

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 860**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/US2012/062101**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13063379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12842892 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2771455**

54 Título: **Línea celular para la producción de virus adenoasociado**

30 Prioridad:

28.10.2011 US 201161552492 P

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

24.04.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**GRIEGER, JOSHUA y
SAMULSKI, RICHARD JUDE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 609 860 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

Línea celular para la producción de virus adenoasociado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una línea celular HEK293 que crece en condiciones de suspensión libre de componentes animales. La línea celular es ideal para la producción rápida y que pueda cambiarse de escala de virus adenoasociados (VAA) y da sustento a la producción de todos los serotipos y quimeras del VAA.

10

Antecedentes de la invención

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (VAAr) han demostrado una transducción y expresión génica prolongada con poca a ninguna toxicidad e inflamación *in vivo*. Estas características exclusivas del VAA han conducido a su reconocimiento como un vector importante, candidato para aplicaciones en terapia génica. Se han realizado a nivel mundial diversos ensayos clínicos de Fase I y Fase II utilizando el VAA (Aucoin *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 26:73 (2008); Mueller *et al.*, *Gene Ther.* 15:858 (2008)). Sin embargo, muchos estudios preclínicos y ensayos clínicos satisfactorios han evidenciado diversos retos que necesitarán abordarse para sostener el uso de los VAAr en terapia génica humana (Mueller *et al.*, *Gene Ther.* 15:858 (2008)). Un reto importante es el establecimiento de tecnologías de fabricación a gran escala en conformidad con las buenas prácticas de fabricación actuales (cGMP, sigla del inglés: *current good manufacturing practices*) para producir las cantidades del vector purificado necesarias para la creciente necesidad clínica. El éxito en la generación de una tecnología de producción que pueda cambiarse de escala depende en gran medida de la comprensión de la biología básica del VAA con respecto a la generación de reactivos tales como líneas celulares, plásmidos o vectores víricos recombinantes, *etc.* que, cuando se utilicen juntos, imiten de forma precisa la producción del VAA del tipo silvestre.

25

El VAA se ha clasificado como un dependovirus en la familia de los Parvovirus debido a que requiere la coinfección con virus auxiliares tales como el adenovirus (Ad) o los virus del herpes simple (VHS) para la infección productiva en cultivo celular (Atchison *et al.*, *Science* 149:754 (1965); Buller *et al.*, *J. Virol.* 40:241 (1981)). Los parvovirus están entre los virus animales de ADN más pequeños, con un virión de aproximadamente 25 nm de diámetro compuesto en su totalidad de proteína y ADN. El genoma del VAA es una molécula de ADN monocatenaria lineal que contiene 4679 bases (Srivastava *et al.*, *J. Virol.* 45:555 (1983)). El genoma del VAA de tipo silvestre (ts) está compuesto de dos genes que codifican cuatro proteínas de replicación y tres proteínas de la cápside, respectivamente, y está flanqueado en cualquiera de los extremos por repeticiones terminales inversas (las ITR) (Lusby *et al.*, *J. Virol.* 4:402 (1980); Srivastava *et al.*, *J. Virol.* 45:555 (1983)). Las ITR son los únicos elementos que actúan en *cis* que son necesarios para la replicación del genoma y para el empaquetamiento en la cápside. Las cuatro proteínas de replicación (Rep 78, 68, 52 y 40) son multifuncionales y desempeñan un papel en la transcripción, en la replicación del ADN vírico y en el empaquetamiento del ADN en la cápside vírica preformada, dentro del núcleo de la célula infectada (Chejanovsky *et al.*, *Virology* 173:120 (1989); King *et al.*, *EMBO J.* 20:3282 (2001)). La cápside vírica está compuesta de las tres proteínas Vp1, Vp2 y Vp3 en una proporción de 1:1:8, respectivamente. Las proteínas de la cápside se producen de la misma fase de lectura abierta (ORF) pero utilizan distintos sitios de inicio de la transducción.

30

35

40

Debido a que las ITR son los únicos elementos que actúan en *cis*, que son necesarios para la replicación y para el empaquetamiento del genoma, los genes *rep* y *cap* pueden retirarse y clonarse en un plásmido distinto sin una pérdida de la función. Después, pueden clonarse entre las ITR un promotor y un gen de interés inducido por el promotor. Por lo tanto, cualquier gen que esté flanqueado por las ITR puede empaquetarse de forma eficaz en una cápside de VAA siempre y cuando el genoma tenga un tamaño más pequeño que 5,0 kb (Dong *et al.*, *Mol. Ther.* 18:87 (2010); Grieger *et al.*, *J. Virol.* 79:9933 (2005); Wu *et al.*, *Mol. Ther.* 18:80 (2010)). Sin embargo, el VAA carece aún de la capacidad de replicarse. Una de las características distintivas del VAA es la necesidad de coinfección con un virus auxiliar tal como Ad y VHS. La generación de VAAr solía requerir la transfección del vector y de las construcciones de empaquetamiento en células infectadas con Ad (Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97 (1992)). Durante de la coinfección con Ad o VHS, el VAA utiliza varios genes tempranos del virus auxiliar para facilitar su propia replicación. La infección del Ad en células productoras para generar VAAr fue eficaz en la producción de VAAr, pero una consecuencia era que también producía una sobreabundancia de partículas de Ad. La eliminación completa del Ad dependía de técnicas físicas tales como gradientes de CsCl, cromatografía en columna y una etapa de desnaturalización por calor para inactivar cualquier partícula de Ad residual que pudiera estar presente todavía. Aunque la mayoría de estos procedimientos ha tenido diversos grados de éxito, el potencial de contaminación con Ad es un riesgo no deseado y la presencia de proteínas del Ad desnaturalizadas es inaceptable para el uso clínico. Una mejora significativa en la evolución en la producción de VAAr fue la introducción de la transfección plasmídica triple (Xiao *et al.*, *J. Virol.* 72:2224 (1998)). Este método utilizaba una variación del plásmido de *rep* y *cap* así como del plásmido de las ITR, pero eliminó el uso de la infección con Ad. Las proteínas del Ad del ARN E1A, E1B, E4 y E2A y VA se clonaron en un único plásmido llamado XX680. El suministro de los genes del Ad auxiliar en el plásmido XX680 eliminó la producción de Ad en las células transfectadas, produciendo solo vector de VAAr. El método de triple transfección continúa como método de producción convencional en la mayoría de los laboratorios que experimentan con VAAr. Sin embargo, este método se ha limitado al uso de células adherentes.

50

55

60

65

En los últimos diez años se han realizado avances en la producción de VAAr que han permitido que varios laboratorios abandonen la producción utilizando células HEK293 adherentes y se aproximen a las tecnologías que puedan cambiarse de escala, tales como las tecnologías basadas en infección a través del uso de adenovirus recombinante (Gao *et al.*, *Mol. Ther.* 5:644 (2002); Gao *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 9:2353 (1998); Liu *et al.*, *Mol. Ther.* 2:394 (2000); Liu *et al.*, *Gene Ther.* 6:293 (1999); Tessier *et al.*, *J. Virol.* 75:375 (2001)), virus herpes simple (Booth *et al.*, *Gene Ther.* 11:829 (2004); Conway *et al.*, *Gene Ther.* 6:986 (1999); Hwang *et al.*, *Mol. Ther.* 7:S14 (2003); Kang *et al.*, *Gene Ther.* 16:229 (2009); Thomas *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 20:861 (2009)), el sistema de vector de expresión de baculovirus (SVEB) (Aslanidi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:5059 (2009); Cecchini *et al.*, *Gene Ther.* 15:823 (2008); Kohlbrenner *et al.*, *Mol. Ther.* 12:1217 (2005); Negrete *et al.*, *Meth. Mol. Biol.* 433:79 (2008); Negrete *et al.*, *J. Gene Med.* 9:938 (2007); Urabe *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 13:1935 (2002); Urabe *et al.*, *J. Virol.* 80:1874 (2006)) y la transfección transitoria de células HEK293 en suspensión (Durocher *et al.*, *J. Virol. Meth.* 144:32 (2007); Hildinger *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 29:1713 (2007); Park *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 94:416 (2006)). Park *et al.* y Durocher *et al.* demostraron que utilizando sus sistemas optimizados de producción en células HEK293 en suspensión sin suero se generaban aproximadamente $1,4 \times 10^4$ y 3×10^4 gv/célula, respectivamente. En estos estudios es común el hecho de que el rendimiento de vector continúa siendo el impedimento y significativamente por debajo de los gv/célula generados a través de la transfección de células HEK293 adherentes y del sistema de producción por VHSr.

La purificación por cloruro de cesio (CsCl) es todavía la forma más ampliamente utilizada de purificación de VAA (Grieger *et al.*, *Nat. Protoc.* 1:1412 (2006); Grieger *et al.*, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 99:119 (2005)). Los beneficios del uso de la purificación por CsCl son su relativo bajo costo, la compatibilidad para cualquier serotipo de VAA y la separación de partículas vacías de las que contienen genoma. Sin embargo, varias desventajas han devaluado este método para aplicaciones clínicas, incluyendo: (1) el tiempo y esfuerzo necesarios para identificar las fracciones que contienen virus dentro de múltiples realizaciones de purificaciones por gradientes de CsCl; (2) que el virus resultante contiene muchas impurezas además del cesio; (3) los impedimentos para el cambio de escala; y (4) numerosas etapas abiertas durante la purificación (Brument *et al.*, *Mol. Ther.* 6:678 (2002); Chahal *et al.*, *J. Virol. Meth.* 139:61 (2007); Hermens *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 10:1885 (1999); Kaludov *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 13:1235 (2002); Smith *et al.*, *J. Virol. Meth.* 114:115 (2003); Zolotukhin *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 16:551 (2005)). Los experimentos realizados por Hermens *et al.* y Zolotukhin *et al.* mostraron que un medio para gradiente de densidad llamado iodixanol era muy eficaz en el aislamiento del VAA2, después de una etapa adicional de purificación utilizando cromatografía de afinidad con heparina (Hermens *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 10:1885 (1999); Zolotukhin *et al.*, *Gene Ther.* 6:973 (1999); Zolotukhin *et al.*, *Methods* 28:158 (2002)). La advertencia acerca de este sistema era la incapacidad para purificar otros serotipos de VAA y que las cápsides quiméricas carecen de afinidad por el sulfato de heparina, regresando así la purificación del VAAr por CsCl. Ha habido varios otros intentos de purificación sin el uso de CsCl, incluyendo la manipulación de cápsides víricas con epítotos (Koerber *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 18:367 (2007)) y diversas formas de cromatografía (Brument *et al.*, *Mol. Ther.* 6:678 (2002); Chahal *et al.*, *J. Virol. Meth.* 139:61 (2007); Davidoff *et al.*, *J. Virol. Meth.* 121:209 (2004); Gao *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 11:2079 (2000); Hermens *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 10:1885 (1999); Kaludov *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 13:1235 (2002); Smith *et al.*, *J. Virol. Meth.* 114:115 (2003); Zolotukhin *et al.*, *Gene Ther.* 6:973 (1999); Zolotukhin *et al.*, *Methods* 28:158 (2002)). El uso de la cromatografía de intercambio iónico ha mostrado purificar de forma satisfactoria varios serotipos del VAA. Brument *et al.* y Davidoff *et al.* utilizaron un sistema de dos columnas para purificar los serotipos de VAA 2, 5 y 8 (Brument *et al.*, *Mol. Ther.* 6:678 (2002); Davidoff *et al.*, *J. Virol. Meth.* 121:209 (2004)). Zolotukhin *et al.* demostró que el uso de iodixanol, además del intercambio iónico utilizando una columna de Q-Sefarosa, tenía la capacidad de purificar los serotipos 1, 2 y 5 (Zolotukhin *et al.*, *Methods* 28:158 (2002)). Estos métodos se mostraron como muy promisorios en la purificación del VAA pero eran solo eficaces con los serotipos especificados. Todavía tiene que identificarse un método universal que pueda purificar todos los serotipos del VAA.

La presente invención proporciona una línea celular HEK293 que crece en condiciones de suspensión libre de componentes animales y que puede utilizarse en un sistema de producción de VAA que es rápido, puede cambiarse de escala, produce títulos elevados y funciona con todos los serotipos y quimeras de VAA.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al desarrollo de un procedimiento de fabricación que puede cambiarse de escala para vectores de VAA, que genera de forma eficaz vectores de VAA con elevado título, elevadamente puros y en grandes cantidades. El desarrollo del procedimiento incluyó la generación de una línea celular HEK293 que crece en condiciones de suspensión libre de componentes animales

Un aspecto de la invención se refiere a una célula HEK293 aislada depositada como ATCC No. PTA-13274.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de producción de partículas de VAA, que comprende: (a) proporcionar a las células HEK293 de la invención un sistema de expresión de VAA; (b) cultivar las células en condiciones en las que las partículas de VAA se produzcan y (c) de forma opcional aislar las partículas de VAA.

Estos y otros aspectos de la invención se exponen con más detalle en la descripción de la invención a continuación.

Breve descripción de los dibujos.

5 Las figuras 1A-1B muestran la optimización de las proporciones de plásmidos de la transfección triple y los volúmenes del cóctel de transfección. (A) Para determinar la proporción de plásmido óptima para la producción de vector de VAAr se exploraron proporciones variables de los plásmidos XX680, auxiliar de rep/cap de VAA y TR. (B) Para determinar las condiciones de transfección óptimas se probaron volúmenes variables de cóctel de transfección con una proporción de reactivo de transfección (químico o lipídico) con respecto a ADN de 2:1 y un tiempo de incubación. El volumen porcentual de cóctel de transfección es en referencia al porcentaje del volumen final del cultivo celular.

10 Las figuras 2A-2B muestran los experimentos de optimización de la densidad celular para la transfección y el impacto de la antigüedad del cultivo celular sobre la producción de vector. (A) Se transfectaron 1×10^6 y 2×10^6 células viables/ml con de 1 a 2 μg de ADN plasmídico (plásmido XX680: auxiliar de rep/cap de VAA:TR 2:1,5:1). (B) Se transfectaron células de pase bajo, medio y alto utilizando parámetros optimizados, para determinar si la antigüedad del cultivo celular influía en la eficacia de transfección y la producción de VAAr.

15 Las figuras 3A-3B ilustran la pureza de las fracciones del pico de elución de VAA después de la cromatografía en columna a través de tinción de plata y la microscopía electrónica de transmisión (MET) de tinción negativa.

20 Las figuras 4A-4B evidencian la producción y purificación de los serotipos de VAAr 1-6, 8 y 9 monocatenarios y autocomplementarios utilizando las condiciones de producción y purificación optimizadas. Para cada serotipo se transfectó un litro de cultivo celular en un matraz agitador. Se calcularon para cada serotipo los títulos de los lisados celulares y pospurificación, además de la proporción gv:UT, utilizando células HeLaRC32 (véanse los métodos). (A) Imagen de la tinción de plata de los serotipos 1-6, 8 y 9 monocatenarios pospurificación. (B) Transferencia de Southern de los VAAr1-6, 8 y 9 autocomplementarios. Se aislaron genomas de vector a partir de cada cápside de serotipo y se corrieron en un gel de agarosa alcalina.

25 La figura 5 muestra la tinción negativa de las imágenes por MET de los serotipos de VAAr 1-6, 8 y 9 monocatenarios y autocomplementarios. Se determinaron para cada serotipo las proporciones de las cápsides vacías con respecto a las llenas a base de las imágenes por MET de tinción negativa.

30 La figura 6 muestra las imágenes *in vivo* de ratones inyectados con 1×10^{11} gv de los vectores CBA-Luc de VAA6, 8, y 9. Los vectores CBA-Luciferasa (promotor de la beta actina de pollo-luciferasa) se administraron a cada ratón a través de inyección en la vena de la cola. Los vectores CBA-Luc generados a partir de células HEK293 en suspensión se purificaron a través de gradiente de densidad discontinuo/cromatografía en columna y los generados a partir de células HEK293 adherentes se purificaron a través de gradientes de densidad de CsCl. Se tomaron imágenes de los ratones (A) la semana y (B) al mes. Los ratones de control se inyectaron con PBS. El intervalo de fotones de VAA8 y 9 se estableció de 5×10^6 a 1×10^8 . Para VAA6 se estableció en de 5×10^4 a 1×10^6 . El tiempo de exposición fue de 1 minuto para VAA8 y 9, y 5 de minutos para VAA 6.

35 Las figuras 7A-7B muestran la concentración de los vectores VAAr monocatenarios y autocomplementarios por purificación. (A) Tinción negativa de imágenes de MET de vector VAAr preconcentrado y (B) vector VAAr posconcentrado.

40 La figura 8 muestra una línea de tiempo de la producción de vector VAAr utilizando células HEK293 en suspensión, cultivadas y transfectadas en matraces agitadores y en biorreactores por ondas.

45 La figura 9 muestra la producción y recogida continua de VAAr8 y VAAr9 a partir del medio del cultivo de HEK293 en suspensión. El rendimiento total representa los rendimientos de sedimento celular de todos los puntos de tiempo medios y a las 120 horas juntos. El control de sedimento celular de 48 horas representa el rendimiento a partir de una recogida convencional a las 48 horas postransfección, como se describe en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales se muestran las realizaciones preferentes de la invención. Sin embargo, esta invención puede realizarse de distintas formas y no debe considerarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan de forma que la presente divulgación sea exhaustiva y completa, y transmita completamente el ámbito de la invención a los expertos en la materia.

60 A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tiene el mismo significado como lo entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención en el presente documento tiene solo el objetivo de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitativa de la invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad.

