

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 851**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2009 PCT/GB2009/001527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO2009153563**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2009 E 09766124 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2307551**

54 Título: **Purificación de vectores retrovirales**

30 Prioridad:

18.06.2008 US 73685 P

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

22.06.2017

73 Titular/es:

**OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)
Medawar Centre
Robert Robinson Avenue Oxford Science
Park Oxford, OX4 4GA, GB**

72 Inventor/es:

**TRURAN, RICHARD;
BUCKLEY, ROBERT;
RADCLIFFE, PIPPA;
MISKIN, JAMES y
MITROPHANOUS, KYRI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 618 851 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

Purificación de vectores retrovirales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos mejorados de producción y purificación de vectores retrovirales.

Antecedentes de la invención

10 El éxito de las técnicas de terapia génica depende de la capacidad para conseguir suficiente expresión de genes transferidos de una manera segura para seres humanos. Se usan con frecuencia retrovirus como un sistema de suministro (expresado de otro modo como un vehículo de suministro o vector de suministro) para, entre otros, la transferencia de un nucleótido de interés (NOI), o una pluralidad de NOI, a uno o más sitios de interés. También ha
15 habido un interés considerable en el desarrollo de sistemas de vectores lentivirales debido a que los lentivirus son capaces de infectar células que no están en división (Lewis y Emerman (1993) J. Virol. 68: 510). Además los vectores lentivirales permiten expresión a largo plazo muy estable del gen de interés. Se ha mostrado que esta es de al menos un año para células neuronales de rata transducidas *in vivo* (Bienemann *et al.* (2003) Mol. Ther. 5: 588).

20 El proceso de purificación de vector es una etapa importante en las terapias de transferencia génica clínica, y está ligado directamente a la seguridad y eficacia con respecto a pureza y título. En la mayoría de aplicaciones experimentales de pequeña escala, los vectores pueden concentrarse y purificarse por métodos relativamente sencillos usando técnicas de centrifugación. Sin embargo, el aumento de escala de los métodos de purificación para
25 producción a gran escala para uso clínico representa un reto importante. En particular, cuando se considera la producción de vector para uso humano, pueden realizarse etapas adicionales tales como esterilización por filtrado para asegurar la pureza y seguridad de la preparación del vector.

Los métodos de preparación de vectores generalmente comprenden obtener el vector de células que producen
30 vectores bien de forma estable o bien de forma transitoria y purificar el vector viral usando, por ejemplo, cromatografía. En procesos industriales, la etapa final es la etapa de esterilización y se usa habitualmente al menos una etapa de ultrafiltración antes de la etapa de esterilización para concentrar el vector viral y/o para intercambiar el tampón en el que se mantiene el vector viral.

Varias publicaciones describen la purificación de virus de células, analizando principalmente el uso de matrices
35 cromatográficas específicas para purificación del virus de un lisado celular. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.261.823 y Patente de Estados Unidos N.º 5.661.023 desvelan métodos que abarcan el uso de resina de intercambio aniónico solamente mientras que la Patente de Estados Unidos N.º 5.837.520 desvela una combinación secuencial de intercambio aniónico seguido de cromatografía de afinidad. Yamada *et al.* muestran que la purificación de vector lentiviral usando HPLC de intercambio aniónico conduce a mejora de la transferencia génica
40 (Yamada *et al.* (2003) Biotechniques 34(5): 1074-8, 1080).

Sigue existiendo la necesidad de un método de purificación de vector de retroviral a gran escala que produzca producto puro conservando al mismo tiempo altos títulos. La presente invención aborda esta necesidad.

45 Sumario de la invención

Se ha mostrado que, inesperadamente, se pueden conseguir procesos mejorados para producir formulaciones de
50 vectores retrovirales y lentivirales cuando una etapa de esterilización por filtrado no es la etapa final en el proceso de producción. En particular, se ha descubierto que una etapa de esterilización por filtrado que se realiza posteriormente a una etapa de concentración (por ejemplo por ultrafiltración), da como resultado una pérdida considerable de título de vector viral. Esto fue sorprendente ya que el diámetro de partículas retrovirales está en el intervalo de 80-120 nm y deberían pasar fácilmente a través de los poros de un filtro de esterilización; de hecho esto sucede para sobrenadantes de cultivo celular que contienen vectores que se filtran rutinariamente sin pérdida de
55 título funcional observada. No estuvo por lo tanto claro por qué, una vez se había procesado la preparación del vector ya no era posible esterilizar por filtrado la preparación sin pérdida de recuperación.

