                    | 48,84           |                   |
| NaCl   | *               | *                 |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 2200            | 2200              |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O   | 62,5            | 62,5              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 71,02           | 71,02             |
| Zn <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O   | 0,4315          | 0,4315            |
| <b>Otros componentes</b>                             |                 |                   |
| Glucosa  | 4500            | 4500              |
| HEPES  | 3575            | 3575              |
| Hipoxantina Na                                       | 2,39            | 2,39              |
| Ácido linoleico                                      | 0,042           | 0,042             |
| Ácido lipoico  | 0,105           | 0,105             |
| Rojo fenol, sal sódica                               |                 |                   |
| Putrescina·2HCL                                      | 0,081           | 0,081             |
| Piruvato de sodio                                    | 55              | 55                |
| Poliol Pluronic F-68                                 | 100             | 100               |
| <b>Aminoácidos</b>                                   |                 |                   |
| L- Alanina   | 4,455           | 4,455             |
| L-Arginina·HCL                                       | 273,9           | 273,9             |
| L-Asparagina·H <sub>2</sub> O                        | 22,5            | 22,5              |
| L-Aspártico  | 19,95           | 19,95             |
| L-Cisteina·HCL·H <sub>2</sub> O                      | 17,56           | 17,56             |
| L-Cistina·2HCL                                       | 52,29           | 52,29             |
| Ácido L-Glutámico                                    | 22,05           | 22,05             |
| L-Glutamina  | 657             | 657               |
| Glicina  | 26,25           | 26,25             |
| L-Histidina·HCL·H <sub>2</sub> O                     | 73,48           | 73,48             |
| L-Isoleucina   | 106,97          | 106,97            |
| L-Leucina  | 111,45          | 111,45            |
| L-Lysina·HCL   | 163,75          | 163,75            |
| L-Metionina  | 32,34           | 32,34             |

|   | <u>Medio Ad</u> | <u>Medio rAAV</u> |
|---|-----------------|-------------------|
| L-Fenilalanina  | 68,48           | 68,48             |
| L-Prolina   | 17,25           | 17,25             |
| L-Serina  | 36,75           | 36,75             |
| L-Treonina  | 101,05          | 101,05            |
| L-Triptófano  | 19,22           | 19,22             |
| L-Tirosina  | 91,79           | 91,79             |
| L-Valina  | 99,65           | 99,65             |
| <b>Vitaminas</b>  |                 |                   |
| d-Biotina   | 0,00365         | 0,00365           |
| D-Pantotenato de Ca   | 2,24            | 1,00              |
| Colina Cloruro  | 8,98            | 8,98              |
| Ácido Fólico  | 2,65            | 2,65              |
| mio-inositol  | 12,6            | 12,6              |
| Niacinamida   | 2,0185          | 2,0185            |
| Piridoxal·HCL   | 2               | 2                 |
| Piridoxina·HCL  | 0,031           | 0,031             |
| Riboflavina   | 0,219           | 0,219             |
| Tiamina·HCL   | 2,17            | 2,17              |
| Timidina  | 0,365           | 0,365             |
| Vitamina B12  | 0,68            | 0,68              |
|   |                 |                   |
| * añadir una cantidad apropiada de NaCl para osmolalidad a 300 mOsm (+ o - 20 mOsm) |                 |                   |

### C. Purificación de vector de AAV utilizando cromatografía de sulfato de heparina

5 Según se examina más arriba, las técnicas cromatográficas pueden emplearse para purificar adicionalmente y concentrar preparaciones de AAV de acuerdo con la presente invención. A modo de ilustración, un preparado de AAV que está en forma bruta (p.ej. lisado) o que se ha eluido de una columna de intercambio de aniones o intercambio de cationes y/o concentrado mediante filtración de flujo tangencial puede purificarse mediante unión con una columna que comprende sulfato de heparina. El AAV puede eluirse entonces de dicha columna usando un tampón que contiene una sal (p.ej., un gradiente lineal de NaCl).

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

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

### EJEMPLO 9

#### Producción y ensayo de vector de AAV recombinante

25 En otro grupo de rutinas de producción, se usaron  $3-4 \times 10^9$  células cultivadas en una Cell Factory, usando DMEM + 10% FBS como medio de cultivo. Se infectaron las células con Ad a una MOI de aproximadamente 20 y se recolectaron a las 72 horas después de la infección. Se suspendieron las células recolectadas en TMEG + NaCl a una concentración de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/mL. Después de lisis mecánica (microfluidificación, 2 pases

a 8000 psi), se trataron los lisados con benzonasa (25 unidades/mL, 37 °C, 1 hora) y se filtraron entonces a través de un filtro de 5 µm (Pall Profile II).

5 Como columna de intercambio de aniones ejemplar, se empleó la columna POROS 50 PI (disponible en Perseptive Biosystems). Brevemente, se cargó el filtrado en la columna en aproximadamente 100 mL y se eluyó con un gradiente de NaCl hasta 500 mM. Se determinaron (por ensayo de infectividad) las fracciones que contenían la mayoría del AAV, se recogieron y se agruparon (designado como "conjunto de PI").

10 Se diluyó entonces el conjunto de PI aproximadamente a 1:7 con TMEG, se cargó en una columna de 50 mL Toso Haas SP650C y se eluyó con un gradiente de NaCl hasta 500 mM. Se determinaron (por ensayo de infectividad) las fracciones que contenían la mayoría del AAV, se recogieron y se agruparon (designado como "conjunto de SP"). Se concentró el conjunto de SP usando un filtro Centriprep 10K y luego se esterilizó por pasada a través de un filtro de 0,2 µm.

15 Los resultados revelaron que el AAV recombinante estaba esencialmente exento de adenovirus infecciosos detectables (determinado por análisis de límite de detección con amplificación en serie en células 293 y ensayo de TCID<sub>50</sub>). La preparación estaba también esencialmente exenta de ADN de adenovirus (determinado por análisis de slot blot), esencialmente exenta de proteínas celulares (determinado por análisis de gel PAGE-SDS), de ADN celular (determinado por análisis de PCR) y estaba también esencialmente exenta de AAV de tipo fenotípicamente natural  
20 (determinado mediante amplificación en serie y análisis Southern).