Las secuencias de nucleótidos se presentan en el presente documento solo de forma monocatenaria, en dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, a menos que se indique otra cosa de forma específica. Los nucleótidos y aminoácidos se representan en el presente documento de la forma que recomienda la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB, o (para los aminoácidos) mediante ya sea el código de una letra o el código de tres letras, ambos en conformidad con 37 CFR §1.822 y el uso establecido. Véase, por ejemplo, el Manual del Usuario de PatentIn, 99-102 (Nov. de 1990) (Oficina de patentes y marcas de EE.UU.).

Salvo que se indique otra cosa, pueden utilizarse métodos convencionales conocidos para los expertos en la materia para la construcción de las construcciones VAAr, de los vectores de empaquetamiento que expresan las secuencias Rep y/o Cap del VAA y para transfectar de forma transitoria y estable las células de empaquetamiento. Tales técnicas son conocidas para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, SAMBROOK *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); AUSUBEL *et al.* CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Además, la presente invención también contempla que, en algunas realizaciones de la invención, pueda excluirse u omitirse cualquier característica o combinación de características expuestas en el presente documento.

Definiciones

En la descripción del presente documento y las reivindicaciones adjuntas se utilizan los siguientes términos:

Las formas singulares “un” y “una” se pretende que incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique de forma clara otra cosa.

Además, el término “aproximadamente”, como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible, tal como una cantidad de la longitud de la secuencia de un polinucleótido o polipéptido, la dosis, el tiempo, la temperatura y similares, se entiende que abarca variaciones del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, o incluso el 0,1 % de la cantidad especificada.

También, como se utiliza en el presente documento, “y/o” se refiere a y abarca cualquiera y todas las posibles combinaciones de uno o más de los puntos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (“o”).

Como se utiliza en el presente documento, la frase de transición “que consiste esencialmente en” se interpretará como que abarca los materiales o etapas mencionados “y aquellos que no afectan de forma material la característica (o características) básica y nueva” de la invención reivindicada (por ejemplo, la replicación de VAAr). Véase, *En re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); véase también MPEP § 2111.03. Por lo tanto, la expresión “que consiste esencialmente en”, como se utiliza en el presente documento, no debe interpretarse como equivalente de “que comprende”.

El término “parvovirus” como se utiliza en el presente documento abarca la familia *Parvoviridae*, incluyendo a los parvovirus y dependovirus que replican de forma autónoma. Los parvovirus autónomos incluyen miembros del género *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus* y *Contravirus*. Los parvovirus autónomos ejemplares incluyen, pero sin limitación, el virus diminuto del ratón, el parvovirus bovino, el parvovirus canino, el parvovirus del pollo, panleucopenia felina, el parvovirus felino, el parvovirus del ganso, el parvovirus H1, el parvovirus del pato de Berbería, el parvovirus de serpiente y el virus B19. Los expertos en la materia conocen otros parvovirus autónomos. Véase, por ejemplo, FIELDS *et al.* VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª edición, Lippincott-Raven Publishers).

El género *Dependovirus* contiene a los virus adenoasociados (VAA), que incluyen, pero sin limitación, el VAA tipo 1, VAA tipo 2, VAA tipo 3 (incluyendo los tipos 3A y 3B), VAA tipo 4, VAA tipo 5, VAA tipo 6, VAA tipo 7, VAA tipo 8, VAA tipo 9, VAA tipo 10, VAA tipo 11, VAA tipo 12, VAA tipo 13, el VAA aviar, el VAA bovino, el VAA canino, el VAA de cabra, el VAA de serpiente, el VAA equino y el VAA ovino. Véase, por ejemplo, FIELDS *et al.* VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª edición, Lippincott-Raven Publishers); y la Tabla 1.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “virus adenoasociado” (VAA) incluye, pero sin limitación, VAA tipo 1, VAA tipo 2, VAA tipo 3 (incluyendo los tipos 3A y 3B), VAA tipo 4, VAA tipo 5, VAA tipo 6, VAA tipo 7, VAA tipo 8, VAA tipo 9, VAA tipo 10, VAA tipo 11, VAA tipo 12, VAA tipo 13, VAA de serpiente, VAA aviar, VAA bovino, VAA canino, VAA equino, VAA ovino, VAA de cabra, VAA de camarón y cualquier VAA conocido o descubierto más tarde. Véase, por ejemplo, FIELDS *et al.* VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª edición, Lippincott-Raven Publishers). Se han identificado varios serotipos y clados de VAA relativamente nuevos (véase, por ejemplo, Gao *et al.*, J. Virol. 78:6381 (2004); Moris *et al.*, Virol. 33:375 (2004); y la Tabla 1).

Tabla 1

Genomas completos	Número de referencia GenBank		N.º de ref. GenBank		N.º de ref. GenBank
Virus adenoasociado 1	NC_002077, AF063497	Hu T88	AY695375	Hu42	AY530605
Virus adenoasociado 2	NC_001401	Hu T71	AY695374	Hu67	AY530627
Virus adenoasociado 3	NC_001729	Hu T70	AY695373	Hu40	AY530603
Virus adenoasociado 3B	NC-001863	Hu T40	AY695372	Hu41	AY530604
Virus adenoasociado 4	NC_001829	Hu T32	AY695371	Hu37	AY530600
Virus adenoasociado 5	Y18065, AF085716	Hu T17	AY695370	Rh40	AY530559
Virus adenoasociado 6	NC_001862	Hu LG15	AY695377	Rh2	AY243007
VAA aviar ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC 004828	Clado C		Bb1	AY243023
VAA aviar cepa de DA-1	NC_006263, AY629583	Hu9	AY530629	Bb2	AY243022
VAA bovino	NC_005889, AY388617	Hu10	AY530576	Rh10	AY243015
Clado A		Hu11	AY530577	Hu17	AY530582
VAA1	NC_002077, AF063497	Hu53	AY530615	Hu6	AY530621
VAA6	NC_001862	Hu55	AY530617	Rh25	AY530557
Hu.48	AY530611	Hu54	AY530616	Pi2	AY530554
Hu 43	AY530606	Hu7	AY530628	Pi1	AY530553
Hu 44	AY530607	Hu18	AY530583	Pi3	AY530555
Hu 46	AY530609	Hu15	AY530580	Rh57	AY530569
Clado B		Hu16	AY530581	Rh50	AY530563
Hu. 19	AY530584	Hu25	AY530591	Rh49	AY530562
Hu. 20	AY530586	Hu60	AY530622	Hu39	AY530601
Hu 23	AY530589	Ch5	AY243021	Rh58	AY530570
Hu22	AY530588	Hu3	AY530595	Rh61	AY530572
Hu24	AY530590	Hu1	AY530575	Rh52	AY530565
Hu21	AY530587	Hu4	AY530602	Rh53	AY530566
Hu27	AY530592	Hu2	AY530585	Rh51	AY530564
Hu28	AY530593	Hu61	AY530623	Rh64	AY530574
Hu 29	AY530594	Clado D		Rh43	AY530560
Hu63	AY530624	Rh62	AY530573	VAA8	AF513852
Hu64	AY530625	Rh48	AY530561	Rh8	AY242997
Hu13	AY530578	Rh54	AY530567	Rh1	AY530556
Hu56	AY530618	Rh55	A530568	Clado F	
Hu57	AY530619	Cy2	AY243020	Hu14 (VAA9)	AY530579
Hu49	AY530612	VAA7	AF513851	Hu31	AY530596
Hu58	AY530620	Rh35	AY243000	Hu32	AY530597
Hu34	AY530598	Rh37	AY242998	Aislado clonal	
Hu35	AY530599	Rh36	AY242999	VAA5	Y18065, AF085716
VAA2	NC_001401	Cy6	AY243016	VAA3	NC_001729
Hu45	AY530608	Cy4	AY243018	VAA3B	NC_001863
Hu47	AY530610	Cy3	AY243019	VAA4	NC_001829
Hu51	AY530613	Cy5	AY243017	Rh34	AY243001
Hu52	AY530614	Rh13	AY243013	Rh33	AY243002
Hu T41	AY695378	Clado E		Rh32	AY243003
Hu S17	AY695376	Rh38	AY530558		
		Hu66	AY530626		

En la técnica se conocen las secuencias genómicas de diversos serotipos del VAA, así como las secuencias de las ITR nativas, las proteínas Rep y las unidades de cápside. Tales secuencias pueden encontrarse en la bibliografía o en bases de datos públicas tales como GenBank. Véanse, por ejemplo, los números de referencia GenBank NC_002077, C_001401, NC_001729, NC_001863, NC_001829, NC_001862, NC_000883, NC_001701,

NC_001510, NC_006152, NC_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, AY631966, AX753250, EU285562, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852 y AY530579; las divulgaciones de los cuales se incorporan como referencia en el presente documento para la enseñanza de las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del VAA. Véase también, por ejemplo, Bantel-Schaal *et al.*, J. Virol. 73:939 (1999); Chiorini *et al.*, J. Virol. 71:6823 (1997); Chiorini *et al.*, J. Virol. 73:1309 (1999); Gao *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854 (2002); Moris *et al.*, Virology, 33:375 (2004); Mori *et al.*, Virology, 330:375 (2004); Muramatsu *et al.*, Virology, 221:208 (1996); Ruffing *et al.*, J. Gen. Virol. 75:3385 (1994); Rutledge *et al.*, J. Virol. 72:309 (1998); Schmidt *et al.*, J. Virol. 82:8911 (2008); Shade *et al.*, J. Virol. 58:921 (1986); Srivastava *et al.*, J. Virol. 45:555 (1983); Xiao *et al.*, J. Virol. 73:3994 (1999); publicaciones de patente internacional WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244 y la patente de Estados Unidos N.º 6.156.303; las divulgaciones de las cuales se incorporan como referencia en el presente documento para la enseñanza de las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del VAA. Véase también la Tabla 1. Se proporciona una descripción anterior de las secuencias de la ITR del VAA1, VAA2, y VAA3 en Xiao, X., (1996), "Characterization of Adeno-associated virus (VAA) DNA replication and integration", lectura de tesis doctoral, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA (incorporado en el presente documento en su totalidad).

El término "tropismo", como se usa en el presente documento, se refiere a la entrada del virus en la célula, de forma opcional y preferente seguido por la expresión (por ejemplo, transcripción y, de forma opcional, traducción) en la célula de secuencias que transporta el genoma vírico, por ejemplo, para un virus recombinante, expresión de la secuencia (o secuencias) de nucleótidos heteróloga. Los expertos en la materia apreciarán que la transcripción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a partir del genoma vírico puede no iniciarse en ausencia de factores que actúan en trans, por ejemplo, para un promotor inducible o una secuencia de ácido nucleico regulada de otra forma. En el caso del VAA, la expresión génica a partir del genoma vírico puede ser a partir de un provirus integrado de forma estable, a partir de un episoma no integrado, así como cualquier otra forma que puede tomar al virus dentro de la célula.

Como se utiliza en el presente documento, "transducción" o "infección" de una célula por un VAA significa que el VAA entra en la célula para establecer una infección activa (es decir, lítica). Como se utiliza en el presente documento, "transducción" de una célula por VAA significa que el VAA entra en la célula para establecer una infección latente. Véase, por ejemplo, FIELDS *et al.* VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers).

Las expresiones "porción 5'" y "porción 3'" son términos relativos para definir una relación espacial entre dos o más elementos. Por lo tanto, por ejemplo, una "porción 3'" de un polinucleótido indica un segmento del polinucleótido que esta cadena abajo de otro segmento. No se pretende que el término "porción 3'" indique que el segmento necesariamente está en el extremo 3' del polinucleótido, o incluso que esté necesariamente en la mitad 3' del polinucleótido, aunque podría ser el caso. Asimismo, una "porción 5'" de un polinucleótido indica un segmento del polinucleótido que esta cadena arriba de otro segmento. No se pretende que la expresión "porción 5'" indique que el segmento está necesariamente en el extremo 5' del polinucleótido, o incluso que está necesariamente en la mitad 5' del polinucleótido, aunque podría ser el caso.

Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" abarca tanto a péptidos como proteínas, a menos que se indique otra cosa.

Un "polinucleótido" es una secuencia de bases nucleotídicas, y pueden ser secuencias de ARN, ADN o híbridas ADN-ARN (que incluyen tanto nucleótidos de origen natural como no natural), y que pueden ser ya sea secuencias de ADN monocatenario o bicatenario.

Como se utiliza en el presente documento, un polinucleótido "aislado" (por ejemplo, un "ADN aislado" o un "ARN aislado" significa un polinucleótido separado o sustancialmente libre de al menos alguno de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o víricos (por ejemplo, la pared celular o la membrana celular) u otros polipéptidos o ácidos nucleicos hallados comúnmente asociados con el polinucleótido. En algunas realizaciones, un polinucleótido aislado es uno que está al menos aproximadamente el 20 % puro, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % puro.

Asimismo, un polipéptido "aislado" significa un polipéptido que está separado o sustancialmente libre de al menos alguno de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales, celulares o víricos (por ejemplo, la pared celular o la membrana celular) u otros polipéptidos o ácidos nucleicos hallados comúnmente asociados con el polipéptido. En algunas realizaciones, un polipéptido aislado es uno que está al menos aproximadamente al 20 % puro, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % puro.

Un "polipéptido terapéutico" es un polipéptido que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia de, o el defecto de, una proteína en una célula o sujeto. Como alternativa, un "polipéptido terapéutico" es uno que confiere de otra forma un beneficio a un sujeto, por ejemplo, efectos anticancerosos o una mejora en la supervivencia al trasplante.

Como se utiliza en el presente documento, el término “modificado” como se aplica a una secuencia de polinucleótido o polipéptido, se refiere a una secuencia que difiere de una secuencia de tipo silvestre debido a una o más delecciones, adiciones, sustituciones o cualquier combinación de las mismas.

5 Como se utiliza en el presente documento, por “aislar” o “purificar” (o equivalentes gramaticales) un vector de virus, se entiende que el vector de virus está separado al menos de forma parcial de al menos alguno de los otros componentes en el material inicial.

10 Por los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento de” (y las variaciones gramaticales de los mismos) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto se reduce, al menos se mejora o estabiliza de forma parcial y/o se consigue algo de alivio, mitigación, disminución o estabilización en al menos un síntoma clínico, y/o existe un retardo en la evolución de la enfermedad o trastorno.

15 Los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” (y las variaciones gramaticales de los mismos) se refieren a la prevención y/o retardo del inicio de una enfermedad, trastorno y/o un síntoma (o síntomas) clínico en un sujeto y/o una reducción en la gravedad del inicio de la enfermedad, trastorno y/o síntoma (o síntomas) clínico con respecto a lo que se produciría en ausencia de los métodos de la invención. La prevención puede ser completa, por ejemplo, la ausencia total de enfermedad, trastorno y/o síntoma (o síntomas) clínico. La prevención también puede ser parcial, de forma que la aparición de la enfermedad, trastorno y/o síntoma (o síntomas) clínico en el sujeto y/o la gravedad del inicio es menor que lo que se produciría en ausencia de la presente invención.

20 Una cantidad de “tratamiento eficaz” como se utiliza en el presente documento, es una cantidad que es suficiente para proporcionar alguna mejora o beneficio al sujeto. Como se indica alternativamente, una cantidad de “tratamiento eficaz” es una cantidad que proporcionará algo de alivio, mitigación, disminución o estabilización de al menos un síntoma clínico en el sujeto. Los expertos en la materia apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando se proporcione al sujeto algo de beneficio.

25 Una cantidad de “prevención eficaz” como se utiliza en el presente documento, es una cantidad que es suficiente para prevenir y/o retardar el inicio de una enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos en un sujeto, y/o para reducir y/o retardar la gravedad del inicio de una enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos en un sujeto con respecto a lo que se produciría en ausencia de los métodos de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que el nivel de prevención no necesita ser completo, siempre y cuando se proporcione al sujeto algo de beneficio.

30 Las expresiones “secuencia de nucleótidos heteróloga” y “ácido nucleico heterólogo” se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a una secuencia que no es de origen natural en el virus. En general, el ácido nucleico heterólogo comprende una fase de lectura abierta que codifica un polipéptido o ARN no traducido de interés (por ejemplo, para el suministro a una célula o sujeto).

35 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “vector de virus”, “vector”, o “vector de suministro génico” se refiere a una partícula de virus (por ejemplo, VAA) que funciona como un vehículo de suministro de ácido nucleico y que comprende el genoma del vector (por ejemplo, ADN vírico [ADNv]) empaquetado dentro de un virión. Como alternativa, en algunos contextos, el término “vector” puede utilizarse para referirse al genoma del vector/ADNv solo.

40 Los vectores de virus de la invención pueden adicionalmente ser partículas de VAA en dúplex, como se describe en la publicación de patente internacional WO 01/92551 (la divulgación de la cual se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). Por lo tanto, en algunas realizaciones, pueden empaquetarse en las cápsidas de virus genomas bicatenarios (dúplex).

45 Un “genoma de vector de VAAr” o “genoma de VAAr” es un genoma de VAA (es decir, ADNv) que comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas. Los vectores de VAAr en general necesitan solo la ITR de 145 bases en *cis* para generar virus. Todas las otras secuencias víricas son prescindibles y pueden suministrarse en *trans* (Muzyczka, Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97 (1992)). Normalmente, el genoma de vector de VAAr solo conservará una o más secuencias de ITR, de forma que se maximice el tamaño del transgén que el vector puede empaquetar de forma eficaz. Las secuencias que codifican las proteínas estructurales y no estructurales pueden proporcionarse en *trans* (por ejemplo, a partir de un vector, tal como un plásmido o integrando de forma estable las secuencias en una célula empaquetadora). En realizaciones de la invención el genoma de vector de VAAr comprende al menos una secuencia ITR (por ejemplo, la secuencia ITR de VAA), de forma opcional dos ITR (por ejemplo, dos ITR de VAA), las cuales normalmente estarán en los extremos 5' y 3' del genoma de vector y flanquearán el ácido nucleico heterólogo, pero no necesitan estar contiguas al mismo. Las ITR pueden ser la misma o distintas entre sí.