Además, se descubrió sorprendentemente que pueden obtenerse producciones de partículas de vectores
60 aumentadas si la etapa de concentración final se realiza después de la etapa de esterilización por filtrado. Esto es contrario a los procesos de producción virales establecidos en los que las etapas de concentración se realizan tradicionalmente antes de la etapa de esterilización por filtrado. También se ha descubierto que el mantenimiento de una concentración de partícula de vector adecuada, por ejemplo diluyendo una preparación de partícula de vector, antes de la esterilización por filtrado, también puede mejorar las producciones de partículas de vectores. Es sorprendente que la reducción de la concentración de partículas de vectores durante algunos estadios del proceso puede conducir de hecho en última estancia a producción de producto mejorada.

65

Se apreciará que pueden producirse formulaciones de menor dosis diluyendo de forma aséptica la formulación producida por el proceso de la presente invención.

5 El proceso de producción de la presente invención es preferentemente un proceso a gran escala para producir formulaciones de uso clínico que son adecuadas para la administración a seres humanos como productos terapéuticos.

10 Las formulaciones de vectores retrovirales y lentivirales descritas en el presente documento son preferentemente adecuadas para la administración a seres humanos como productos terapéuticos.

15 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un proceso para producir una formulación de vector retroviral adecuada para la administración a un paciente que comprende una etapa de esterilización por filtrado y una etapa de concentración, en el que la etapa de concentración es la etapa final en el proceso y la etapa de esterilización por filtrado es la penúltima etapa en el proceso, y en el que la etapa de concentración se realiza en condiciones asépticas, y además en el que la etapa de esterilización por filtrado se realiza usando un filtro de esterilización con un tamaño de poro máximo de hasta o igual a 0,22 μm .

Preferentemente el vector retroviral es un vector lentiviral.

20 Preferentemente la etapa de concentración se realiza usando ultrafiltración, preferentemente filtración de flujo tangencial, más preferentemente ultrafiltración de fibra hueca.

25 Preferentemente la etapa de esterilización por filtrado se realiza usando un filtro de esterilización con un tamaño de poro máximo de 0,2 μm .

30 En realizaciones preferidas, para recuperación óptima de partículas de VAIE la concentración del vector debería ser menor que o igual a aproximadamente $4,6 \times 10^{11}$ copias de genoma de ARN por ml de preparación antes de la esterilización por filtrado. El nivel de concentración apropiado puede conseguirse mediante el control de la concentración del vector usando, por ejemplo, una etapa de dilución, si es apropiado. Por lo tanto, en una realización, una preparación de vector retroviral se diluye antes de la esterilización por filtrado. Por lo tanto, si un trabajador experto experimenta recuperación menor de lo esperado de partículas de vector, debería investigar la reducción de la concentración de las partículas de vector antes de la esterilización por filtrado. El nivel de título apropiado para recuperación óptima puede determinarse usando las técnicas descritas posteriormente, y la sección de ejemplos en particular.

35 De acuerdo con una realización de la presente invención se proporciona un proceso para producir una formulación de vector retroviral que comprende las siguientes etapas (i) a (vi) en orden cronológico:

- 40 (i) cultivar células que producen vector retroviral;
(ii) recoger el sobrenadante que contiene vector retroviral;
(iii) clarificar opcionalmente el sobrenadante;
(iv) purificar el vector retroviral para proporcionar una preparación de vector retroviral;
(v) esterilización por filtrado de la preparación de vector retroviral; y
45 (vi) concentrar la preparación de vector retroviral para producir el producto a granel final.

En una realización el proceso no comprende la etapa de clarificación (iii).

En otra realización el proceso sí incluye la etapa de clarificación (iii).

50 Preferentemente la etapa (vi) se realiza usando ultrafiltración o filtración de flujo tangencial, más preferentemente ultrafiltración de fibras huecas.

55 Preferentemente el método de purificación en la etapa (iv) es cromatografía de intercambio iónico, más preferentemente cromatografía de intercambio aniónico.

Preferentemente la esterilización por filtrado en la etapa (v) se realiza usando un filtro de esterilización de 0,22 μm o uno de 0,2 μm .

60 Preferentemente la etapa (iii) se realiza por clarificación por filtrado.

Preferentemente la etapa (iv) se realiza usando un método o una combinación de métodos seleccionados de cromatografía, ultrafiltración/diafiltración o centrifugación.