El siguiente ejemplo se aporta únicamente con fines de referencia y no forma parte de la invención.

#### 25 EJEMPLO 10

Potenciación de la producción de AAV por estrés nutricional

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

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

Se inocularon células JL14 a aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/mL en biorreactores de 2 litros y se cultivaron en el medio de rAAV mostrado en la Tabla 2 en modo por lotes o por perfusión (usando filtración por flujo tangencial, día 1 a 0,4 volúmenes/día, días 2-3 a 1-2 vol./día, día 4 a 2 vol./día y día 5 a 4 vol./día). Se monitorizaron en los cultivos  
40 densidad celular, glucosa, lactato y aminoácidos usando técnicas estándares.

Los análisis revelaron que la densidad celular alcanzaba un máximo en el cultivo por lotes de  $1 \times 10^6$  células/mL el día 2 y en el cultivo por perfusión de  $8 \times 10^6$  células/mL el día 6. La glucosa no era limitante en ningún caso (>1 g/L) y el lactato no era inhibidor.  
45

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

TABLA 3:

50 Análisis de aminoácidos del medio de cultivo por LOTES  
(transcurso temporal- µmol/L)

|                 | PM  |  | Día 0 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 |
|-----------------|-----|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ácido aspártico | 133 |  | 96    | 10    | 4     | 9     | 7     |
| Treonina        | 119 |  | 687   | 644   | 606   | 552   | 533   |
| Serina          | 105 |  | 271   | 230   | 157   | 117   | 98    |
| Asparagina      | 132 |  | 130   | 113   | 96    | 68    | 69    |
| Ácido glutámico | 147 |  | 90    | 2     | 1     | 1     | 1     |
| Glutamina       | 146 |  | 3424  | 2987  | 2450  | 1989  | 1843  |
| Prolina         | 115 |  | 135   | 143   | 162   | 164   | 185   |
| Glicina         | 75  |  | 288   | 241   | 194   | 151   | 130   |
| Alanina         | 89  |  | 189   | 306   | 438   | 644   | 681   |
| Valina          | 117 |  | 692   | 631   | 518   | 417   | 342   |

|              |     |  |      |     |     |      |      |
|--------------|-----|--|------|-----|-----|------|------|
| Cistina      | 121 |  | 143  | 133 | 120 | 107  | 99   |
| Metionina    | 149 |  | 160  | 132 | 100 | 74   | 58   |
| Isoleucina   | 131 |  | 617  | 531 | 383 | 264  | 182  |
| Leucina      | 131 |  | 645  | 538 | 374 | 248  | 161  |
| Tirosina     | 181 |  | 407  | 379 | 355 | 329  | 315  |
| Fenilalanina | 165 |  | 323  | 289 | 259 | 231  | 214  |
| Triptófano   | 204 |  | 47   | 41  | 33  | 28   | 26   |
| Amoniaco     | 17  |  | 760  | 816 | 941 | 1021 | 1033 |
| Ornitina     |     |  | 71   | 89  | 110 | 128  | 144  |
| Lisina-HCl   |     |  | 572  | 521 | 463 | 415  | 384  |
| Histidina    | 155 |  | 276  | 257 | 243 | 229  | 211  |
| Arginina     | 174 |  | 1020 | 943 | 870 | 791  | 747  |

TABLA 4:

Análisis de aminoácidos del medio de cultivo por PERFUSIÓN  
(curso temporal-  $\mu\text{mol/l}$ )

5

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

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

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

15 Se incubó cada grupo a 37 °C durante 72 horas en un matraz spinner. Se recolectaron las células, se microfluidificaron dos veces a 8000 psi, se sometieron a benzonasa, se sembraron en un ensayo de infectividad, se recolectaron y sondearon.

20 Los resultados mostraron que el matraz spinner de control produjo 6,2 UR por célula. El matraz spinner suplementado con ácidos aspártico y glutámico produjo 0,94 UR por célula.

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

Se efectuaron ensayos adicionales usando una línea celular D6 derivada de HeLa que tiene un vector de rAAV integrado (ITR- (promotor de CMV) - (gen informador de  $\beta$ -gal) -ITR), así como copias de los genes *rep* y *cap* de AAV de tipo natural.

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

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

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

El siguiente ejemplo se aporta únicamente con fines de referencia y no forma parte de la invención.

#### EJEMPLO 11

Producción de vector de AAV recombinante bajo estrés sérico

Como ejemplo de la producción de rAAV bajo condiciones de estrés, hemos utilizado el estrés por suero reducido junto con técnicas según se describen anteriormente. Brevemente, se cultivaron células JL 14 en matraces spinner en DMEM modificado + 10% de FBS en modo de cultivo en serie continuo, y se dividieron cada 3-4 días. Se dispusieron las células del cultivo en suspensión en 16 dispositivos Cell Factory de Nunc de 10 apilamientos, a  $3 \times 10^8$  células/Factory en una rotación de 3 a 4 días. El medio usado para crecimiento tenía una reducción de 10 veces del suero (es decir, DMEM + 1% de FBS), situando así las células bajo estrés sérico.