50 Un “sistema de expresión de VAA” es un sistema de uno o más polinucleótidos que son suficientes, cuando se introducen en una célula hospedadora adecuada, para sustentar la producción de VAAr. Un sistema de expresión de VAA normalmente incluye polinucleótidos que codifican rep y cap del VAA, los genes auxiliares y un genoma de VAAr. Un ejemplo de un sistema de expresión de VAA es el método de transfección triple.

La expresión "repetición terminal" o "TR" incluyen cualquier repetición terminal vírica o sintética que forma una estructura en horquilla y funciona como una repetición terminal inversa (es decir, media funciones deseadas tales como la replicación, el empaquetamiento de virus, la integración y/o el rescate de provirus, y similares). La ITR puede ser una ITR de VAA o una ITR que no es de VAA. Por ejemplo, puede utilizarse como un ITR una secuencia de ITR que no es de VAA tal como las de otros parvovirus (por ejemplo, parvovirus canino, parvovirus bovino, parvovirus de ratón, parvovirus porcino, parvovirus humano B-19) o la horquilla del SV40, que sirve como el origen de replicación del SV40, las cuales pueden modificarse adicionalmente mediante truncamiento, sustitución, delección, inserción y/o adición. Adicionalmente, la ITR puede ser parcialmente o completamente sintética, tal como la "secuencia doble D" como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.478.745 para el beneficio de Samulski *et al.*

Los genomas de VAA tienen secuencias palindrómicas tanto en sus extremos 5' como 3'. La naturaleza palindrómica de las secuencias conduce a la formación de una estructura en horquilla que se estabiliza mediante la formación de enlaces de hidrogeno entre los pares de bases complementarias. Se cree que la estructura en horquilla adopta una forma de "Y" o una de "T". Véase, por ejemplo, FIELDS *et al.* VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4ª edición, Lippincott-Raven Publishers).

Una "repetición terminal invertida de VAA" o "ITR de VAA" puede proceder de cualquier VAA, incluyendo, pero sin limitación los serotipos 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 13, VAA de serpiente, VAA aviar, VAA bovino, VAA canino, VAA equino, VAA ovino, VAA de cabra, VAA de camarón o cualquier otro VAA conocido o descubierto más tarde (véase, por ejemplo, la Tabla 1). Una ITR de VAA no necesita tener la secuencia de repetición terminal nativa (por ejemplo, una secuencia de ITR de VAA nativa puede alterarse mediante inserción, delección, truncamiento y/o mutaciones sin sentido), siempre y cuando la repetición terminal medie las funciones deseadas, por ejemplo, la replicación, el empaquetamiento de virus, la integración y/o el rescate de provirus, y similares.

Los vectores de virus de la invención pueden adicionalmente ser vectores de virus "direccionados" (por ejemplo, que tengan un tropismo dirigido) y/o un VAA "híbrido" (es decir, en el cual las ITR víricas y la cápside vírica sean de distintos VAA u otros parvovirus), como se describe en la publicación de patente internacional WO 00/28004 y Chao *et al.*, Mol. Therapy 2:619 (2000). En otras realizaciones, los vectores de virus son VAA "quiméricos" (es decir, en los cuales las proteínas de la cápside son de más de un serotipo y/o las proteínas de la cápside están modificadas para contener secuencias de más de un serotipo).

Adicionalmente, la cápside o elementos genómicos víricos pueden contener otras modificaciones, que incluyen inserciones, delecciones y/o sustituciones.

El término "molde" o "sustrato" se utiliza en el presente documento para referirse a una secuencia de polinucleótido que puede replicarse para producir el ADN vírico de VAA. Para el fin de la producción de vector, el molde normalmente se incluirá dentro de una secuencia de nucleótidos o construcción más grande, incluyendo, pero sin limitación un plásmido, vector de ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (por el acrónimo en inglés, BAC), cromosoma artificial de levadura (por el acrónimo en inglés, YAC) o un vector vírico (por ejemplo, vectores de adenovirus, herpesvirus, virus de Epstein-Barr, VAA, baculovíricos, retrovíricos y similares). Como alternativa, el molde puede incorporarse de forma estable en el cromosoma de una célula empaquetadora.

Como se utiliza en el presente documento, "secuencias que codifican Rep" de VAA indica las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas no estructurales del VAA que median la replicación vírica y la producción de nuevas partículas de virus. Los genes y proteínas de replicación de VAA se han descrito en, por ejemplo, FIELDS *et al.* VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4ª edición, Lippincott-Raven Publishers).

Las "secuencias que codifican Rep" no necesitan codificar todas las proteínas Rep del VAA. Por ejemplo, con respecto al VAA, las secuencias que codifican Rep no necesitan codificar las cuatro proteínas Rep del VAA (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40), de hecho, se cree que el VAA5 solo expresa las proteínas Rep68 y Rep40 cortadas y empalmadas. En realizaciones representativas, las secuencias que codifican Rep codifican al menos las proteínas de replicación que son necesarias para la replicación y el empaquetamiento del genoma vírico en los viriones nuevos. En general, las secuencias que codifican Rep codificarán al menos una proteína Rep grande (es decir, Rep78/68) y una proteína Rep pequeña (es decir, Rep52/40). En realizaciones particulares, las secuencias que codifican Rep codifican la proteína Rep78 de VAA y las proteínas Rep 52 y/o Rep40 de VAA. En otras realizaciones, las secuencias que codifican Rep codifican las proteínas Rep68 y la Rep52 y/o Rep40. En aún otra realización adicional, las secuencias que codifican Rep codifican las proteínas Rep68 y Rep 52, las proteínas Rep68 y Rep40, las proteínas Rep78 y Rep52, o las proteínas Rep78 y Rep40.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteína Rep grande" se refiere a Rep68 y/o Rep78. Las proteínas Rep grandes pueden ser ya sea de tipo silvestre o sintéticas. Una proteína Rep grande de tipo silvestre puede proceder de cualquier VAA, incluyendo, pero sin limitación los serotipos 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 13, o cualquier otro VAA conocido ahora o descubierto más tarde (véase, por ejemplo, la Tabla 1). Una proteína Rep grande sintética puede estar modificada mediante inserción, delección, truncamiento y/o mutaciones sin sentido.

Los expertos en la materia apreciarán adicionalmente que no es necesario que las proteínas de replicación estén codificadas en el mismo polinucleótido. Por ejemplo, el promotor p19 del VAA puede estar inactivo y la proteína (o proteínas) Rep grande expresarse a partir de un polinucleótido y la proteína (o proteínas) Rep pequeña expresarse a partir de un polinucleótido distinto. Normalmente, sin embargo, será más conveniente expresar las proteínas de replicación a partir de una única construcción. En algunos sistemas, los promotores víricos (por ejemplo, promotor p19 del VAA) pueden no ser reconocidos por la célula y, por lo tanto, es necesario expresar las proteínas Rep grande y pequeña a partir de casetes de expresión distintos. En otros casos, puede ser conveniente expresar las proteínas Rep grande y Rep pequeña de forma separada, es decir, bajo el control de elementos de control transcripcional y/o traduccional separados. Por ejemplo, puede ser conveniente controlar la expresión de las proteínas Rep grandes, de forma que se disminuya la proporción de grande con respecto a la pequeña.

Proteínas Rep. En el caso de células de insecto, puede ser ventajoso regular de forma negativa la expresión de las proteínas Rep grandes (por ejemplo, Rep78/68) para evitar la toxicidad para las células (véase, por ejemplo, Urabe *et al.*, Hum. Gene Ther. 13:1935 (2002)).

Como se utiliza en el presente documento, las “secuencias que codifican cap” del VAA codifican las proteínas estructurales que forman una cápside de VAA funcional (es decir, pueden empaquetar ADN y pueden infectar células diana). Normalmente, las secuencias que codifican *cap* codificarán todas las subunidades de la cápside de VAA, pero pueden estar codificadas menos que todas las subunidades de la cápside siempre y cuando se produzca la cápside funcional. Normalmente, pero no necesariamente, las secuencias que codifican *cap* estarán presentes en una única molécula de ácido nucleico. La estructura de la cápside del VAA se describe con más detalle en BERNARD N. FIELDS *et al.*, VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4ª edición, Lippincott-Raven Publishers).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “libre de componentes animales” se refiere a un medio de cultivo u otra composición que no contiene ningún producto extraído o purificado a partir de animales o de células animales, incluyendo suero, enzimas, carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, matriz extracelular, etc.

Línea celular HEK293 en suspensión

En un esfuerzo para generar una tecnología de fabricación que pueda cambiarse de escala para producir VAAr de título elevado y elevadamente puro, se desarrolló una línea celular HEK293 que crece en condiciones en suspensión libre de componentes animales. La línea celular se desarrolló a partir de un banco maestro de células calificado. Después de la adaptación al crecimiento en condiciones de suspensión libre de componentes animales, la línea celular HEK293 en suspensión mantuvo su capacidad para la transfección eficaz y la producción de VAAr.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a una célula HEK293 aislada que se depositó en la ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, Virginia, 20108, el 23 de octubre de 2012 (N.º de depósito de ATCC PTA-13274), según el Tratado de Budapest.

En una realización, la línea celular es adecuada para el cultivo en cualquier volumen de medio de cultivo, desde 10 ml (por ejemplo, en frascos agitadores) hasta 10 l, 50 l, 100 l o más, (por ejemplo, en biorreactores). La línea celular es adecuada para la producción de 11 serotipos, quimeras e híbridos del VAA, por ejemplo, VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11, VAA12, VAA13 y cualquier quimera y/o híbrido de los mismos, por ejemplo, VAA1-13 2.5, 2i8, 9.45 y otras cápsides quiméricas o híbridas.

En algunas realizaciones, la línea celular puede utilizarse en un método de producción de VAA que proporciona al menos aproximadamente 4×10^4 partículas que contienen genoma de vector por célula antes de la purificación, por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^5 partículas que contienen un genoma de vector por célula antes de la purificación. En otras realizaciones, la línea celular puede utilizarse en un método de producción de VAA que proporciona al menos aproximadamente 1×10^{12} partículas purificadas que contienen un genoma de vector por litro de cultivo celular, por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^{13} o 1×10^{14} partículas purificadas que contienen un genoma de vector por litro de cultivo celular.

Métodos de producción de vectores de virus

La presente invención proporciona adicionalmente métodos de producción de vectores de virus. En un aspecto, la invención se refiere a un método de producción de partículas de VAA, que comprende: (a) proporcionar a las células HEK293 de la invención un sistema de expresión de VAA; (b) cultivar las células en condiciones en las cuales se producen las partículas de VAA y (c) de forma opcional aislar las partículas de VAA. En una realización, las células se cultivan en suspensión. En otra realización, las células se cultivan en condiciones libres de componentes animales. El medio libre de componentes animales puede ser cualquier medio libre de componentes animales (por ejemplo, medio sin de suero) compatible con las células HEK293. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, SFM4Transfx-293 (Hy-clone), Ex-Cell 293 (JRH Biosciences), LC-SFM (Invitrogen) y Pro293-S (Lonza).

Las condiciones suficientes para la replicación y el empaquetamiento de las partículas del VAA pueden ser, por

ejemplo, la presencia de secuencias del VAA suficientes para la replicación de un molde de VAA y la encapsidación en cápsides de VAA (por ejemplo, secuencias de *rep* de VAA y secuencias de *cap* de VAA) y secuencias auxiliares procedentes de adenovirus y/o herpesvirus. En realizaciones particulares, el molde de VAA comprende dos secuencias de ITR del VAA, las cuales se emplazan 5' y 3' con respecto a la secuencia de ácido nucleico heteróloga, aunque no necesitan estar contiguas de forma directa a la misma.

En algunas realizaciones, el molde de VAA comprende una ITR que no se resuelve mediante Rep para hacer vectores de VAA en dúplex como se describe en la publicación de patente internacional WO 01/92551.

El molde de VAA y las secuencias de *rep* y *cap* del VAA se proporcionan en condiciones tales que se produzca en la célula el vector de virus que comprende el molde de VAA empaquetado dentro de la cápside de VAA. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recoger el vector de virus del cultivo. En una realización, el vector de virus puede recogerse lisando las células, por ejemplo, después de retirar las células del medio de cultivo, por ejemplo, mediante la sedimentación de las células. En otra realización, el vector de virus puede recogerse del medio en el cual se cultivan las células, por ejemplo, para aislar vectores que se secretan a partir de las células. Para la recogida de VAAr puede retirarse del cultivo algo de medio, o todo el medio, una vez o más de una vez, por ejemplo, a intervalos regulares durante la etapa de cultivo (tal como cada 12, 18, 24 o 36 horas, o un tiempo más prolongado que sea compatible con la viabilidad celular y la producción de vector), por ejemplo, comenzando aproximadamente 48 horas postransfección. Después de retirar el medio, se puede añadir al cultivo medio recién preparado, con o sin los complementos nutritivos adicionales. En una realización, las células pueden cultivarse en un sistema de perfusión de modo que el medio fluya de forma constante sobre las células y se recoja para el aislamiento del VAAr secretado. La recogida de VAAr del medio puede continuar siempre que las células transfectadas se mantengan viables, por ejemplo, 48, 72, 96 o 120 horas o más postransfección. En determinadas realizaciones, la recogida de VAAr secretado se lleva a cabo con serotipos de VAA (tales como VAA8 y VAA9), que no se unen o se unen solo de forma débil a las células productoras. En otras realizaciones, la recogida de VAAr secretado se lleva a cabo con serotipos de VAA de unión heparina (por ejemplo, el VAA2) que se hayan modificado de forma que no se unan a las células en las que se producen. Los ejemplos de modificaciones adecuadas, así como de técnicas de recogida de VAAr, se divulgan en la publicación de Estados Unidos N.º 2009/0275107, incorporada como referencia en su totalidad en el presente documento.

La replicación de VAA y las secuencias de la cápside pueden proporcionarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Los protocolos actuales normalmente expresan los genes de *rep/cap* del VAA en un plásmido único. No es necesario proporcionar juntas las secuencias de replicación y de empaquetamiento del VAA, aunque puede ser conveniente hacerlo. Las secuencias de *rep* y/o *cap* de VAA pueden proporcionarse mediante cualquier vector vírico o no vírico. Por ejemplo, las secuencias de *rep/cap* pueden proporcionarse mediante un vector de adenovirus o herpesvirus híbrido (por ejemplo, insertadas en las regiones E1a o E3 de un vector de adenovirus deleciónado). También pueden emplearse vectores de VEB para expresar los genes *cap* y *rep* del VAA. Una ventaja de este método es que los vectores de VEB son episómicos, aunque aún mantengan un número elevado de copias a través de las sucesivas divisiones celulares (es decir, están integrados de forma estable en la célula como elementos extracromosómicos, denominados como un "episoma nuclear a base de VEB", véase Margolski, Curr. Top. Microbiol. Immun. 158:67 (1992)).

Como una alternativa adicional, las secuencias de *rep/cap* pueden incorporarse de forma estable en una célula.

Normalmente, las secuencias de *rep/cap* del VAA no estarán flanqueadas por las TR, para evitar el rescate y/o empaquetamiento de estas secuencias.

El molde de VAA puede proporcionarse a la célula utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el molde puede suministrarse mediante un vector no vírico (por ejemplo, plásmido) o vírico. En realizaciones particulares, el molde de VAA se suministra mediante un vector de herpesvirus o adenovirus (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un adenovirus lesionado). Como otra ilustración, Palombo *et al.*, J. Virol. 72: 5025 (1998), describen un vector de baculovirus que porta un gen indicador flanqueado por las TR del VAA. Los vectores de VEB también pueden emplearse para suministrar el molde, como se describe anteriormente con respecto a los genes *rep/cap*.

En otra realización representativa, el molde de VAA se proporciona mediante un virus de VAAr que replica. En aún otras realizaciones, un provirus de VAA que comprende el molde de VAA está integrado de forma estable en el cromosoma de la célula.

Para potenciar los títulos de virus, pueden proporcionarse a la célula las funciones de un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o herpesvirus) que promuevan una infección de VAA productiva. Las secuencias de virus auxiliar necesarias para la replicación de VAA son conocidas en la técnica. Normalmente, estas secuencias se proporcionarán mediante un vector de adenovirus o herpesvirus auxiliar. Como alternativa, las secuencias de adenovirus o herpesvirus pueden proporcionarse mediante otro vector no vírico o vírico, por ejemplo, como un miniplásmido de adenovirus no infeccioso que transporta todos los genes auxiliares que promueven la producción eficaz de VAA, como se describe en Ferrari *et al.*, Nature Med. 3: 1295 (1997) y las patentes de Estados Unidos

N.º 6.040.183 y 6.093.570.

Adicionalmente, las funciones del virus auxiliar pueden proporcionarse mediante una célula empaquetadora con las secuencias auxiliares incluidas en el cromosoma o mantenidas como un elemento extracromosómico estable. En general, las secuencias de virus auxiliar no pueden empaquetarse en viriones de VAA, por ejemplo, no están flanqueadas por las TR.

Los expertos en la materia apreciarán que puede ser ventajoso proporcionar las secuencias de replicación y de la cápside del VAA y las secuencias del virus auxiliar (por ejemplo, secuencias de adenovirus) en una única construcción auxiliar. Esta construcción auxiliar puede ser una construcción no vírica o vírica. Como una ilustración no limitativa, la construcción auxiliar puede ser un adenovirus híbrido o un herpesvirus híbrido que comprenda los genes *rep/cap* del VAA.