65 Preferentemente el método de cromatografía o una combinación de métodos se selecciona de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa y cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados.

- Preferentemente, el método de centrifugación se selecciona de centrifugación zonal, centrifugación isopícnica y centrifugación de sedimentación.
- 5 Preferentemente el método de ultrafiltración/diafiltración se selecciona de diafiltración de flujo tangencial, diafiltración celular agitada y diálisis.
- Preferentemente se incluye al menos una etapa en el proceso de la invención para degradar ácido nucleico para mejorar la purificación.
- 10 Preferentemente dicha etapa es tratamiento con nucleasa.
- Preferentemente, dicha nucleasa es Nucleasa Benzonase®.
- 15 Preferentemente se llevan a cabo una etapa o etapas de degradación de ácidos nucleicos en el proceso de la invención en cualquier punto o puntos hasta e incluyendo la etapa (iv).
- Preferentemente la etapa de purificación (iv) del proceso incluye una etapa de intercambio de tampón.
- 20 Preferentemente la etapa (vi) del proceso se realiza usando ultrafiltración.
- Preferentemente la ultrafiltración comprende filtración de flujo tangencial.
- Preferentemente la ultrafiltración comprende ultrafiltración de fibras huecas.
- 25 La esterilización por filtrado de la etapa (v) del proceso se realiza usando un filtro de esterilización con un tamaño de poro máximo de hasta o igual a 0,22 μm .
- Preferentemente el intercambio de tampón comprende intercambio del tampón usado para las etapas precedentes con tampón de formulación.
- 30 Preferentemente el tampón de formulación es una solución salina de pH tamponado que contiene azúcares.
- Preferentemente el tampón es un tampón basado en TRIS.
- 35 En una realización la concentración de partículas del vector se diluye antes de la esterilización por filtrado.
- Preferentemente el vector retroviral es un vector lentiviral.
- 40 Más preferentemente el vector lentiviral es un vector lentiviral no de primate.
- Más preferentemente el vector lentiviral deriva de VAIE. Cuando el vector lentiviral deriva de VAIE la concentración de vector de las partículas VAIE antes de la esterilización por filtrado en la preparación de partículas del vector es menor que o igual a $4,6 \times 10^{11}$ copias de genoma de ARN por ml.
- 45 Preferentemente el vector retroviral comprende un nucleótido de interés (NOI).
- Preferentemente los procesos de producción de la invención son para producir formulaciones de vector retroviral, en las que la formulación de vector retroviral es adecuada para la administración a un paciente. El paciente puede ser un ser humano o un animal. En una realización la formulación de vector retroviral es adecuada para la administración al ojo de un paciente. En otra realización, la formulación de vector retroviral es adecuada para la administración al cerebro de un paciente.
- 50 En algunas realizaciones, los procesos de producción son para producir formulaciones de vectores retrovirales, en las que la formulación de vector retroviral es adecuada para la administración a un paciente por inyección. En una realización la formulación de vector retroviral es adecuada para la inyección subretiniana directa opcionalmente después de vitrectomía del ojo de un ser humano o animal. En otra realización la formulación del vector retroviral es adecuada para inyección directa al cuerpo estriado del cerebro de un ser humano o animal.
- 55 En algunas realizaciones los procesos de producción son para producir formulaciones de vector retroviral, en las que la formulación de vector retroviral es adecuada para la administración *ex vivo*.
- 60 En otras realizaciones los procesos de producción son para producir formulaciones de vector retroviral, en las que la formulación de vector retroviral es adecuada para la administración a una célula que puede obtenerse de un paciente.
- 65

Se proporciona una formulación del vector retroviral que puede obtenerse por el proceso de la presente invención. La formulación del vector retroviral puede ser para su uso en terapia génica.

También se proporciona uso de la formulación de vector retroviral en la preparación de un medicamento para terapia génica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema del proceso de producción de vector retroviral.

Descripción detallada de la invención

Se describirán ahora diversos elementos y realizaciones preferidos de la presente invención por medio de ejemplos no limitantes.