A las 24 horas después de la siembra, se retiró el medio en los dispositivos y se añadió medio reciente que contenía  $3 \times 10^9$  unidades de Ad/mL. Después de 72 horas de cultivo a 37 °C, se desalojaron las células de los dispositivos Factory golpeando suavemente, se recolectó el medio que contenía células se sedimentaron las células, se resuspendieron en TMEG + NaCl 100 mM y luego se lisaron mediante pase a través de un microfluidificador a 8000 psi. Se clarificó el lisado a través de un filtro de 5 µm y se cargó el lisado clarificado en una columna de intercambio de aniones de PI de 500 mL. Se eluyó la columna con un gradiente creciente de NaCl (hasta 500 mM) en tampón TMEG. Se recogieron las fracciones y se ensayaron usando un ensayo de clon 37 como se describe por Allen et al. (WO96/17947, supra). Se agruparon entonces las fracciones que contenían la mayoría del vector de AAV y se concentraron 10 veces usando un concentrador centrífugo Centriprep a 1000 x g durante 30 minutos. Se dializó el material concentrado frente a disolución salina equilibrada de Ringer con 5% de glicerol y se almacenó a -70 °C. Se ensayó el AAV mediante el ensayo de clon 37, así como mediante slot blot y PAGE-SDS. En el material puede ensayarse también la presencia de adenovirus, proteínas adenovíricas y ADN celular, así como otros contaminantes potenciales.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos usando células productoras GAK-0003 dispuestas en matraces T-225 a  $10^7$  células por matraz e inoculadas el día 2 con adenovirus DAB-003 a una MOI de 10. Se cultivaron diferentes matraces durante 72 horas a 37 °C en DMEM reciente que contenía un porcentaje diferente de FBS, según se muestra en la figura. El día 5, se recolectó cada matraz, se contaron las células, se resuspendieron, se sometieron a sonicación, a benzonasa y se sembraron para medir la producción de vector como anteriormente.

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

El siguiente ejemplo se aporta únicamente con fines de referencia y no forma parte de la invención.

#### EJEMPLO 12

Producción de vector de AAV recombinante bajo estrés de pH

Como ejemplo adicional de la producción de rAAV bajo condiciones de estrés, se usó el estrés de pH junto con técnicas según se describen más arriba. Brevemente, se cultivaron células productoras de AAV en biorreactores según se describe más arriba. Se infectaron entonces las células con Ad5 a una MOI de 10 y se inocularon en medios bajos en suero (como en el Ejemplo 11) en suspensión en biorreactores de 1,5 L. Se mantuvieron los cultivos a diversos niveles de pH elevados (de 7,2 a 8,0). Se monitorizaron entonces en los cultivos diariamente el número de células, viabilidad, consumo de glucosa, producción de lactato, pH, osmolaridad y producción de AAV. Según se muestra a continuación, hubo un aumento de la producción de AAV cuando el pH se elevó a 7,4, acoplado

con un aumento aún más drástico del número de partículas de AAV liberadas al sobrenadante (que aumentaba a medida que se elevaba el pH) :

| pH del cultivo | Partículas asociadas a células | Partículas sobrenadantes | Partículas totales | % asociadas a células | % en 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%               |

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

## REIVINDICACIONES

1. Un método de generación de una población de partículas de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) que comprende las etapas de:
- 5
- (a) incubar la célula productora de AAV en condiciones que sean permisivas para la replicación de AAV, donde dicha célula productora de AAV comprende:
- (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en el que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV;
- 10
- (ii) un provector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV; y
- 15
- (iii) un virus auxiliar de AAV;
- (b) lisar la célula productora después de la incubación de la etapa a) para producir un lisado de célula productora de AAV;
- 20
- (c) Cromatografiar el lisado de células productoras de AAV de la etapa b) mediante varias cromatografías de intercambio de iones que comprenden al menos una cromatografía positivamente cargada de intercambio de aniones y al menos una cromatografía negativamente cargada de intercambio de cationes, o cromatografiar el lisado de células productoras de AAV de la etapa b) por cromatografía de intercambio de aniones seguida de filtración de flujo tangencial para generar una población purificada de partículas de vector de rAAV.
- 25
2. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según la reivindicación 1, donde las células productoras de AAV se concentra antes de la lisis, opcionalmente mediante centrifugación o mediante filtración de flujo tangencial.
- 30
3. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicha etapa de lisis de la célula productora de AAV se realiza sometiendo la célula a una técnica lítica seleccionada de microfluidificación, sonicación y congelación-descongelación.
- 35
4. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el lisado de las células productoras de AAV de la etapa b):
- (i) se trata con una nucleasa, opcionalmente benzonasa, antes de la cromatografía; y/o
- 40
- (ii) se clarifica antes de la cromatografía, opcionalmente mediante filtración o centrifugación.
5. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las células productoras de AAV se concentran antes de la lisis, se resuspenden en un tampón que comprende disolución salina a una fuerza iónica de al menos la de una disolución de NaCl 50 mM, se lisan y luego se clarifican mediante filtración antes de la cromatografía.
- 45
6. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha cromatografía de intercambio de aniones se efectúa en una resina amino o imino N-cargada, opcionalmente seleccionada entre una resina POROS 50 PI, una resina de dietilaminoetilo (DEAE), una resina de trimetilaminoetilo (TMAE), una resina de amina cuaternaria y una resina de polietilenimina (PEI).
- 50
7. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha cromatografía de intercambio de cationes se efectúa en una resina catiónica basada en sulfo-, fósfo- o carboxilo, opcionalmente seleccionada de una resina de HS, una resina de SP y una resina de carboximetilo (CM).
- 55
8. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha etapa a) de incubación de la célula productora se realiza en un recipiente seleccionado de un matraz de cultivo tisular, una botella roller, un matraz spinner, un tanque de reacción, un fermentador tal como un fermentador de levantamiento por aire, un biorreactor tal como un biorreactor de fibra hueca, de lecho empaquetado o lecho fluidificado o un biorreactor multilecho, biorreactor multilecho en el que se aíslan al menos aproximadamente  $10^9$  unidades replicativas de rAAV por litro de volumen de biorreactor después de la etapa c).
- 60
9. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha etapa a) de incubación de la célula productora se realiza utilizando un microportador.
- 65



10. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha etapa a) de incubación de la célula productora se realiza en el medio de rAAV según se muestra en la Tabla 2.
- 5 11. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha etapa a) de incubación de la célula productora se realiza durante al menos 5 días.
12. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha población purificada de partículas de vector de rAAV está exenta de AAV competente para la replicación y de virus auxiliar y proteínas celulares.
- 10 13. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la elución de la cromatografía de intercambio de aniones y/o intercambio de cationes se realiza aumentando la concentración salina y los eluyentes cromatográficos que comprenden las partículas de rAAV se tratan posteriormente para reducir la concentración salina eficaz mediante dilución, diálisis, diafiltración o concentración.
- 15 14. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye la etapa de someter una fracción que comprende partículas de AAV a cromatografía de sulfato de heparina.
- 20 15. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho provector de rAAV comprende un polinucleótido no de AAV heterólogo flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR).
- 25 16. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha célula productora de AAV comprende al menos un gen de empaquetamiento de AAV que se integra establemente en el genoma de dicha célula productora de AAV y/o un gen rep de AAV y un gen cap de AAV que pueden estar integrados establemente en el genoma de dicha célula productora de AAV.
- 30 17. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho método comprende proporcionar dicha célula productora de AAV mediante un proceso que comprende:
- 35 (i) introducir el virus auxiliar en la célula productora que comprende el gen o genes de empaquetamiento de AAV y el provector de rAAV;
- (ii) introducir el provector de rAAV y el virus auxiliar simultánea o secuencialmente en la célula productora que comprende el gen o genes de empaquetamiento de AAV; o
- 40 (iii) introducir el gen o genes de empaquetamiento de AAV y el provector de rAAV simultánea o secuencialmente en la célula huésped que comprende el virus auxiliar.
- 45 18. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula productora se proporciona mediante un proceso que comprende introducir en la célula productora al menos un gen de división-empaquetamiento de AAV.
- 50 19. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho virus auxiliar es un adenovirus, un adenovirus termosensible o adenovirus Ad-ts149.
- 55 20. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho virus auxiliar es un virus auxiliar termosensible y dicha etapa de incubación de la célula productora se realiza a una temperatura que es permisiva para la replicación de AAV pero no permisiva para la replicación del virus auxiliar termosensible.
- 60 21. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula productora es una línea celular de mamífero dependiente de unión, una línea celular de mamífero adaptada a suspensión, una célula N3S de 293 o una célula S3 de HeLa.
- 65 22. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según la reivindicación 1, donde cromatografiar el lisado de células productoras de AAV de la etapa c) comprende una combinación de una cromatografía de intercambio de aniones cargada positivamente y una cromatografía de intercambio de cationes cargada negativamente para generar una población purificada de partículas de rAAV.
23. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según la reivindicación 22, donde dicha cromatografía de intercambio de aniones cargada positivamente se efectúa antes de dicha cromatografía de

intercambio de cationes cargada negativamente.

5 24. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según la reivindicación 22, donde dicha cromatografía de intercambio de cationes cargada negativamente se efectúa antes de dicha cromatografía de intercambio de aniones cargada positivamente.

10 25. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, que comprende adicionalmente la etapa de someter a cromatografía el lisado que contiene partículas de rAAV en sulfato de heparina, efectuándose dicha etapa después de dicha cromatografía de intercambio de aniones cargada positivamente y de dicha cromatografía de intercambio de cationes cargada negativamente.  
\*\*\*

15 26. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, que comprende adicionalmente la etapa de someter las células productoras a filtración de flujo tangencial tras al incubación de la etapa a), pero antes de la lisis de la etapa b).

20 27. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, donde dicha cromatografía de intercambio de aniones se efectúa en una resina de amino o imino N-cargada, opcionalmente seleccionada entre una resina POROS 50 PI, una resina de dietilaminoetilo (DEAE), una resina de trimetilaminoetilo (TMAE), una resina de amina cuaternaria y una resina de polietilenimina (PEI).

25 28. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, donde dicha cromatografía de intercambio de cationes se efectúa en una resina catiónica basada en sulfo-, fosfo- o carboxilo, opcionalmente seleccionada de una resina de sulfato de heparina (HS), una resina de sulfopropilo (SP) y una resina de carboximetilo (CM).

29. Un método de generación de una población de partículas de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, donde se utiliza cultivo de suspensión.