En una realización particular, las secuencias *rep/cap* del VAA y las secuencias auxiliares de adenovirus se suministran mediante un único vector auxiliar de adenovirus. Este vector puede comprender adicionalmente el molde de VAA. Las secuencias *rep/cap* de VAA y/o el molde de VAA pueden insertarse en una región delecionada (por ejemplo, las regiones E1a o E3) del adenovirus.

En una realización adicional, las secuencias *rep/cap* del VAA y las secuencias auxiliares de adenovirus se suministran mediante un único vector auxiliar de adenovirus. De acuerdo con esta realización, el molde de VAA puede proporcionarse como un molde plasmídico.

En otra realización ilustrativa, las secuencias *rep/cap* del VAA y las secuencias auxiliares de adenovirus se proporcionan mediante un único vector auxiliar de adenovirus, y el molde de VAA está integrado en la célula como un provirus. Como alternativa, el molde de VAA se proporciona mediante un vector de EBV que se mantiene dentro de la célula como un elemento extracromosómico (por ejemplo, como un episoma nuclear a base del VEB).

En una realización ejemplar adicional, las secuencias *rep/cap* del VAA y las secuencias auxiliares de adenovirus se proporcionan mediante un único adenovirus auxiliar. El molde de VAA puede proporcionarse como un vector vírico que replica distinto. Por ejemplo, el molde de VAA puede proporcionarse mediante una partícula de VAA o una segunda partícula de adenovirus recombinante.

De acuerdo con los métodos precedentes, el vector de adenovirus híbrido normalmente comprenderá las secuencias 5' y 3' en *cis* de adenovirus suficientes para la replicación y el empaquetamiento de adenovirus (es decir, las repeticiones terminales de adenovirus y la secuencia PAC). Las secuencias de *rep/cap* de VAA y, si está presente, el molde de VAA, están incluidos en la estructura del adenovirus y están flanqueadas por las secuencias 5' y 3' en *cis*, de forma que estas secuencias pueden empaquetarse en cápsides de adenovirus. Como se describe anteriormente, las secuencias auxiliares de adenovirus y las secuencias de *rep/cap* de VAA en general no están flanqueadas por las TR, de forma que estas secuencias no se empaquetan en los viriones de VAA.

Zhang *et al.*, Gene Ther. 18: 704 ((2001)) describen un auxiliar quimérico que comprende tanto al adenovirus como a los genes *rep* y *cap* del VAA.

En los métodos de empaquetamiento de VAA también pueden utilizarse como virus auxiliar un herpesvirus. Los herpesvirus híbridos que codifican la proteína (o proteínas) Rep del VAA pueden facilitar de forma ventajosa esquemas de producción de vector VAA que puedan cambiarse de escala. Se ha descrito un vector de virus herpes simple tipo I (VHS-1) híbrido que expresa los genes *rep* y *cap* del VAA-2 (Conway *et al.*, Gene Ther. 6: 986 (1999) y el documento WO 00/17377).

Pueden obtenerse reservas de vector de VAA libre de virus auxiliar contaminante mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los virus VAA y auxiliar pueden diferenciarse fácilmente a base del tamaño. Además, el VAA puede separarse del virus auxiliar a base de la afinidad por un sustrato de heparina (Zolotukhin *et al.*, Gene Ther. 6: 973 (1999)). Pueden utilizarse virus auxiliares que tienen replicación defectuosa delecionados de forma que cualquier virus auxiliar contaminante sea no competente para la replicación. Como una alternativa adicional, puede emplearse un auxiliar de adenovirus que carece de la expresión del gen tardío, dado que solo se necesita la expresión del gen temprano del adenovirus para mediar el empaquetamiento del VAA. Se conocen en la técnica mutantes de adenovirus defectuosos para la expresión del gen tardío (por ejemplo, los mutantes de adenovirus ts100K y ts149).

En realizaciones representativas, el método de la invención puede cambiarse de escala por completo, de forma que puede llevarse a cabo en cualquier volumen deseado de medio de cultivo, por ejemplo, desde 10 ml (por ejemplo, en matraces agitadores) hasta 10 l, 50 l, 100 l o más (por ejemplo, en biorreactores tales como los sistemas de biorreactor por ondas y tanques de agitación).

El método es adecuado para la producción de todos los serotipos y quimeras del VAA, por ejemplo VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11, VAA12, VAA13 y cualquier quimera de los mismos.

En determinadas realizaciones, el método proporciona al menos aproximadamente 1×10^4 partículas que contienen el genoma de vector por célula antes de la purificación, por ejemplo al menos aproximadamente 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 o 1×10^5 , o más partículas que contienen un genoma de vector por célula antes de la purificación. En otras realizaciones, el método proporciona al menos aproximadamente 1×10^{12} partículas purificadas que contienen un genoma de vector por litro de cultivo celular, por ejemplo, al menos aproximadamente 5×10^{12} , 1×10^{13} , 5×10^{13} o 1×10^{14} , o más partículas purificadas que contienen un genoma de vector por litro de cultivo celular.

Vectores de virus recombinantes

Los vectores de virus producidos mediante la presente invención son útiles para el suministro de ácidos nucleicos a células *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En particular, los vectores de virus pueden emplearse de forma ventajosa para suministrar o transferir ácidos nucleicos a células animales, incluyendo de mamífero.

Puede suministrarse en los vectores de virus producidos mediante la presente invención cualquier secuencia (o secuencias) de ácido nucleico heteróloga de interés. Los ácidos nucleicos de interés incluyen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos o los ARN, incluyendo polipéptidos o los ARN indicadores, terapéuticos (por ejemplo, para usos médicos o veterinarios), inmunogénicos (por ejemplo, para vacunas) o diagnósticos.

Como una alternativa adicional, el ácido nucleico heterólogo puede codificar cualquier polipéptido o ARN que se produzca de forma conveniente en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, los vectores de virus pueden introducirse en células en cultivo y el producto génico expresado aislarse de las mismas.

Los expertos en la materia comprenderán que el ácido nucleico (o ácidos nucleicos) heterólogo de interés puede estar asociado de forma operativa con secuencias de control apropiadas. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo puede estar asociado de forma operativa con elementos de control de la expresión, tales como señales de control de la transcripción/traducción, orígenes de replicación, señales de poliadenilación, sitios de entrada al ribosoma internos (IRES), promotores y/o potenciadores, y similares.

Los expertos en la materia apreciarán que puede utilizarse una diversidad de elementos promotores/potenciadores, dependiendo del nivel y de expresión específica de tejido deseados. El promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor/potenciador puede ser nativo o extraño y puede ser una secuencia natural o sintética. Por extraño, se pretende que la región de iniciación de la transcripción no se encuentre en el hospedador de tipo silvestre en el que la región de iniciación de la transcripción se introduce.

En realizaciones particulares, los elementos promotores/potenciadores pueden ser nativos para la célula diana o sujeto a tratar. En realizaciones representativas, el elemento promotor/potenciador puede ser nativo para la secuencia de ácido nucleico heteróloga. En general, el elemento promotor/potenciador se elige de forma que funcione en la célula (o células) diana de interés. Adicionalmente, en realizaciones particulares, el elemento promotor/potenciador es un elemento promotor/potenciador de mamífero. El elemento promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible.

Los elementos de control de la expresión inducibles son normalmente ventajosos en las aplicaciones en las que es conveniente proporcionar una regulación sobre la expresión de la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico heteróloga. Los elementos promotores/potenciadores inducibles para el suministro de genes pueden ser elementos promotores/potenciadores específicos o preferentes de tejido, e incluyen elementos promotores/potenciadores específicos o preferentes de músculo (incluyendo específicos o preferentes de músculo cardíaco, esquelético y/o liso), específicos o preferentes de tejido neural (incluyendo específicos o preferentes de cerebro), específicos o preferentes para el ojo (incluyendo específicos de retina o específicos de córnea), específicos o preferentes para hígado, específicos o preferentes para médula ósea, específicos o preferentes para páncreas, específicos o preferentes para el bazo y específicos o preferentes para el pulmón. Otros elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen elementos inducibles por hormonas e inducibles por metales. Los elementos promotores/potenciadores inducibles ejemplares incluyen, pero sin limitación, un elemento de activación/desactivación de Tet, un promotor inducible por RU486, un promotor inducible por ecdisona, un promotor inducible por rapamicina y un promotor de metalotioneína.

En las realizaciones en las que la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico heteróloga se transcribe y después se traduce en las células diana, en general se incluyen señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias que codifican la proteína insertada. Estas secuencias de control de la traducción exógenas, que pueden incluir el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes, pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

Los vectores de virus producidos de acuerdo con la presente invención proporcionan un medio para suministrar ácidos nucleicos heterólogos en una amplia variedad de células, incluyendo células que se dividen y que no se dividen. Los vectores de virus pueden emplearse para suministrar un ácido nucleico de interés a una célula *in vitro*, por ejemplo, para producir un polipéptido *in vitro* o para la terapia génica *ex vivo*. Los vectores de virus son

adicionalmente útiles en un método para suministrar un ácido nucleico a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, para expresar un polipéptido o un ARN funcional inmunogénico o terapéutico. De esta manera, el polipéptido o el ARN funcional puede producirse *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede necesitar el polipéptido debido a que el sujeto tiene una deficiencia del polipéptido. Adicionalmente, el método puede practicarse debido a que la producción del polipéptido o del ARN funcional en el sujeto puede impartir algún efecto benéfico.

Además, los vectores de virus pueden utilizarse para producir un polipéptido de interés o ARN funcional en células en cultivo o en un sujeto (por ejemplo, utilizando el sujeto como un biorreactor para producir el polipéptido o para observar los efectos del ARN funcional en el sujeto, por ejemplo, en conexión con métodos de exploración).

Habiendo descrito la presente invención, la misma se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos, los cuales están incluidos en el presente documento solo para fines de ilustración, y los cuales no se pretende que sean limitativos de la invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Obtención de células HEK293 en suspensión a partir de un banco maestro de células calificado de HEK293 adherentes. La obtención de la línea celular en suspensión procedente del banco maestro de células (BCM) de HEK293 parentales, se realizó en una instalación de sala limpia de Clase 10.000. La obtención de la línea celular en suspensión se llevó a cabo en un procedimiento de dos etapas que implicó en primer lugar apartar las células de los medios que contenían suero bovino y después adaptar las células a medios de suspensión sin suero compatibles con células HEK293. La línea celular en suspensión se creó como sigue. En primer lugar, se descongeló un banco de células maestro (BCM) calificado y se puso en cultivo en medios DMEM que contenían suero fetal bovino (SFB) al 10 % y se cultivó durante varios días para permitir que las células se recuperen del ciclo de congelación/descongelación. Las células del BCM se cultivaron y se pasaron a lo largo de un período 4 semanas mientras la cantidad de SFB en los medios de cultivo tisular se reducía de forma gradual desde el 10 % al 2,5 %. Después, las células se transfirieron del DMEM con SFB al 2,5 % a medios de suspensión sin suero y se cultivaron en matraces agitadores. Después, las células se cultivaron en el medio sin suero durante otras 3 semanas mientras se controlaba su velocidad de crecimiento y la viabilidad. Después, las células adaptadas se amplificaron y congelaron. Posteriormente se descongelaron varios viales procedentes de este banco de células y se utilizaron durante los estudios de desarrollo del proceso para crear un procedimiento de fabricación que pueda cambiarse de escala utilizando frascos agitadores y sistemas de biorreactor por ondas para generar vectores de VAAr. Las células HEK293 en suspensión se cultivaron en medios de suspensión sin suero que sustentaban tanto el crecimiento como la elevada eficacia de transfección en matraces agitadores y bolsas de biorreactor por ondas. Para el mantenimiento de las células y la generación de vectores de VAAr se utilizaron incubadores de agitación Multitron (ATR) a velocidades de agitación de rpm específicas (a base de los volúmenes de cultivo celular), humedad al 80 % y CO₂ al 5 %.

Transfección de las células HEK293 en suspensión. El día de la transfección, las células se contaron utilizando un analizador de viabilidad ViCell XR (Beckman Coulter) y se diluyeron para la transfección. Para mezclar el cóctel de transfección se añadieron a un tubo cónico los siguientes reactivos en este orden: ADN plasmídico, OPTIMEM[®] I (Gibco) u OptiPro SFM (Gibco), u otros medios de transfección compatibles sin suero, y después el reactivo de transfección en una proporción específica con respecto al ADN plasmídico. En estos estudios se utilizaron plásmidos auxiliares de la serie pXR para generar vectores de múltiples serotipos de VAAr (Rabinowitz *et al.*, J. Virol. 76: 791 (2002)). El cóctel se invirtió para mezclarlo antes de incubarse a TA. Después, el cóctel de transfección se pipeteó en matraces y se colocó otra vez en el agitador/incubador. Todos los estudios de optimización se llevaron a cabo en volúmenes de cultivo de 30 ml seguido de la validación en volúmenes de cultivo más grandes. Las células se recogieron a las 48 horas postransfección.

Producción de VAAr utilizando sistemas de biorreactor por ondas. Las bolsas de ondas se sembraron 2 días antes de la transfección. Dos días después de la siembra de la bolsa, se hicieron recuentos del cultivo celular y después se amplificó/diluyó el cultivo celular antes de la transfección. Después, se transfectó el cultivo celular del biorreactor por ondas. El cultivo celular se recogió a partir de la bolsa del biorreactor por ondas al menos 48 horas postransfección.

Análisis de la eficacia de transfección/expresión de GFP utilizando citometría de flujo. Aproximadamente a las 24 horas postransfección, se retiró 1 ml de cultivo celular de cada matraz o de la bolsa del biorreactor por ondas, así como un control no transfectado. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo Dako Cyan.

Recogida de las células en suspensión de los matraces agitadores y de las bolsas de biorreactor por ondas. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los cultivos celulares se recogieron en tubos cónicos de polipropileno de 500 ml (Corning), ya sea mediante vertido de los matraces agitadores o mediante bombeo de las bolsas del biorreactor por ondas. Después, el cultivo celular se centrifugó a 655 x g durante 10 min utilizando una centrífuga Sorvall RC3C plus y el rotor H6000A. Los sobrenadantes se descartaron y las células se resuspendieron en PBS 1X, se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 655 x g durante 10 min. En este punto, los

sedimentos podían almacenarse como mínimo a -60 °C o podía continuarse con la purificación.

5 Titulación de VAAr a partir de lisado celular utilizando qPCR. Se retiraron 10 ml de cultivo celular y se centrifugó a 655 x g durante 10 min utilizando una centrifuga Sorvall RC3C plus y el rotor H6000A. El sobrenadante se decantó a partir del sedimento celular. Después, el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de tampón de ADNasa (CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) seguido del tratamiento con ultrasonido para lisar las células de forma eficaz. Después, se retiraron 300 µl y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Después, se añadieron a cada muestra 140 unidades de ADNasa I y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Para determinar la eficacia de la digestión con ADNasa, se añadieron 4-5 µg de plásmido TReGFP en un lisado celular no transfectado con y sin la adición de ADNasa. Después, se añadieron a cada tubo 50 µl de solución de EDTA/sarcosil (sarcosil al 6,3 %, EDTA 62,5 mM, pH 8,0) y se incubó a 70 °C durante 20 minutos. Después, se añadieron 50 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 55 °C durante al menos 2 horas. Después, las muestras se llevaron a ebullición durante 15 minutos para inactivar la Proteinasa K. Se retiró una alícuota de cada muestra para analizarla mediante qPCR. Se llevaron a cabo dos reacciones de qPCR para determinar de forma eficaz cuanto vector de VAAr se generó por célula. Se preparó una reacción de qPCR utilizando un conjunto de cebadores diseñados para unirse a una secuencia homóloga en las estructuras de los plásmidos XX680, pXR2 y TReGFP. La segunda reacción de qPCR se preparó utilizando un conjunto de cebadores para que se unan a y amplifiquen una región dentro del gen eGFP. La qPCR se realizó utilizando reactivos de Sybr green y el Light cycler 480 de Roche. Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos (90 °C durante 10 s, 62 °C durante 10 s y 72 °C durante 10 s) y la curva de fusión (1 ciclo a 99 °C durante 30 s, 65 °C durante 1 minuto continuo).

25 Purificación de VAAr a partir de lisado crudo. Cada sedimento celular se ajustó a un volumen final de 10 ml. Los sedimentos se trataron brevemente con agitación vorticial y se trataron con ultrasonido durante 4 minutos a un rendimiento del 30 % en un segundo, un segundo de ráfagas. Después del tratamiento con ultrasonido, se añadieron 550 U de ADNasa y se incubó a 37 °C durante 45 minutos. Después, para sedimentar los residuos celulares se centrifugaron los sedimentos a 9400 x g utilizando la centrifuga Sorvall RC5B y el rotor HS-4, y el lisado clarificado se transfirió a un tubo de centrifuga de tipo 70Ti (Beckman 361625). Con respecto a la recogida y al lisado de las células HEK293 en suspensión para el aislamiento de VAAr, un experto en la materia podría utilizar métodos mecánicos tales como la microfluidificación o métodos químicos tales como detergentes, etc. seguido de una etapa de clarificación utilizando filtración de profundidad o filtración de flujo tangencial (FFT).

35 Purificación del vector de VAA. El lisado de VAA clarificado se purificó mediante métodos de cromatografía en columna como sabría un experto en la materia y que están descritos en los siguientes manuscritos (Allay *et al.*, Davidoff *et al.*, Kaludov *et al.*, Zolotukhin *et al.*, Zolotukin *et al.* etc.).