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto habitual en la materia. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos) *Current Protocols in Molecular Biology*, C. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, NY; B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; y, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg (1992) *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Roe, Simon, ed. *Protein Purification Techniques*. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press, 2001, Sofer, Gail y Hagel, Lars. *Handbook of Process Chromatography: A Guide to Optimization, Scale-up, and Validation*. Londres y San Diego: Academic Press, 1997, Janson, Jan-Christer y Ryden, Lars, eds. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. 2ª ed. Nueva York: John Wiley & Sons, Inc., 1998, Masters, John R.W., ed. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 3ª ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

Polinucleótidos

Los polinucleótidos usados en la presente invención pueden comprender secuencias de ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Un experto en la materia entenderá que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que los expertos en la materia pueden, usando técnicas rutinarias, realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos usados en la invención para reflejar el uso codónico de cualquier organismo hospedador particular en el que se vayan a expresar los polipéptidos. Los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para potenciar la actividad *in vivo* o la vida útil de polinucleótidos de la invención. Pueden producirse polinucleótidos tales como polinucleótidos de ADN de forma recombinante, sintética, o por cualquier medio disponible para los expertos en la materia. También pueden clonarse por técnicas convencionales.

Se producirán en general polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanquean una región de la secuencia que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenido de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que provocan amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de modo que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Proteína

Como se usa en el presente documento, el término "proteína" incluye moléculas polipeptídicas monocatenarias así como complejos de polipéptidos múltiples en los que se unen polipéptidos constituyentes individuales por enlaces covalentes o no covalentes. Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí mediante enlaces peptídicos o disulfuro.

Variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos

Además de las proteínas y los nucleótidos específicos mencionados en el presente documento, la presente divulgación también abarca el uso de variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos de los mismos.

5 En el contexto de la presente invención, una variante de cualquier secuencia dada es una secuencia en la que se ha modificado la secuencia específica de restos (bien restos de aminoácidos o bien de ácidos nucleicos) de tal manera que el polipéptido o polinucleótido en cuestión conserve al menos una de las funciones endógenas. Puede obtenerse una secuencia variante mediante adición, supresión, sustitución, modificación, reemplazo y/o variación de al menos un resto presente en la proteína de origen natural.

10 El término “derivado” como se usa en el presente documento, en relación con proteínas o polipéptidos desvelados en el presente documento incluye cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, supresión y/o adición de uno o más restos de aminoácidos de o a la secuencia siempre que la proteína o el polipéptido resultante conserve al menos una de sus funciones endógenas.

15 El término “análogo” como se usa en el presente documento, en relación con polipéptidos o polinucleótidos incluye cualquier mimético, es decir, un compuesto químico que posea al menos una de las funciones endógenas de los polipéptidos o polinucleótidos que imita.

Típicamente, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, de 1, 2 o 3 a 10 o 20 sustituciones siempre que la secuencia modificada conserve la actividad o capacidad requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos de origen no natural.

20 Las proteínas usadas en el presente documento también pueden tener supresiones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una proteína funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos siempre que se conserve la función de transporte o modulación. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

30 Pueden realizarse sustituciones conservativas, por ejemplo según la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares – sin carga	C S T M
		N Q
Polares – con carga	D E	
	K R	
AROMÁTICOS		H F W Y

35 Los “fragmentos” también son variantes y el término típicamente se refiere a una región seleccionada del polipéptido o polinucleótido que es de interés bien funcionalmente o bien, por ejemplo en un ensayo. “Fragmento” se refiere por lo tanto a una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico que es una parte de un polipéptido o polinucleótido de longitud completa.

40 Dichas variantes pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales tales como mutagénesis dirigida. Cuando se van a realizar inserciones, son de ADN sintético que codifica la inserción junto con regiones flanqueantes 5' y 3' correspondientes a la secuencia de origen natural a uno de los lados del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes correspondientes a sitios en la secuencia de origen natural de modo que la secuencia puede cortarse con la enzima o las enzimas apropiadas y el ADN sintético ligarse al corte. El ADN se expresa después para preparar la proteína codificada. Estos métodos son solamente ilustrativos de las numerosas técnicas convencionales conocidas en este campo para manipulación de secuencias de ADN y también pueden usarse otras técnicas conocidas.

Retrovirus

50 Como se conoce bien en la técnica, un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un ambiente a otro. Como ejemplo, algunos vectores usados en técnicas de ADN recombinante permiten que entidades, tales como un segmento de ADN (tal como un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo) se transfieran a una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores usados en técnicas de ADN recombinante incluyen pero sin limitación plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales o virus.

55 La expresión “vector de expresión” significa una construcción con capacidad de expresión *in vivo* o *in vitro/ex vivo*.