Figura 1

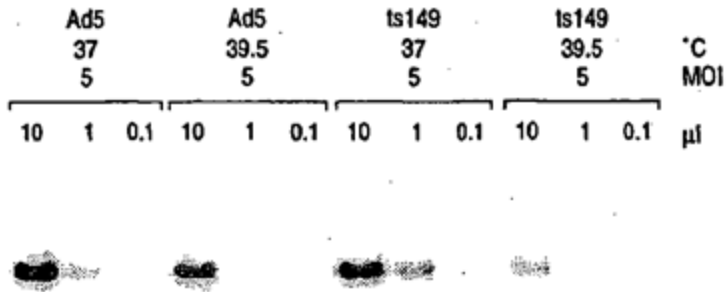


Figura 2

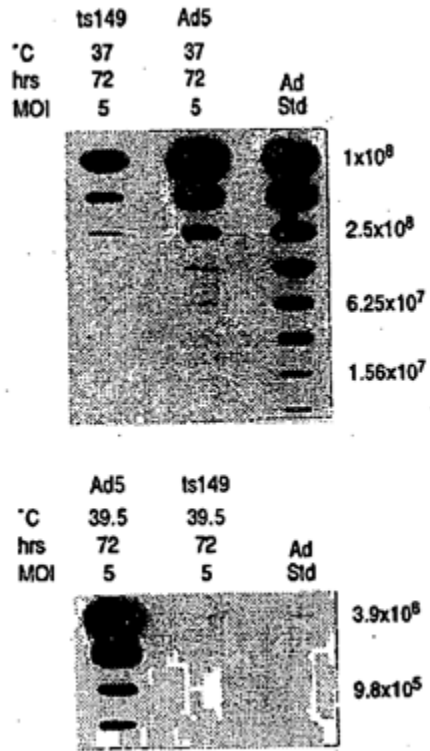


Figura 3

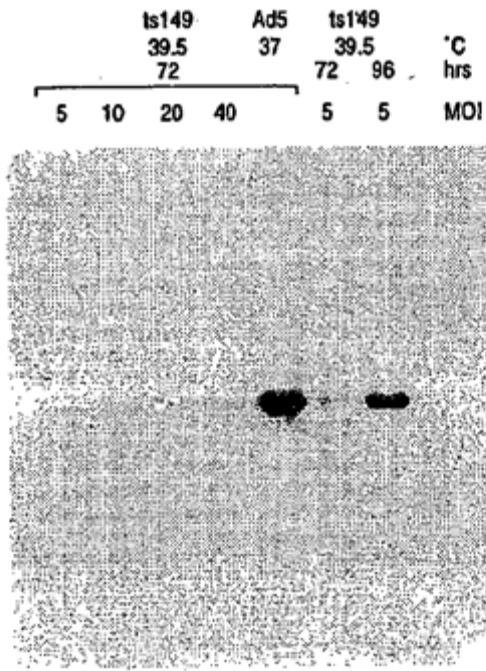


Figura 4

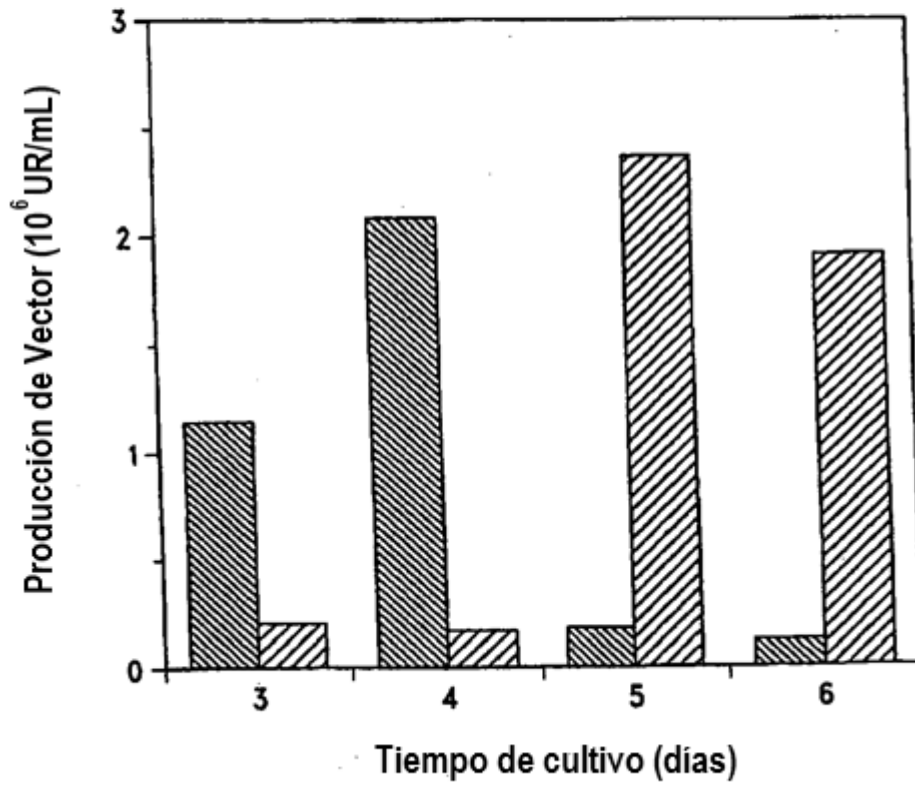