40 Titulación de VAAr utilizando transferencia puntual. Se añadieron 100 µl de tampón de ADNasa (ADNasa 140 unidades, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron 1-3 µl de diluciones en serie de virus a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 30 min. Después, las mezclas se complementaron con 15 µl de solución sarcosil/EDTA (sarcosil al 6,3 %, EDTA 62,5 mM, pH 8,0) y se colocó a 70 °C durante 20 min. A continuación, se añadieron 15 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 50 °C durante al menos 2 horas. Se añadieron a cada pocillo 125 µl de tampón de NaOH (NaOH 80 mM, EDTA 4 mM, pH 8,0). Se crearon una serie de patrones específicos de transgén a través de diluciones en serie. Después, se añadió el tampón NaOH y se incubó. Se incubó la membrana de nylon a TA en Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5 y después se instaló en el aparato transferencia puntual. Después de una incubación de 10-15 minutos en tampón de NaOH, las muestras y los patrones se cargaron en el aparato de transferencia puntual sobre la membrana de transferencia de hibridación GeneScreen PlusR (PerkinElmer). Después, se aplicó a la muestra a la membrana utilizando vacío. La membrana de nylon se remojó en Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5 y después se entrecruzó utilizando un enlazador de estratos por UV 1800 (Stratagene) a 600 ujuliosx100. Después, la membrana se prehibridó en tampón CHURCH (BSA al 1 %, SDS al 7 %, EDTA 1 mM, Na₃PO₄ 0,5 M, pH 7,5). Después de la prehibridación, la membrana se hibridó durante una noche con sonda de transgén marcada con ³²P-CTP (kit de marcaje de ADN Roche Random Prime). El siguiente día, la membrana se lavó con tampón SSC de baja rigurosidad (SSC 1x, SDS al 0,1 %) y alta rigurosidad (SSC 0,1x, SDS al 0,1 %). Después, se expuso a una pantalla de phosphorimager y se analizó la densitometría utilizando un escáner STORM840 (GE).

55 Análisis de la pureza del vector de VAAr utilizando el método de tinción de plata. Se cargaron muestras del vector purificado en geles Bis-Tris al 10 % NuPage (Invitrogen) y se corrió utilizando tampón de corrida NuPage 1x. Normalmente, se cargaron 1 x 10¹⁰ partículas por pocillo. Los geles se trataron con el kit de tinción de plata SilverXpress n.º LC6100 (Invitrogen).

60 Análisis de los genomas autocomplementarios utilizando electroforesis en gel alcalino y transferencia de Southern. Brevemente, el VAAr autocomplementario purificado se añadió a 200 µl de tampón de ADNasa I (140 unidades de ADNasa, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) y se incubó a 37 °C durante 60 minutos, seguido de la inactivación de la ADNasa añadiendo 30 µl de solución EDTA sarcosil/EDTA (sarcosil al 6,3 %, EDTA 62,5 mM pH 8,0) y se colocó a 70 °C durante 20 min. Después, se añadieron a la muestra 20 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó durante un mínimo de 2 horas a 50 °C. Se añadió fenol/cloroformo en una proporción de 1:1, seguido de precipitación con etanol del ADN del vector vírico. Después, el ADN sedimentado se resuspendió en tampón alcalino

(NaOH 50 mM, EDTA 1 mM) para la desnaturalización, se cargó en un gel de agarosa alcalino al 1 %, y se corrió a 25 V durante una noche. Después, el gel se equilibró en tampón de transferencia alcalino (NaOH 0,4 M, NaCl 1 M) y se realizó una transferencia de Southern a través de una transferencia durante una noche del ADN de vector a una membrana de transferencia de hibridación GeneScreen PlusR (PerkinElmer). Después, la membrana se neutralizó utilizando Tris 0,5 M pH 7,5 con NaCl 1 M, y se hibridó durante una noche con una sonda de transgén marcada con ³²P-CTP. Después de lavar la membrana como se describe anteriormente, la membrana se expuso a una pantalla de phosphorimager y se analizó utilizando un escáner STORM840.

Ensayos de transducción. Las células HeLaRC-32 (Chadeuf *et al.*, J. Gene Med. 2: 260 (2000)) se sembraron en placa a 2×10^5 células/pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C durante una noche. Se observó que las células estuvieran al 90-100 % de confluencia. Se precalentaron 50 ml de DMEM con SFB al 2 %, Pen/Estrep al 1 %, y se añadió adenovirus (dl309) a una MOI de 10. El medio que contenía dl309 se alícuotó en fracciones de 900 µl y se utilizó para diluir el VAAr en diluciones en serie con factor diez. Después, se sembró en placa el VAAr en 400 µl y se dejó incubar durante 48 horas a 37 °C. Se contaron las células positivas para GFP para el VAAr que contenía el transgén eGFP, utilizando microscopía de fluorescencia. Para el VAAr que contenía el transgén Luciferasa, se aspiró el medio de las células y se añadieron 100 µl de tampón de lisis pasivo. Las células se congelaron a -80 °C y después se descongelaron a 37 °C para favorecer la lisis celular. Después, se pipetearon 50 µl del lisado celular en una placa de 96 pocillos opaca junto con 50 µl de luciferina. Después, las células se leyeron en un lector de placas Wallac para las unidades de luz relativas.

Ensayos de concentración. Se tomaron muestras de la reserva de vector inicial y se cargaron en una columna vivaspin, y se centrifugó a 470 xg (Sorvall H1000B) en intervalos de 10 minutos. Una vez que se consiguió el volumen/concentración deseado, ambos lados de la membrana se enjuagaron con la fracción retenida, que después se recogió. Se tomaron muestras del VAAr preconcentrado y concentrado para determinar los títulos físicos y las unidades de transducción.

Microscopía electrónica de transmisión (MET) de las partículas de VAAr teñidas negativamente. La microscopía electrónica permite una visualización directa de las partículas virales. Los vectores de VAAr dializados purificados se colocaron en una rejilla de carbono sin brillo de malla de 400 mediante inversión de la rejilla sobre una gota de 20 µl de virus. Después, la rejilla se lavó dos veces mediante inversión sobre una gota de 20 µl de H₂Odd, seguido de la inversión de la rejilla sobre una gota de 20 µl de acetato de uranilo al 2 % durante 30 segundos. Las rejillas se secan mediante un toque suave con papel Whatman en los extremos de las rejillas. Se visualizó cada vector utilizando un microscopio electrónico Zeiss EM 910.

Ejemplo 2

Desarrollo de una línea celular HEK293 en suspensión

El fin de este trabajo era generar una tecnología de fabricación que pueda cambiarse de escala para producir VAAr de título elevado y elevadamente puro utilizando la tecnología de transfección transitoria y células HEK293 de mamífero. Para comenzar, se adaptó una línea celular HEK293 adherente procedente del banco de células maestro calificado de los inventores al crecimiento en condiciones en suspensión libre de componentes animales y libre de antibióticos, como se describe en el Ejemplo 1. Después de la adaptación a las condiciones en suspensión libre de componentes animales y de la selección de un medio en suspensión libre de componentes animales compatible, la línea celular HEK293 en suspensión mantuvo su capacidad de transfección eficaz y de producción de VAAr.

Ejemplo 3

Optimización de las condiciones de transfección

Dos de las necesidades principales para la producción de VAAr utilizando transfección transitoria son la determinación de las proporciones de plásmidos óptimas para los tres plásmidos y la proporción de reactivo de transfección con respecto al ADN total. El reactivo de transfección puede tener una base química (por ejemplo, fosfato de calcio o polietilenimina) o una base biológica/lipídica (por ejemplo, 293fectina, lipofectamina, etc.). El día de la transfección las células HEK293 en suspensión inicialmente se crecieron en medio sin de suero 1, en un volumen de 30 ml en matraces agitadores de 125 ml. Se probaron diversas proporciones de XX680:Rep/Cap:TReGFP con proporciones de reactivo de transfección con respecto al ADN de 2:1 y 4:1, con 1 µg de ADN/ml de células y se incubó a temperatura ambiente. Como se muestra en la Fig. 1A, la proporción de plásmidos de 2:1,5:1 con una proporción de reactivo de transfección con respecto al ADN de 2:1 generó los mayores genomas de vector (gv)/célula. Los gv/célula de los lisados celulares se determinaron utilizando métodos de qPCR, como se describe en el Ejemplo 1. Fue evidente que la proporción de reactivo de transfección con respecto al ADN de 4:1 generó la menor cantidad de gv/célula de todas las proporciones de plásmido probadas. Esto se debió muy probablemente a una viabilidad celular postransfección más baja, detectada con el analizador de Viabilidad Beckman ViCell XR, lo que sugiere que se alcanzó un nivel de toxicidad con el reactivo de transfección. Además, la proporción 4:1 de reactivo de transfección con respecto al ADN condujo a agregados celulares más grandes después de la transfección.

Varios protocolos de transfección disponibles de forma comercial describen la importancia del volumen del cóctel de transfección y cómo puede influir en la eficacia de transfección. Para determinar cómo afecta a estas células el volumen del cóctel de transfección, se seleccionaron volúmenes de cóctel de transfección del 2,5 y el 10 %. El volumen % es a base del volumen final del cultivo celular en el matraz agitador. Por ejemplo, se utilizaron cultivos de 30 ml para determinar el volumen del cóctel de transfección óptimo, así, para un cóctel de transfección al 10 %, se colocaron 27 ml de cultivo celular en el frasco agitador y el cóctel de transfección fue de 3 ml. Como se ilustra en la Fig. 1B, un volumen de cóctel de transfección al 5 % mostró tener la mejor eficacia de transfección (a base de citometría de flujo de GFP) y generó los mayores gv/célula).

10 Ejemplo 4

Optimización de la densidad celular y de las concentraciones de ADN plasmídico

15 Antes de iniciar estos estudios, los inventores comenzaron utilizando otros medios sin suero (medios sin suero 2) que sustentaban un mejor crecimiento, una eficacia de transfección aumentada y una producción de vector/célula aumentada (véase la Tabla 2). Las células HEK293 en suspensión se diluyeron en los medios libres de suero 2 hasta 1×10^6 y 2×10^6 células viables/ml para conseguir un volumen de cultivo celular final de 30 ml. En este conjunto de experimentos se utilizaron 1, 1,5 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de ADN plasmídico. A base de los datos mostrados en la Fig. 2A, fue evidente que la producción de vector de VAAr era mejor cuando la densidad celular era de 1×10^6 células viables/ml en el momento de la transfección, utilizando 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de ADN plasmídico.

Tabla 2

Muestras	% de GFP, 24 h	Rendimiento de vector total	Gv/célula
Medios libres de suero 1	45,7	$1,27 \times 10^{12}$	$4,2 \times 10^4$
Medios libres de suero 2	73,6	$6,50 \times 10^{12}$	$2,2 \times 10^5$

25 Las células HEK293 en suspensión se pasaron varias veces y cuando estuvieron disponibles células de pase bajo, medio y alto, se transfectaron para determinar si la antigüedad del cultivo celular impactaba sobre la eficacia de transfección y la producción de VAAr. Como se muestra en la Fig. 2B, la antigüedad del cultivo celular no afecta la eficacia de transfección, pero la producción de VAAr por célula disminuye a lo largo del tiempo, lo que sugiere que el clon de células HEK293 en suspensión que se cultivó debía usarse hasta un máximo de 30-40 pases.

30 Ejemplo 5

Purificación de serotipos de VAAr utilizando cromatografía en columna

35 Junto con la optimización de la producción de VAAr en células HEK293 en suspensión, se decidió que otro foco debía ser la purificación de VAA. Se deseó desarrollar una estrategia de purificación universal para todos los tipos del VAA. Estudios anteriores informaron que a través del uso de la cromatografía en columna podía llevarse a cabo la purificación de serotipos distintos. Por lo tanto, se pensó que podría utilizarse la cromatografía en columna para purificar todos los serotipos a través de la modulación de parámetros específicos durante las etapas de unión y elución. Como se ilustra en la Fig. 3, utilizando métodos de cromatografía en columna se recogieron fracciones de elución elevadamente puras. Este protocolo universal se utilizó para purificar todos los serotipos y cápsides químicas del VAA.

Ejemplo 6

45 Producción y purificación de los serotipos de VAAr 1-6, 8 y 9 monocatenarios y autocomplementarios

Como se describe en el Ejemplo 1, se transfectaron volúmenes de cultivo 1 litro utilizando los parámetros de transfección optimizados, para generar los serotipos de VAAr 1-6, 8 y 9 monocatenarios y autocomplementarios, que empaquetan casetes transgénicos de CMV-GFP. Como se muestra en la Tabla 3, la eficacia de la transfección (a base de citometría de flujo de GFP) fue casi equivalente entre todas las transfecciones. Todos los serotipos que empaquetaron un genoma monocatenario generaron alrededor de y aproximadamente 1×10^5 gv/célula. Excluyendo el VAAr4, todos los serotipos de VAAr monocatenarios probados generaron de $8,2 \times 10^{12}$ a $3,3 \times 10^{13}$ VAAr total a partir de 1 litro de cultivo celular pospurificación y estaban relativamente libres de cualquier proteína que no fuera VP1, VP2 y VP3, como se representa en la tinción de plata en la Fig. 4A. Es bien sabido que las preparaciones de vector autocomplementario producen menos partículas que contienen vector totales que sus contrapartes monocatenarias, y habitualmente están compuestas por concentraciones variables tanto de genomas autocomplementarios (dímero) como monocatenarios (monómero) (McCarty *et al.*, Gene Ther. 8: 1248 (2001)). Otra vez, excluyendo al VAAr4, todos los serotipos de VAAr autocomplementarios probados generaron de $4,0 \times 10^{12}$ a $1,3 \times 10^{13}$ VAAr totales a partir de 1 litro de cultivo celular pospurificación. Como se muestra en la Fig. 4B, las partículas de VAAr empaquetaron de forma eficaz un elevado porcentaje de genomas autocomplementarios. Cuando se generaron vectores de VAAr autocomplementarios adicionales con diversos casetes transgénicos, una mayoría de los genomas empaquetados

fueron autocomplementarios, lo que indica que estos resultados no son exclusivos para los casetes de GFP autocomplementarios.

5 No se ha encontrado una línea celular universal que sea permisiva para la mayoría de los serotipos de VAA. Sin embargo, todos los serotipos probados pueden transducir en grados diversos una línea celular HeLa modificada llamada HeLaRC-32 (Chadeuf *et al.*, J. Gene Med. 2: 260 (2000)). La línea celular contiene integrado un gen rep y cap del VAA2 y, durante la transfección con adenovirus (dl309), se replicará cualquier gen de vector flanqueado por las ITR del VAA2. El número aumentado de copias del genoma suscitará una expresión más robusta del gen de interés, en este caso de GFP, lo que después puede visualizarse y contarse utilizando microscopía de fluorescencia.

10 Después, se calculan las unidades de transducción (UT) a base de la dilución y multiplicando el número promedio de recuentos/campo por el número total de campos por pocillo al aumento específico. En la Tabla 3 es evidente que existe entre serotipos una variedad de proporciones gv:UT que muy probablemente se debe a la variedad de permisividad de las células HeLaRC-32 para cada serotipo. Esto podría ser al nivel de unión y de entrada y/o de tránsito dentro de la célula. Estos experimentos de transducción se repitieron varias veces y las proporciones de transducción con respecto a las partículas se mantuvieron consistentes. Por lo tanto, los ensayos de transducción tales como este, o similares a este, pueden utilizarse solo como una guía o una herramienta de medición para determinar de forma cualitativa si una preparación de un serotipo de VAAr específico cumple un criterio de aceptación específico establecido por el investigador. Como se esperaba, los vectores de VAAr autocomplementarios fueron más infecciosos que los vectores de VAAr monocatenarios. Como se describe en Aucoin *et al.*, debido a la diversidad de ensayos empleados para cuantificar la infectividad la comparación de los datos de transfección o infectividad entre publicaciones debería hacerse con cuidado (Aucoin *et al.*, Biotechnol Adv. 26: 73 (2008)).

Tabla 3

Vector	Eficacia de Transfección (%)	gv/célula* del lisado	gv/l totales pospurificación	Gv:UT
VAA1 CMV-GFP	73,8	$9,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^{13}$	45
VAA2 CMV-GFP	71,2	$2,1 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{13}$	155
VAA3 CMV-GFP	74,5	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{13}$	8
VAA4 CMV-GFP	75,6	$8,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^{12}$	14684
VAA5 CMV-GFP	74,3	$1,9 \times 10^5$	$2,8 \times 10^{13}$	137
VAA6 CMV-GFP	73,6	$5,7 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{12}$	17
VAA8 CMV-GFP	74,4	$1,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{13}$	716
VAA9 CMV-GFP	73,0	$2,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{13}$	1350
VAA1mc CMV-GFP	78,5	$4,2 \times 10^4$	$5,3 \times 10^{12}$	15
VAA2mc CMV-GFP	76,6	$1,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{13}$	88
VAA3mc CMV-GFP	79,9	$6,5 \times 10^4$	$7,4 \times 10^{12}$	9
VAA4mc CMV-GFP	78,2	$4,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^{12}$	9605
VAA5mc CMV-GFP	76,6	$9,3 \times 10^4$	$8,7 \times 10^{12}$	50
VAA6mc CMV-GFP	77,5	$6,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10^{12}$	11
VAA8mc CMV-GFP	78,2	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{13}$	651
VAA9mc CMV-GFP	76,4	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{13}$	936

25 Para confirmar la pureza global del VAAr monocatenario y autocomplementario, se tomaron imágenes de cada serotipo utilizando microscopía electrónica de transmisión (MET) de tinción negativa (Fig. 5). Es bien sabido que cuando se produce VAAr con cualquiera de las tecnologías de producción actuales se genera una gran cantidad de partículas vacías. Se necesita descubrir procedimientos que eliminen de forma eficaz las partículas vacías a partir de las partículas llenas. La MET de tinción negativa es uno de un par de métodos para determinar la proporción de partículas vacías con respecto a las llenas. Las partículas vacías toman la tinción negativa (acetato de uranilo al 2 %) de forma distinta que las partículas llenas, lo que hace posible cuantificar el número de partículas llenas y vacías en una preparación de vector. El otro es un método basado en ELISA, que utiliza un anticuerpo específico de cápside que reconoce tanto partículas llenas como vacías. Después, para determinar la proporción de cápsides vacías con respecto a las llenas, los títulos por qPCR o transferencia puntual se sustraen del título de partículas totales generado a partir del ELISA. Aún tienen que establecerse anticuerpos de cápside para la mayoría de los serotipos del VAA y caracterizarse para su uso en un ELISA. Como se representa en la tabla incluida en la Fig. 5, la proporción de partículas llenas con respecto a las vacías global fue de no menos de 10, sugiriendo que el procedimiento de purificación eliminó las partículas vacías de forma eficaz. También se utilizaron las imágenes por MET de tinción negativa para determinar la eficacia de la solución de almacenamiento final en evitar la agregación de las partículas de VAAr. Está claro que el tampón de almacenamiento final tiene la capacidad de evitar la

agregación de las partículas de VAAr, lo que muy probablemente afecte la infectividad y la propagación del vector cuando se suministra *in vivo*.