El vector retroviral empleado en los aspectos de la presente invención puede derivar de o puede ser derivable de cualquier retrovirus adecuado. Se ha identificado un gran número de retrovirus diferentes. Los ejemplos incluyen: virus de leucemia murina (VLM), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de leucemia de linfocitos T humana (VLTH), virus de tumor mamario de ratón (VTMR), virus de sarcoma de Rous (VSR), virus de sarcoma de Fujinami (VSFu), virus de leucemia murina de Moloney (VLM-Mo), virus de osteosarcoma murino FBR (VSM FBR), virus de sarcoma murino de Moloney (VSM-Mo), virus de leucemia murina de Abelson (VLM-A), virus de mielocitomatosis aviar 29 (MC29) y virus de eritroblastosis aviar (VEA). Puede encontrarse una lista detallada de retrovirus en Coffin *et al.*, 1997, "Retroviruses", Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763.

Los retrovirus pueden dividirse ampliamente en dos categorías: concretamente "sencillos" y "complejos". Los retrovirus pueden dividirse además adicionalmente en siete grupos. Cinco de estos grupos representan retrovirus con potencial oncogénico. Los dos grupos restantes son los lentivirus y los espumavirus. Se presenta una revisión de estos retrovirus en Coffin *et al.* 1997 (en la misma referencia).

Una partícula de vector retroviral recombinante es capaz de transducir una célula receptora con un nucleótido de interés (NOI). Una vez dentro de la célula el genoma de ARN de la partícula del vector se transcribe de forma inversa a ADN y se integra en el ADN de la célula receptora.

En un vector típico para uso en el método descrito en el presente documento al menos parte de una o más regiones codificantes de proteínas esenciales para la replicación pueden retirarse del virus. Esto hace al vector viral defectuoso en replicación. También pueden reemplazarse partes del genoma viral por un NOI para generar un vector que comprende un NOI que es capaz de transducir una célula hospedadora no en división diana y/o integrar su genoma en un genoma hospedador.

Vectores lentivirales.

El vector lentiviral desvelado en el presente documento puede derivar de o puede ser derivable de cualquier lentivirus adecuado.

Los vectores lentivirales son parte de un grupo mayor de vectores retrovirales. Puede encontrarse una lista detallada de lentivirus en Coffin *et al.* (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763). Brevemente, los lentivirus pueden dividirse en grupos de primates y no primates. Los ejemplos del lentivirus de primates incluyen pero sin limitación: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de autoinmunodeficiencia humana (SIDA), y el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS). El grupo lentiviral no primate incluye el virus visna/maedi (VVM) prototipo de "virus lento", así como el virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC) relacionado, virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y el más recientemente descrito virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB).

La familia de lentivirus difiere del retrovirus porque los antivirales tienen la capacidad de infectar células tanto en división como no en división (Lewis *et al.* (1992); Lewis y Emerman (1994)). Por el contrario, otros retrovirus, tales como VML, son incapaces de infectar células no en división o que se dividen lentamente tales como las que componen, por ejemplo, tejido muscular, cerebral, pulmonar y hepático.

Un vector lentiviral, como se usa en el presente documento, es un vector que comprende al menos una parte componente derivable de un lentivirus. Preferentemente, esa parte componente está implicada en los mecanismos biológicos por los que el vector infecta células, expresa genes o se replica.

La estructura básica de genomas de retrovirus y lentivirus comparten muchas características comunes tales como una 5' LTR y una 3' LTR, entre o dentro de las que se localiza una señal de empaquetamiento para permitir que el genoma se empaquete, un sitio de unión de cebadores, sitios de integración para permitir la integración en un genoma en un genoma de células hospedadoras y genes *gag*, *pol* y *env* que codifican los componentes de empaquetamiento, requiriéndose estos polipéptidos para el ensamblaje de partículas virales. Los lentivirus tienen características adicionales, tales como secuencias *rev* y RRE en VIH, que permiten la exportación eficaz de transcritos de ARN de los provirus integrados del núcleo al citoplasma de una célula diana infectada.

En el provirus, los genes virales están flanqueados en ambos extremos por regiones denominadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración proviral, y la transcripción. Las LTR también actúan como secuencias promotoras-potenciadoras y pueden controlar la expresión de los genes virales.

Las LTR en sí mismas son secuencias idénticas que pueden dividirse en tres elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 deriva de la secuencia única del extremo 3' del ARN. R deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 deriva de la secuencia única del extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes virus.

En un genoma de vector lentiviral defectuoso *gag*, *pol* y *nev* pueden estar ausentes o no funcionales. Las regiones R en ambos extremos del ARN son secuencias repetidas. U5 y U3 representan secuencias únicas en los extremos 5' y 3' del genoma de ARN respectivamente.