Figura 5

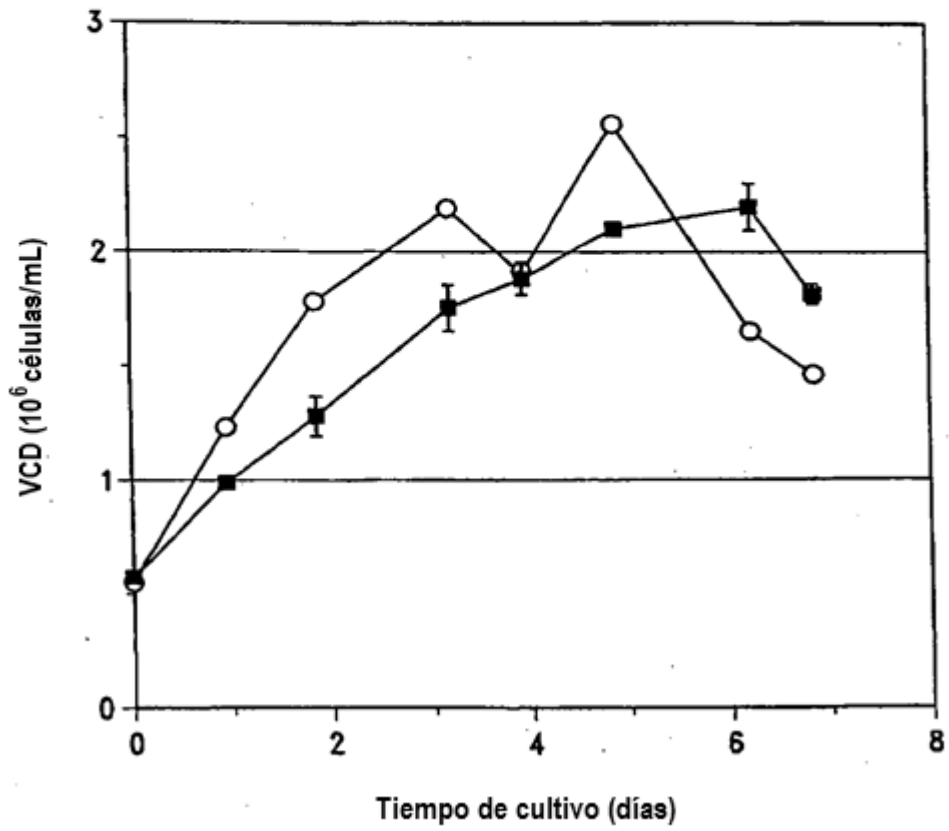


Figura 6

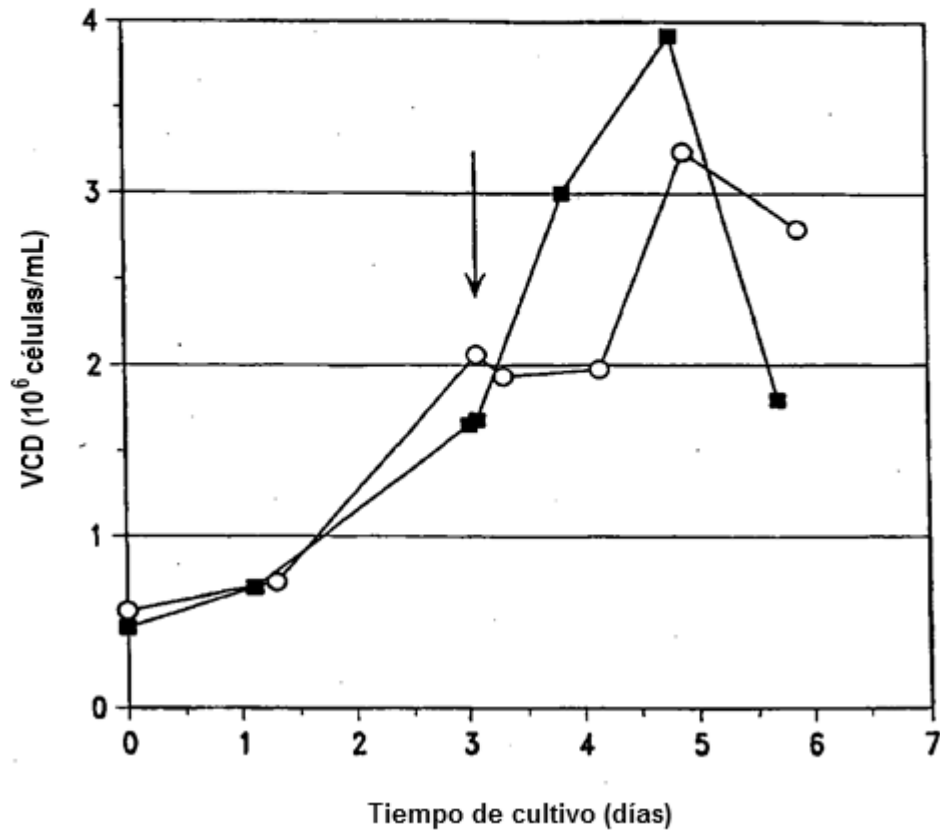




Figura 7

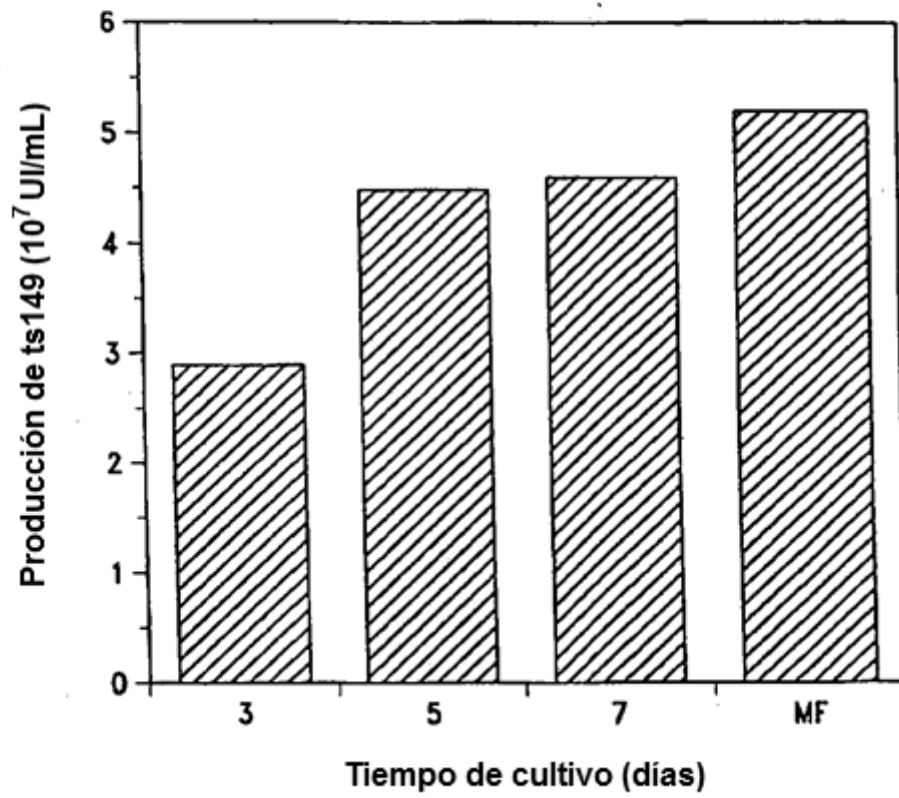


Figura 8A

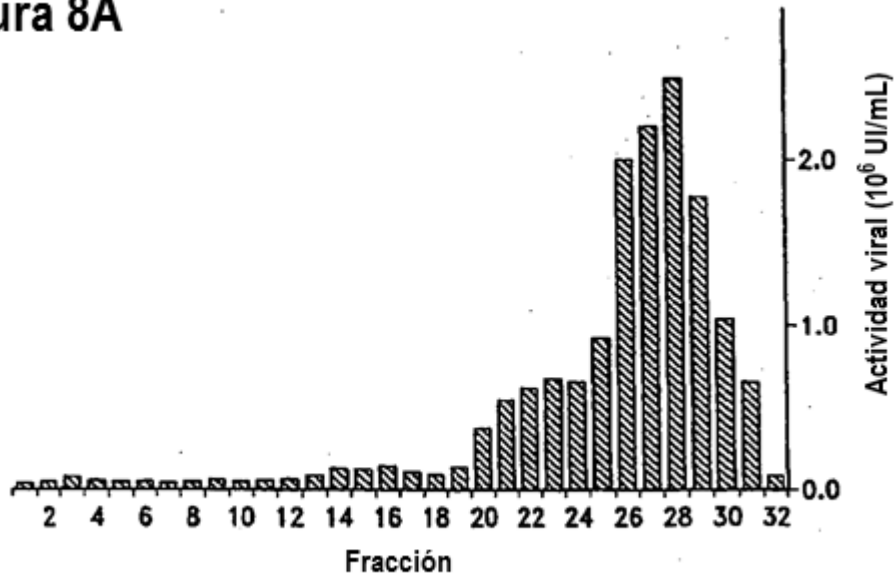