Ejemplo 7

5

Comparación *in vivo* del VAAr generado a partir de células HEK293 adherentes y en suspensión

10

15

Utilizando células HEK293 adherentes y células HEK293 en suspensión se generaron los vectores VAA6, 8 y 9 CBA-Luc. Los vectores producidos en células adherentes se purificaron utilizando gradientes de CsCl (Grieger *et al.*, Nat. Protoc.1: 1412 (2006)) y los vectores producidos en células en suspensión se purificaron utilizando los métodos optimizados descritos en el presente documento. Antes de los estudios *in vivo*, los vectores se titularon en la misma transferencia puntual. Las células HeLaRC32 se infectaron con diluciones en serie de cada vector y se cuantificó la expresión génica utilizando un ensayo de luciferasa. A base del ensayo de transducción *in vitro*, la transducción entre serotipos fue casi equivalente entre las estrategias de purificación. Se inyectaron en cada ratón 1×10^{11} gv totales de cada serotipo de vector CBA-Luc, a través de una inyección en la vena de la cola. Se tomaron imágenes de los ratones a la semana y al mes posinyección (Fig. 6). Está claro que el tropismo y los perfiles de transducción de cada serotipo de vector probado eran similares y no estaban afectados por los métodos de purificación.

Ejemplo 8

20

Producción de VAAr utilizando biorreactores por ondas

25

30

35

40

Se optimizaron los parámetros de producción para generar VAAr en matraces agitadores utilizando medios de suspensión libres de componentes animales. La siguiente etapa fue trasladar los parámetros optimizados para el biorreactor por ondas a diversos volúmenes de cultivo celular para determinar la capacidad de cambio de escala. La Tabla 4 ilustra varias ejecuciones en el biorreactor por ondas que variaban de tamaño de 4,3 a 10 litros de cultivo celular, generando distintos vectores de serotipo. Cuando fue posible, se transfectó un cultivo de 1 litro en un frasco agitador para que sirva como un control para comparar la eficacia de transfección si se producía un vector de GFP así como para comparar la producción de vector por litro de cultivo pospurificación. La eficacia de transfección fue casi equivalente entre matraces y bolsas de biorreactor por ondas. Cabe destacar que los plásmidos de GFP inducidos por CMV mostraron de forma consistente porcentajes más elevados de células que expresaban GFP que los plásmidos de GFP inducidos por el promotor CBA y mini CBA (CBh), pero generaron rendimientos casi equivalentes de vector por litro de cultivo. Esto sugiere que la eficacia de transfección entre los plásmidos de GFP con CMV y CBA fue similar, pero en células HEK293 la transcripción difiere entre los promotores. Como se evidencia en los matraces, la mayoría de las ejecuciones del biorreactor por ondas generaron 1×10^{13} vectores de VAAr purificados por litro de cultivo, lo que estableció que los parámetros optimizados para la transfección y la producción de VAAr en matraces agitadores se traslada a los biorreactores por ondas. En la mayoría de las ejecuciones de producción del biorreactor por ondas de 10 litros, se generaron más de 1×10^{14} vectores de VAAmc purificados. Cuando se tiene en cuenta la diferencia de escala, en volúmenes de cultivo de 10 litros se habrían generado en el biorreactor por ondas más de 1×10^{14} VAAmc purificado (a base del VAA2 y del VAA9 en la Tabla 4).

Tabla 4

Vector	Volumen de cultivo celular en el matraz	Volumen de cultivo celular en la bolsa del biorreactor por ondas	Eficacia de transfección 24 h	Rendimiento de gv total	Gv/l
VAA2 CMV-GFP	1 l		78,3 %	$2,3 \times 10^{13}$	$2,3 \times 10^{13}$
		5 l	75,0 %	$1,4 \times 10^{14}$	$2,7 \times 10^{13}$
VAA9 CBA-GFP	4 l		64,6 %	$6,7 \times 10^{13}$	$1,7 \times 10^{13}$
VAA9 CBA-GFP		4,3	63,4 %	$4,3 \times 10^{13}$	$1,0 \times 10^{13}$
VAA2i8mc CMV GFP	1 l		83,5 %	$1,2 \times 10^{13}$	$1,2 \times 10^{13}$
		10 l	94,1 %	$8,8 \times 10^{13}$	$8,8 \times 10^{12}$
VAA2i8mc CMV i1c	8 x 1 l			$1,1 \times 10^{14}$	$1,4 \times 10^{13}$
		10 l	82,4 %	$6,7 \times 10^{13}$	$6,7 \times 10^{12}$
VAA9mc CMV-GFP	1 l			$3,1 \times 10^{13}$	$3,1 \times 10^{13}$
		10 l	86,7 %	$2,0 \times 10^{14}$	$2,0 \times 10^{13}$

Vector	Volumen de cultivo celular en el matraz	Volumen de cultivo celular en la bolsa del biorreactor por ondas	Eficacia de transfección 24 h	Rendimiento de gv total	Gv/l
VAA9mc CMV I1c	6 x 1 l			$2,1 \times 10^{14}$	$3,5 \times 10^{13}$
		10 l		$3,0 \times 10^{14}$	$3,0 \times 10^{13}$
		10 l		$2,0 \times 10^{14}$	$2,0 \times 10^{13}$
VAA2.5mc CBh-GFP		8,5 l	60,3 %	$7,2 \times 10^{13}$	$8,5 \times 10^{12}$
VAA9mc CBh-GFP		10 l	65,2 %	$1,4 \times 10^{14}$	$1,4 \times 10^{13}$

Ejemplo 9

Concentración del VAAr

5

10

15

20

25

Determinadas aplicaciones preclínicas y clínicas tales como las inyecciones directas de VAAr en el cerebro o el ojo requieren dosis de volumen bajo/altamente concentradas de VAAr. A través del uso de columnas vivaspin de Sartorius, se optimizaron las condiciones específicas que dieron como resultado VAAr concentrado con poca o ninguna pérdida de partículas e infectividad, como se ilustra en la Tabla 5 (concentración de vectores de luciferasa; comparación de los títulos de vector e infectividad (ensayo de luciferasa) pre y posconcentración) y la Tabla 6 (concentración de vectores de los vectores de GFP; comparación de títulos de vector y unidades de transducción (ensayo de transducción de HeLaRC32) pre y posconcentración). Las columnas utilizan una membrana de PES con un límite de peso molecular de 100 K que permite que el exceso de líquido pase a través del filtro mientras se retienen las partículas de VAAr. Se probaron diversos tamaños de límite de peso molecular, pero no fueron tan eficaces en la retención y concentración de VAAr. Como se muestra en las Tablas 5 y 6, se midió de forma directa un título equivalente del VAAr preconcentrado con un título equivalente al VAAr concentrado. Por lo tanto, si se observara una pérdida en la transducción, las unidades de luz relativas o las unidades de transducción para el VAAr concentrado serían menores que las de VAAr preconcentrado. Después de probar varios serotipos del VAAr no hubo pérdida significativa en el título y la actividad. Por lo tanto, el VAAr concentrado tenía una actividad casi equivalente que el VAAr preconcentrado, indicando que el virus se había concentrado de forma eficaz. Para confirmar que el título vírico no había cambiado, se evaluaron los gv y las gv/ml mediante transferencia puntual. Cuando las gv totales eran las mismas, gv/ml era con respecto al volumen. Por lo tanto, es posible concentrar vectores de VAAr eliminando volumen a través de centrifugación de baja velocidad utilizando un sistema de filtración con límite de peso molecular lo suficientemente pequeño para retener el VAAr. En correlación con los títulos preconcentración y posconcentración, las imágenes por MET en las Fig. 7A y 7B ilustran un aumento en la concentración de vector. A concentraciones de 1×10^{13} gv/ml la solución de almacenamiento final también tiene la capacidad de evitar la agregación de partículas de VAAr.

Tabla 5

Vector	Muestra	Volumen (ml)	Volumen de infección (μl)	ULR promedio	Título gv/ml	GV Totales
VAA5 CBA-Luc	Pre-Conc	10	10	$1,9 \times 10^4$	$1,2 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{12}$
VAA5 CBA-Luc	Concentrado	2,2	2,2	$1,8 \times 10^4$	$7,4 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{12}$
VAA6 CBA-Luc	Pre-Conc	8,8	8,8	$3,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{12}$
VAA6 CBA-Luc	Concentrado	1	1	$3,7 \times 10^5$	$3,8 \times 10^{12}$	$3,8 \times 10^{12}$
VAA9 CBA-Luc	Pre-Conc	10	10	$4,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{12}$
VAA9 CBA-Luc	Concentrado	1	1	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^{12}$	$2,0 \times 10^{12}$
VAA2i8mc CMV-IIc	Pre-Conc	16,6			$3,7 \times 10^{12}$	$6,1 \times 10^{13}$
VAA2i8mc CMV-IIc	Concentrado	6				$5,6 \times 10^{13}$

30

Tabla 6

Vector	Muestra	Volumen (ml)	Título gv/ml	GV Totales	Proporción GV/UT
VAA2.5mc CBh-GFP	Pre-Conc	17	$3,7 \times 10^{12}$	$6,3 \times 10^{13}$	48:1
VAA2.5mc CBh-GFP	Concentrado	6,5	$1,2 \times 10^{13}$	$8,1 \times 10^{13}$	57:1
VAA9mc CBh-GFP	Pre-Conc	22	$5,8 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{14}$	2675:1
VAA9mc CBh-GFP	Concentrado	15	$9,0 \times 10^{12}$	$1,4 \times 10^{14}$	1246:1

Ejemplo 10

Recogida continua de VAAr a partir de los medios en suspensión

5 Como se describe en publicaciones anteriores sobre producción del VAA, en la determinación del mejor punto de tiempo para recoger VAA a partir de células HEK293 adherentes, se demostró recientemente cual es el punto de tiempo óptimo para recoger VAA a partir de medios de cultivo celular (Lock *et al.*, Hum Gene Ther 21: 1259 (2010); Vandenberghe *et al.*, Hum Gene Ther 21: 1251 (2010)). Para determinar si el VAA puede recogerse a lo largo del tiempo (de forma aditiva) a partir de los medios, los inventores transfectaron cultivos de 30 ml de células HEK293 en suspensión para producir vectores CMV-eGFP de VAAr8 y VAAr9, utilizando los parámetros optimizados descritos en el presente documento. Cuarenta y ocho horas postransfección, los cultivos celulares se sedimentaron mediante centrifugación de baja velocidad y los medios se retiraron para la titulación, mediante transferencia puntual y qPCR, de las partículas resistentes a ADNasa. Después, los sedimentos celulares se resuspendieron en medios sin suero recién preparados y se colocaron de vuelta en el incubador de agitación para el cultivo y la producción continua de VAAr. Después, se tomaron muestras de los medios cada 24 horas y los medios se reemplazaron cada 48 horas. En el punto de tiempo de 120 horas, se determinaron los títulos de VAAr8 y VAAr9 a partir tanto de los medios como de los sedimentos celulares. Como se muestra en la Fig. 9, VAAr8 y VAAr9 pueden detectarse y recogerse a partir de los medios 48 horas postransfección, encontrándose en los medios cantidades crecientes de vector a medida que pasa el tiempo y se reemplazan los medios. Cuando en la Fig. 9 se compara el rendimiento total con respecto al control de sedimento celular de 48 h, el método de recogida continua produjo 6,5 y 4,8 veces más de vector VAAr8 y VAAr9, respectivamente. Este es el primer informe de recogida continua de VAAr a partir de medios de suspensión en numerosos puntos de tiempo postransfección utilizando un sistema libre de componentes animales que se puede cambiar de escala. Después, este procedimiento se adaptó a la escala de biorreactor utilizando una bolsa de biorreactor por ondas de perfusión de 2 l. Para generar vector VAAr8 se transfectó un cultivo celular de 1 l. Utilizando una bomba peristáltica se retiraron en cada punto de tiempo 800 ml de cultivo celular (48, 72, 96, 120 y 144 h) a través del filtro de perfusión dentro de la bolsa del biorreactor por ondas. Después, se añadieron otra vez a la bolsa de ondas 800 ml de medio de cultivo celular en suspensión libre de componentes animales recién preparado. Después, se concentró el medio recogido utilizando FFT, seguido de clarificación y de purificación por cromatografía en columna. La Tabla 7 muestra los rendimientos de vector VAAr8 del biorreactor por ondas de perfusión en puntos de tiempo específicos (48, 72, 96, 120 y 144 h) a partir del medio de cultivo así como a partir de sedimento celular de 144 h. VAAr8 purificado total denomina la suma de los rendimientos de VAAr8 de los medios de 48, 72, 96, 120, 144 h y del sedimento celular de 144 h. Los rendimientos de VAAr de 48 horas típicos representan intervalos de rendimiento logrados de forma típica para VAAr8 cuando se recoge a partir de sedimento celular a las 48 horas. Como se muestra en la Tabla 7, VAAr8 se puede recoger en todos los puntos de tiempo utilizando la bolsa de biorreactor por ondas de perfusión. El VAAr8 total recogido utilizando la bolsa de biorreactor por ondas de perfusión conduce a rendimientos 5-10 veces más grandes que los rendimientos de sedimento celular de 48 horas típicos. Este es el primer informe de VAAr recogido de forma continua a partir de medios de suspensión utilizando un biorreactor en numerosos puntos de tiempo postransfección utilizando una tecnología de producción libre de componentes animales que se puede escalar y células en suspensión. Esto permitirá al fabricante utilizar un cultivo en suspensión libre de componentes animales para producir, recoger y purificar VAAr de forma continua a partir de los medios de cultivo a todas las escalas, a través de una única transfección. A su vez, esto generaría más VAAr a partir de una cantidad equivalente de plásmido de entrada que el protocolo de producción convencional, en donde el procedimiento de producción se detiene cuando las células se recogen a las 48-96 horas postransfección. Un experto en la materia comprenderá que para superar las 144 horas se necesitaría aumentar la viabilidad celular y mantener la producción de vector entre los puntos de tiempo. Dependiendo de las funciones del auxiliar de VAA y de la viabilidad celular, un experto en la materia podría extender esto a la generación de líneas celulares estables para la generación de VAAr utilizando un sistema que se pueda regular para activar o desactivar la producción a base de la viabilidad celular y de los rendimientos de vector, etc.

50

Tabla 7

Puntos de tiempo (horas)	VAA8 purificado
48	$1,4 \times 10^{13}$
72	$2,9 \times 10^{13}$
96	$3,0 \times 10^{13}$
120	$1,5 \times 10^{13}$
144	$9,0 \times 10^{12}$
sedimento celular de 144	$8,6 \times 10^{12}$
VAA8 purificado total	$1,1 \times 10^{14}$
Rendimientos de 48 h de VAA8 típicos	$1,0 \times 10^{13}$ a $2,0 \times 10^{13}$

55

Se han realizado a nivel mundial varios ensayos clínicos de Fase I y Fase II para enfermedades hereditarias y adquiridas utilizando VAA (Aucoin *et al.*, Biotechnol Adv. 26: 73 (2008), Mueller *et al.*, Gene Ther., 15: 858 (2008)). El aumento del número de ensayos clínicos enfatiza la necesidad de establecer una tecnología de fabricación que se puede cambiar de escala, que pueda generar de forma eficaz cantidades importantes de VAA, de título elevado y

altamente puro para satisfacer la creciente demanda clínica. Se ha persistido en varias estrategias de producción de vector de VAAr, que incluyen el empaquetamiento de líneas celulares que contienen los genes rep y cap del VAA, líneas celulares províricas estables y la transfección transitoria de múltiples plásmidos en células HEK293 adherentes. La transfección transitoria de células HEK293 adherentes continúa siendo el método más ampliamente
 5 utilizado para la producción de VAAr y representa la mayoría del VAAr administrado en las aplicaciones preclínicas y clínicas. La siguiente etapa fue adaptar la tecnología de transfección transitoria a una tecnología que se pueda cambiar de escala, transfecando células HEK293 que tengan la capacidad de crecer en condiciones en suspensión libre de componentes animales. Algunos estudios han notificado la producción de VAAr utilizando células HEK293 en suspensión (Durocher *et al.*, J. Virol. Meth. 144: 32 (2007), Hildinger *et al.*, Biotechnol., Lett. 29: 1713 (2007), Park
 10 *et al.*, Biotechnol, Bioeng. 94: 416 (2006)), pero los rendimientos de vector (aproximadamente $1,4 \times 10^4$ y 3×10^4 gv/célula) continúan siendo un impedimento para la tecnología de transfección transitoria de células HEK293 en suspensión.

La presente divulgación detalla una tecnología de fabricación por transfección transitoria que se puede cambiar de
 15 escala robusta, utilizando una línea celular HEK293 que puede crecer en condiciones en suspensión libre de componentes animales y generar rendimientos de VAAr más elevados por célula que el sistema de vector de expresión de baculovirus, y rendimientos comparables por célula con la reciente tecnología de infección por VHSr. Se adaptó para el cultivo en condiciones en suspensión libre de componentes animales un clon de células HEK293 adherentes, seleccionado por la eficacia de transfección (>70 %) y la producción de vector de VAAr elevadas. Se exploraron varios medios de suspensión sin suero disponibles de forma comercial para seleccionar los que sustentaban el crecimiento y una eficacia de transfección elevada. Se encontró que un medio de suspensión libre de
 20 componentes animales sustentaba el mejor crecimiento, una eficacia de transfección elevada y rendimientos de vector de VAAr elevados (Tabla 2 y Fig. 2 y 4). Además de identificar los medios óptimos se optimizaron varias variables. Utilizando los parámetros optimizados es posible generar a partir de 1 litro de medio de cultivo celular, más de 1×10^5 genomas de vector que contienen VAAr por célula y más de 1×10^{13} genomas de vector purificados que contienen VAAr. Esto se validó a partir de cultivos celulares de 30 ml a 1 l, en matraces agitadores, y hasta volúmenes de 10 l en bolsas de biorreactor por ondas (véase la Tabla 3), lo que ilustra que esta tecnología se puede
 25 cambiar de escala. Además, se demostró que el VAAr puede recogerse de forma continua a partir de los medios de suspensión libres de componentes animales, a diversos puntos de tiempo postransfección, utilizando matraces agitadores y bolsas de biorreactor por ondas de perfusión, aumentando de forma significativa los rendimientos de VAAr globales a partir de un volumen de cultivo celular y de plásmido de entrada equivalente.

El VAAr se purificó a partir de lisado celular utilizando un gradiente de densidad discontinuo seguido de
 35 cromatografía en columna. Se optimizó la capacidad de carga del gradiente discontinuo para determinar la cantidad máxima de lisado que se podía clarificar de forma eficaz (eliminación eficaz de contaminantes de proteína) antes de la cromatografía en columna. Se optimizaron los tampones de cromatografía en columna para desarrollar un sistema de purificación universal para unir y eluir de forma eficaz todos los serotipos y cápsides quiméricas del VAA (probados hasta la fecha). A través de un extenso trabajo de desarrollo del procedimiento, fue posible eliminar los contaminantes de proteína principales y menores a través de una manipulación simple de los tampones de
 40 cromatografía, sin afectar los perfiles de unión y de elución para todos los serotipos y cápsides quiméricas de VAA (tinciones de plata de referencia en las Fig. 3 y 4). A través de un procedimiento que muy probablemente se relaciona con el uso del gradiente de densidad discontinuo y de la cromatografía en columna, se elimina una cantidad significativa de partículas vacías dejando en el producto final un elevado porcentaje de VAAr que contiene genoma (Figura 5). En resumen, los VAAr generados están altamente puros, tienen una proporción elevada de
 45 cápsides llenas con respecto a las vacías, y tienen una proporción de genomas con respecto a la infectividad (a base del ensayo de recuento de fluorescencia de GFP) similar a los vectores generados utilizando los métodos anteriores de producción (células HEK293 adherentes) y purificación (Aucoin *et al.*, Biotechnol, Adv. 26: 73 (2008)).

Se han desarrollado para la producción de VAAr varios sistemas que se pueden cambiar de escala, los cuales
 50 incluyen métodos a base de adenovirus, a base de VHSr, a base de SVEB y a base de transfección transitoria. En comparación, la presente tecnología de transfección transitoria que se puede cambiar de escala utilizando células HEK293 en suspensión genera más VAAr y más VAAr infeccioso por célula que las tecnologías de VAAr a base de adenovirus y de SVEB, y rendimientos comparables con la tecnología de producción a base de VHSr. Además, el tiempo global invertido para generar VAAr utilizando este sistema es nominal (Fig. 8).

55

REIVINDICACIONES

1. Una célula HEK293 aislada depositada como ATCC n.º PTA-13274.
- 5 2. Un método de producción de partículas de VAA, que comprende:
- (a) proporcionar a las células HEK293 de la reivindicación 1 un sistema de expresión de VAA;
 - (b) cultivar las células en condiciones en las cuales se producen partículas de VAA; y
 - (c) de forma opcional aislar las partículas de VAA.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, en el que las células se cultivan en suspensión.
4. El método de la reivindicación 2 o 3, en el que las células se cultivan en condiciones libres de componentes animales.
- 15 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la etapa (c) comprende aislar las partículas de VAA de las células.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la etapa (c) comprende aislar las partículas de VAA del medio en el cual se cultivan las células.
- 20 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que las células se cultivan en matraces agitadores.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que las células se cultivan en biorreactores.
- 25 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que el método tiene la capacidad de producir todos los serotipos, quimeras e híbridos de VAA.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en el que dicho VAA se selecciona del grupo que consiste en VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11, VAA12 y VAA13, o un VAA quimérico que consta de VAA1-13 2.5, 2i8, 9.45 y de otras cápsides quiméricas o híbridas.
- 30 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en el que dicho sistema de expresión de VAA comprende un plásmido de VAA recombinante que comprende un transgén, un plásmido que contiene *rep-cap* de empaquetamiento y un plásmido auxiliar de adenovirus.
- 35 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho transgén es un gen indicador, terapéutico, inmunogénico o de diagnóstico.
- 40 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en el que el método proporciona al menos aproximadamente 4×10^4 partículas que contienen un genoma de vector por célula antes de la purificación.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en el que el método proporciona al menos aproximadamente 1×10^5 partículas que contienen un genoma de vector por célula antes de la purificación.
- 45 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en el que el método proporciona al menos aproximadamente 1×10^{12} partículas purificadas que contienen un genoma de vector por litro de cultivo celular.
- 50 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-15, en el que el método proporciona al menos aproximadamente 1×10^{13} partículas purificadas que contienen un genoma de vector por litro de cultivo celular.

Figura 1

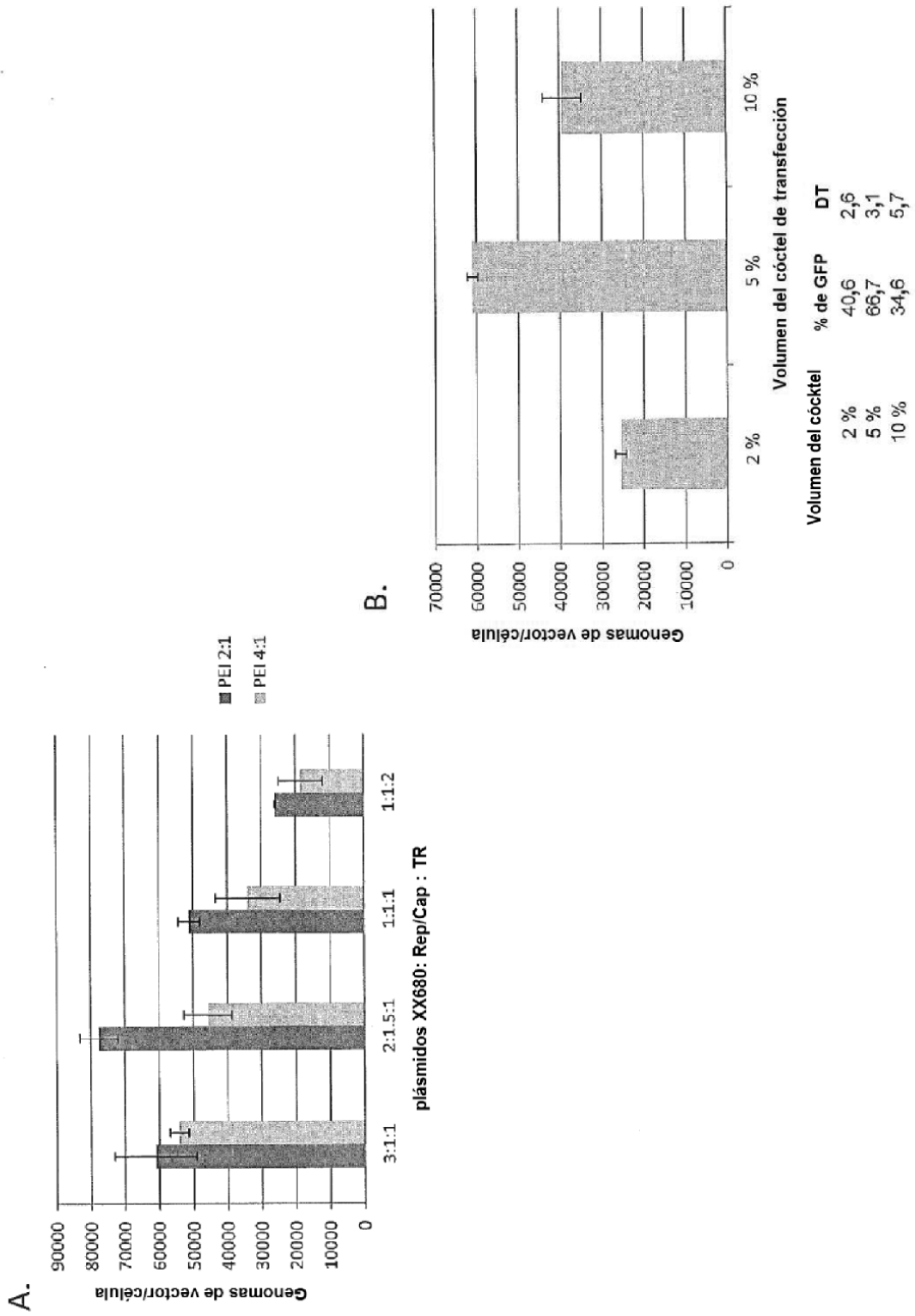


Figura 2

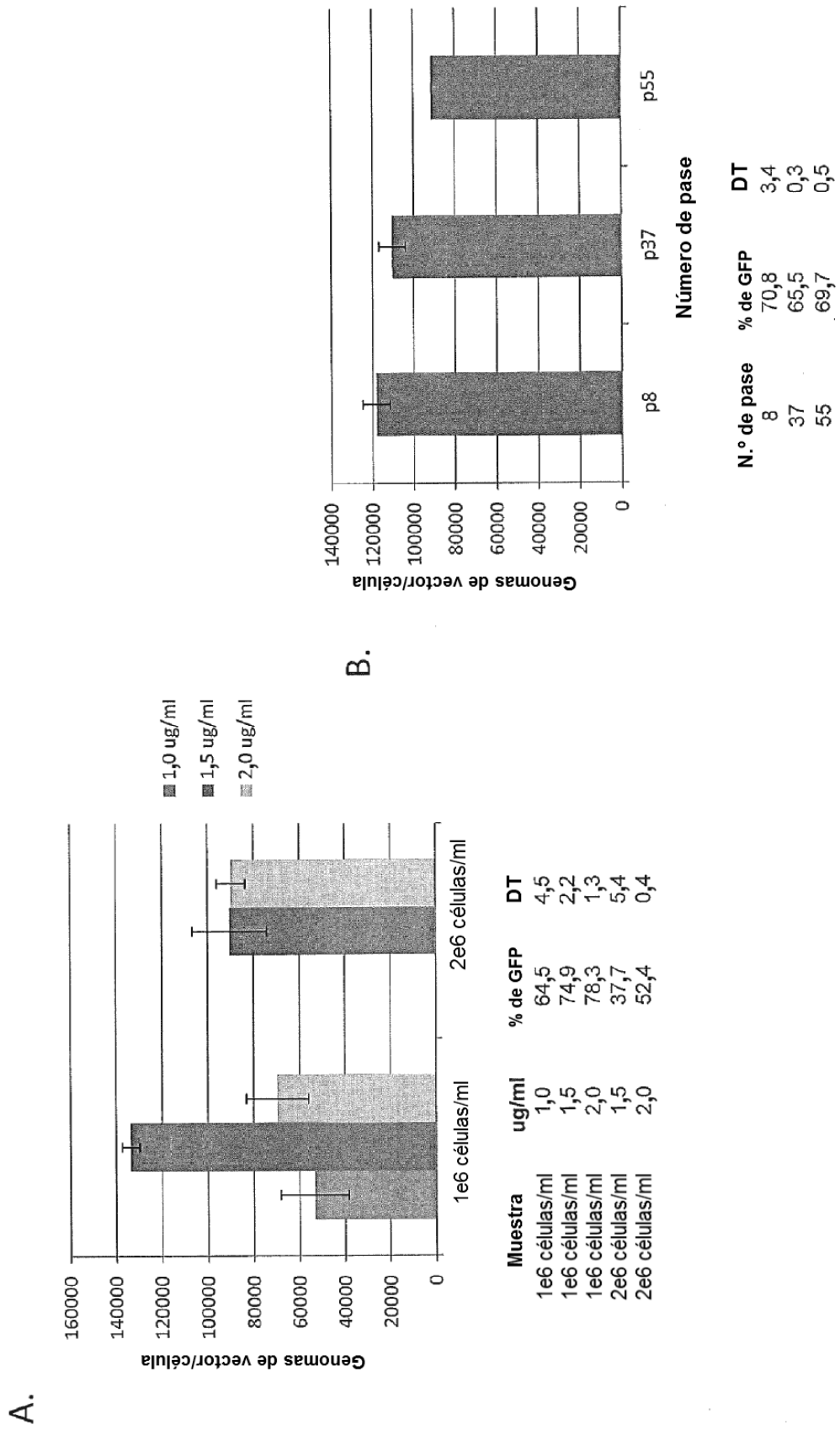
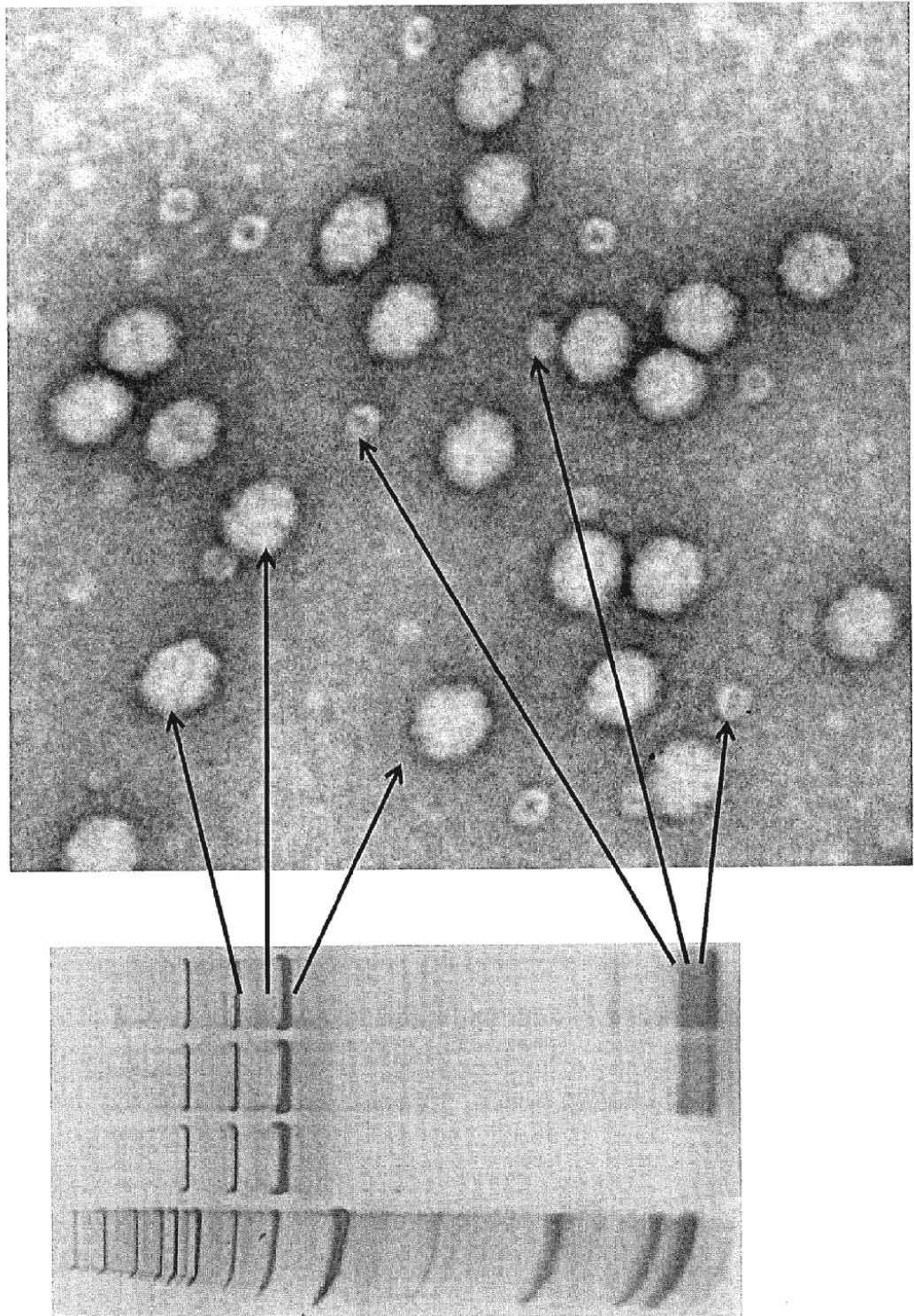