Figura 8B

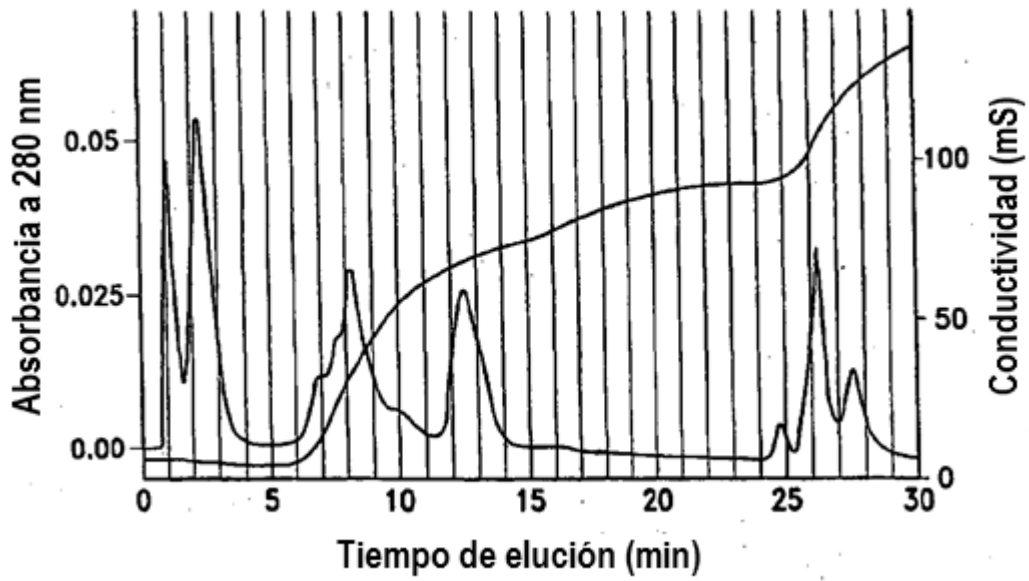


Figura 9

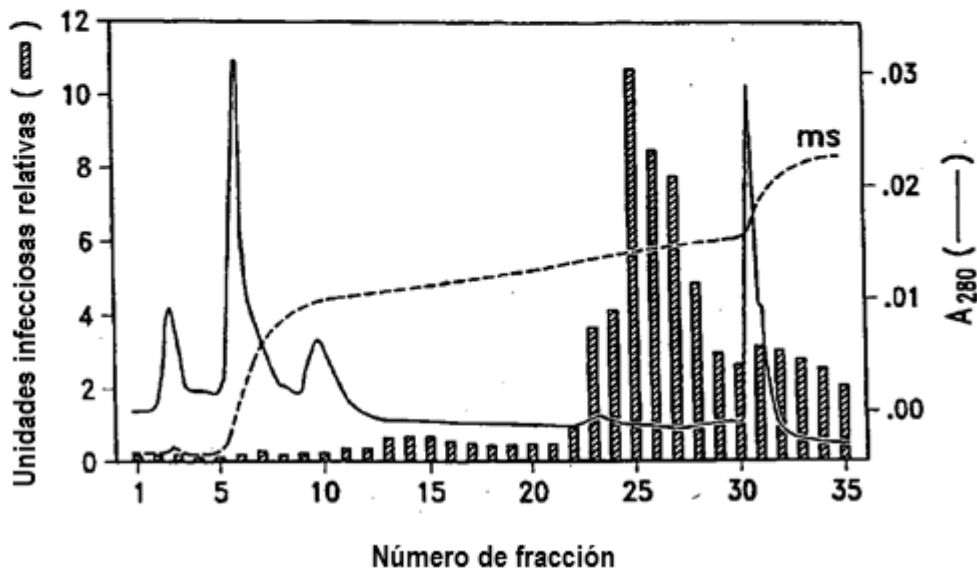


Figura 10A

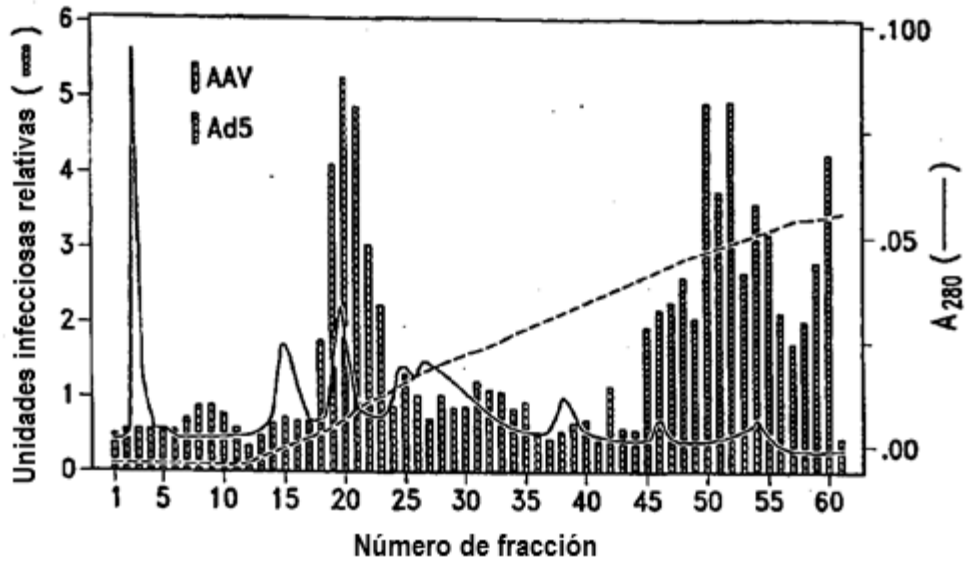


Figura 10B