Figura 3A



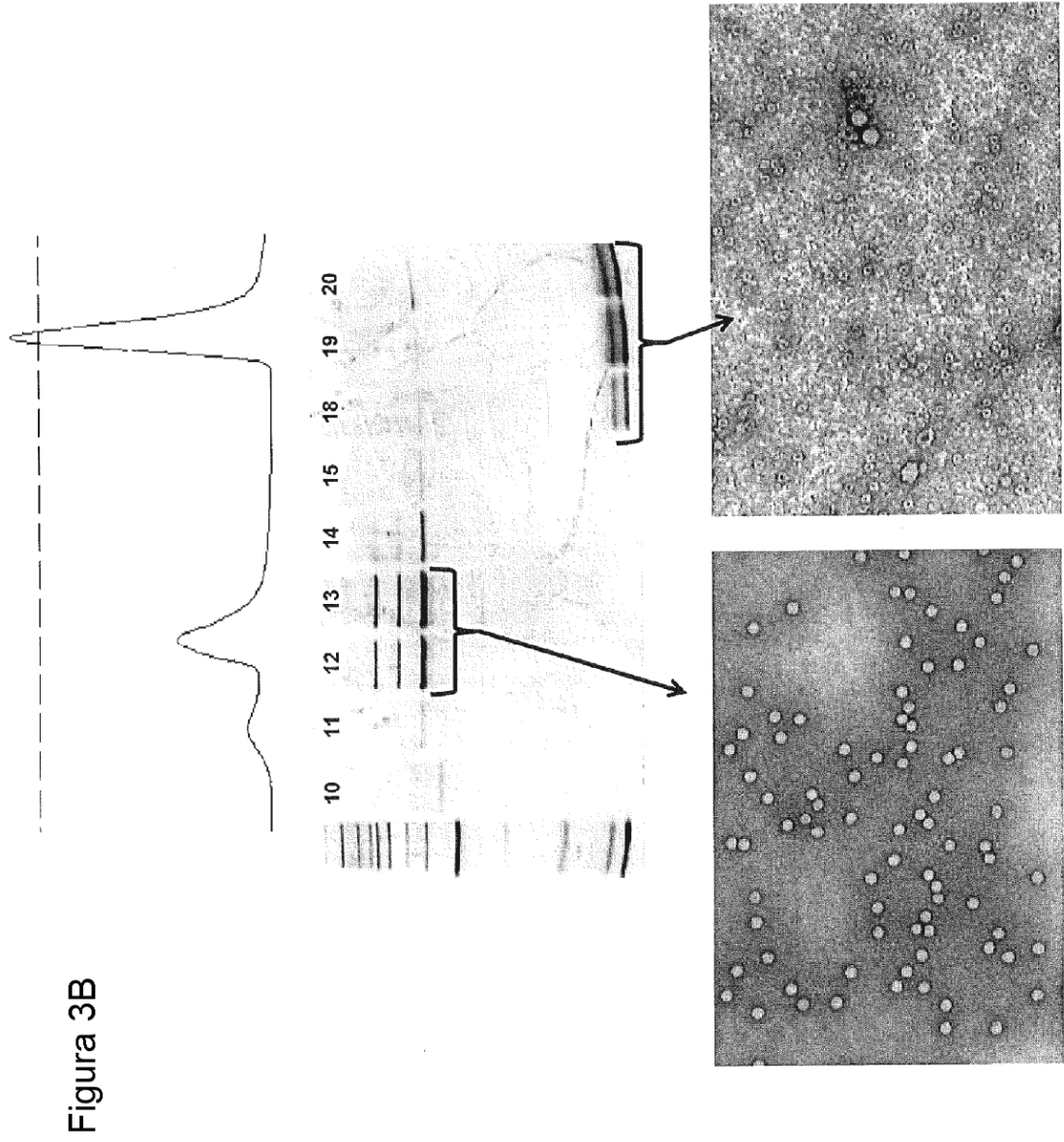
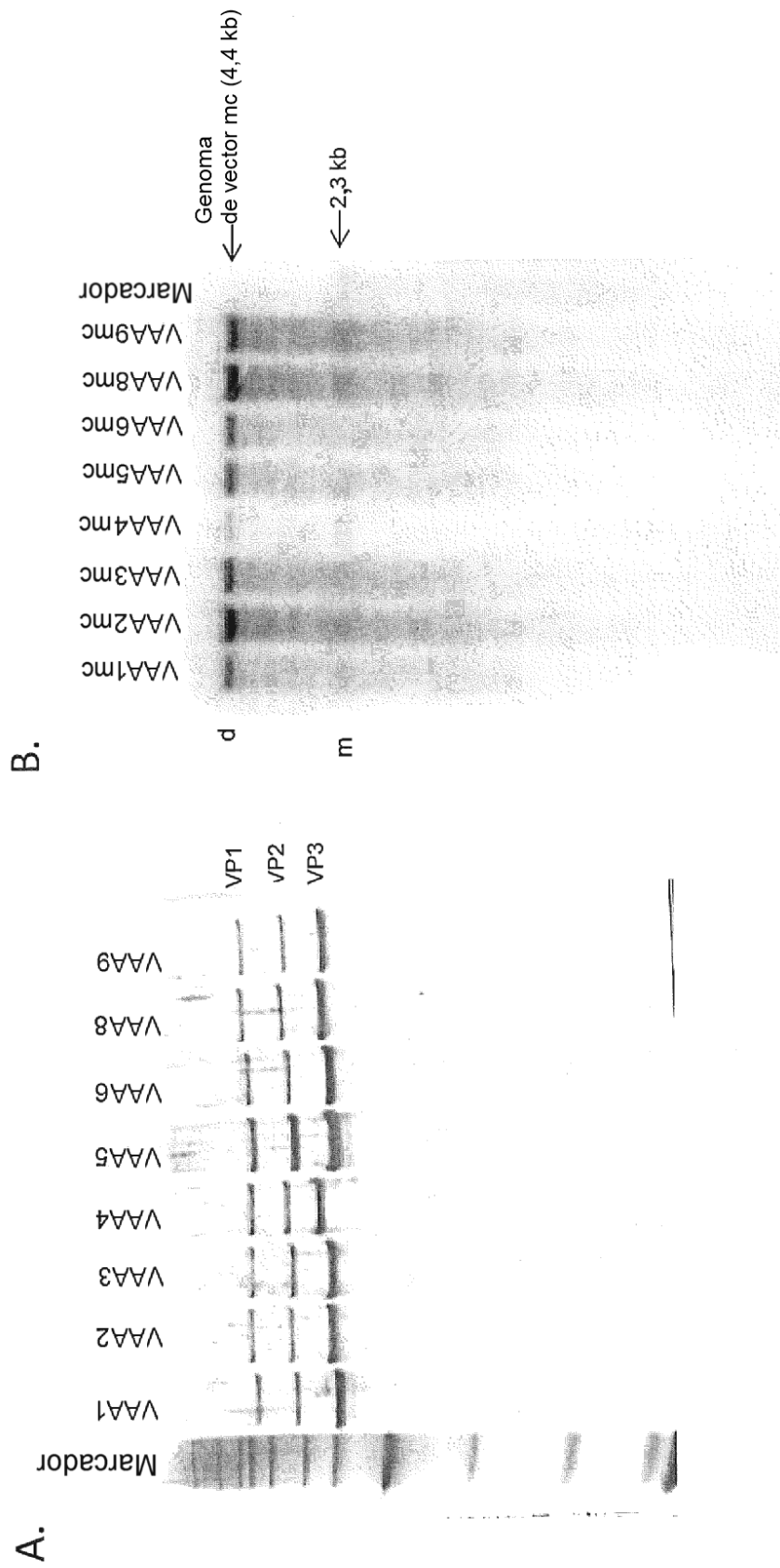


Figura 4



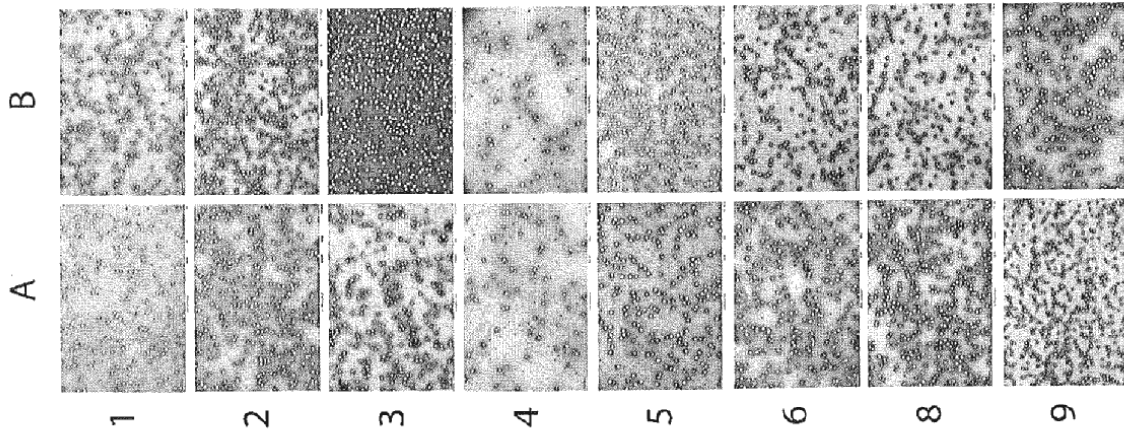


Figura 5

Serotipo	Monocatenario			Autocomplementario		
	Llenas	Vacias	Proporcion LL:V	Llenas	Vacias	Proporcion LL:V
1	151	5	30,2	298	3	99,3
2	289	11	26,3	608	14	43,4
3	258	24	10,8	549	46	11,9
4	64	1	64,0	42	3	14,0
5	199	11	18,1	486	23	21,1
6	240	6	40,0	240	7	34,3
8	409	3	136,3	289	28	10,3
9	570	25	22,8	252	8	31,5

Figura 6

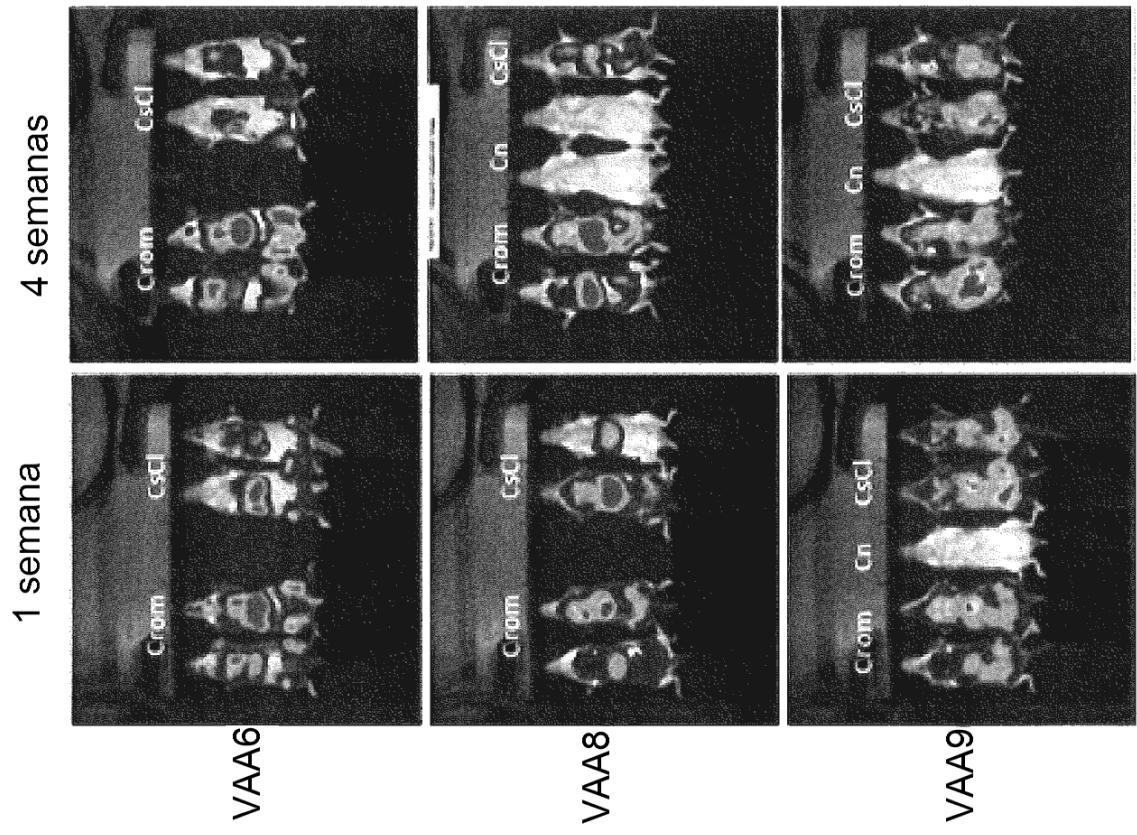
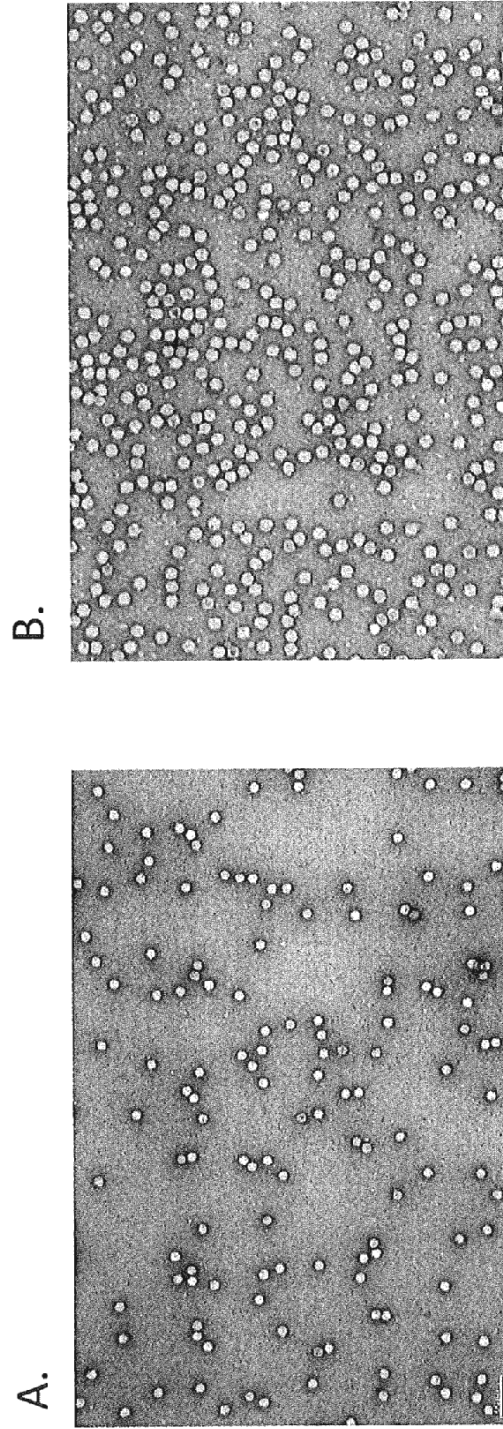


Figura 7



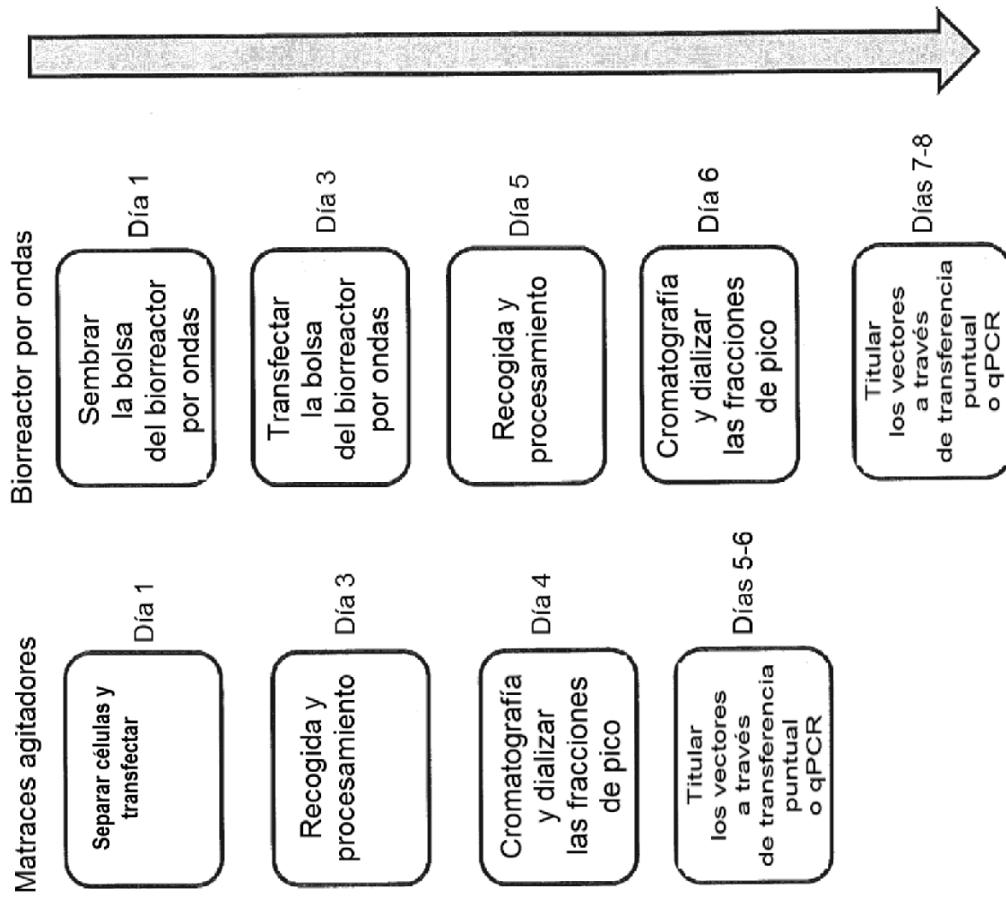


Figura 8

Figura 9