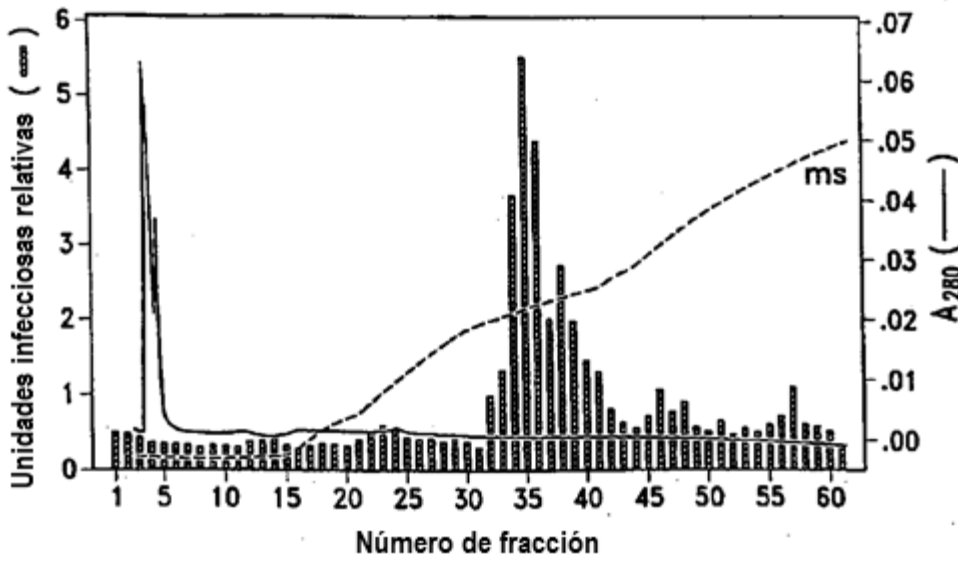


Figura 11A

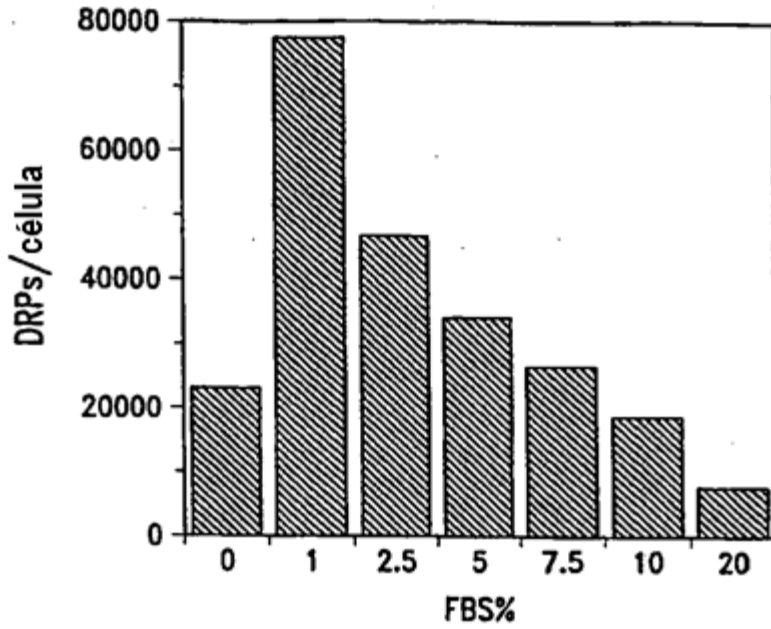


Figura 11B

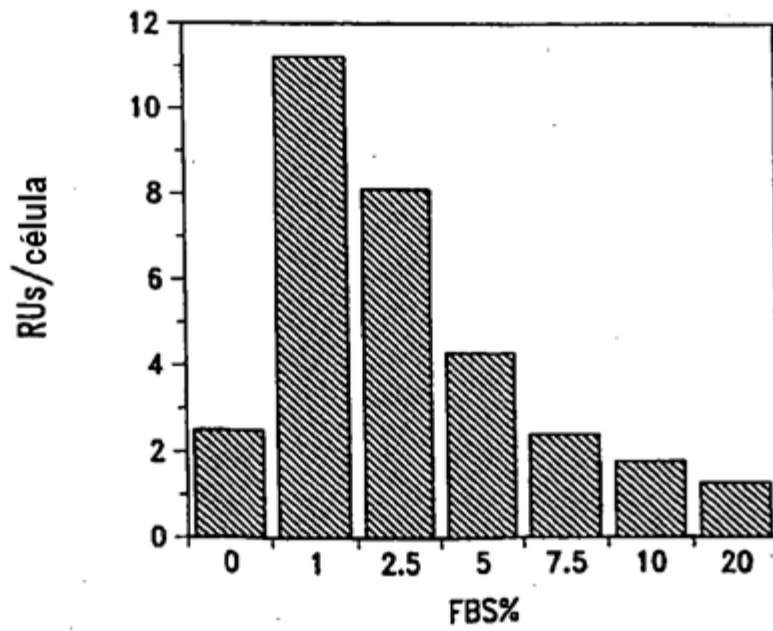


Figura 12

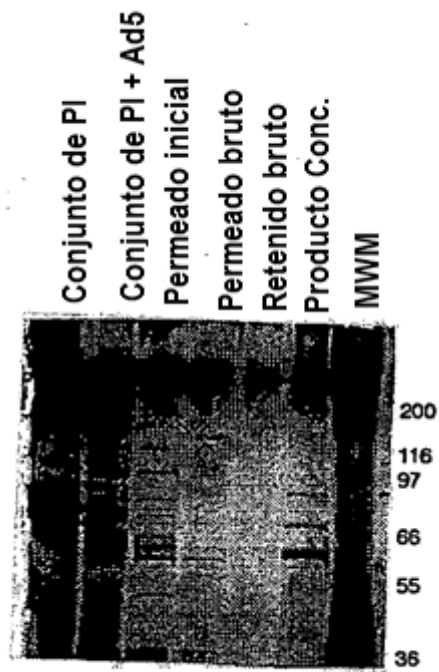


Figura 13