5 En un vector lentiviral típico descrito en el presente documento al menos parte de una o más regiones codificantes de proteínas esenciales para replicación puede retirarse del virus. Esto hace al vector viral defectuoso en replicación. También pueden reemplazarse partes del genoma viral por un NOI para generar un vector que comprende un NOI que es capaz de transducir una célula hospedadora no en división diana y/o integrar su genoma en un genoma hospedador.

10 En una realización, los vectores retrovirales son vectores que no se integran como se describe en el documento WO 2007/071994.

15 En una realización adicional los vectores tienen la capacidad de suministrar una secuencia que está desprovista de o carece de ARN viral. En una realización adicional un dominio de unión heterólogo (heterólogo para *gag*) localizado en el ARN para suministrar y un dominio de unión afín en *gag* o *pol* puede usarse para asegurar el empaquetamiento del ARN para suministrar. Ambos de estos vectores se describen en el documento WO 2007/072056.

20 El vector lentiviral puede ser un vector "no de primate", es decir, derivado de un virus que no infecta principalmente a primates, especialmente seres humanos.

25 Los ejemplos de lentivirus no de primates puede ser cualquier miembro de la familia de lentiviridae que no infecte de forma natural a un primate y pueden incluir un virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), un virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), un virus de la encefalitis y artritis caprina (VEAC), un virus Maedi visna (VMV) o un virus de la anemia infecciosa equina (VAIE).

30 En una realización particularmente preferida el vector viral deriva de VAIE. VAIE tiene la estructura genómica más sencilla de los lentivirus y se prefiere particularmente para uso en la presente invención. Además de los genes *gag*, *pol* y *env* VAIE codifica otros tres genes: *tat*, *rev* y *S2*. *Tat* actúa como un activador de la transcripción de la LTR viral (Derse y Newbold (1993); Maury *et al.* (1994)) y *Rev* regula y coordina la expresión de genes virales mediante elementos de respuesta a *rev* (RRE) (Martarano *et al.* (1994)). Se cree que los mecanismos de acción de estas dos proteínas son ampliamente similares a los mecanismos análogos en los virus de primates (Martano *et al.* misma referencia). La función de *S2* se desconoce. Además, se ha identificado una proteína de VAIE, Ttm, que está codificada por el primer exón de *tat* cortado y empalmado en la secuencia codificante de *env* al inicio de la proteína transmembrana.

35 Son vectores preferidos para usar en el proceso de la presente invención vectores lentivirales recombinantes.

40 La expresión "vector lentiviral recombinante" se refiere a un vector con suficiente información genética lentiviral para permitir el empaquetamiento de un genoma de ARN, en presencia de componentes de empaquetamiento, en una partícula viral capaz de infectar una célula diana. La infección de la célula diana puede incluir transcripción inversa e integración en el genoma de la célula diana. Este vector lentiviral recombinante porta secuencias codificantes no virales que van a suministrarse por el vector a la célula diana. Un vector lentiviral recombinante es incapaz de replicar de forma independiente para producir partículas antivirales infecciosas dentro de la célula diana final. Habitualmente el vector lentiviral recombinante carece de un gen *gag-pop* y/o *env* funcional y/u otros genes esenciales para replicación. El vector puede configurarse como un vector de intrón dividido. Un vector de intrón dividido se describe en la Solicitud de Patente de PCT WO 99/15683.

50 Preferentemente el vector lentiviral recombinante tiene un genoma viral mínimo.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "genoma viral mínimo" significa que el vector viral se ha manipulado para retirar los elementos no esenciales y para conservar los elementos esenciales para proporcionar la funcionalidad requerida para infectar, transducir y suministrar una secuencia de nucleótidos de interés a una célula hospedadora diana. Pueden encontrarse más detalles de esta estrategia en el documento WO 98/17815 de los inventores.

En una realización de la presente invención, el vector es un vector auto-inactivante.

60 Como ejemplo, se han construido vectores retrovirales auto-inactivantes suprimiendo los potenciadores de la transcripción o los potenciadores y el promotor en la región U3 de la 3' LTR. Después de un ciclo de transcripción inversa e integración del vector, estos cambios se copian a las LTR tanto 5' como 3' produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo (Yu *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 3194-3198; Dougherty y Temin (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 1197-1201; Hawley *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 2406-2410; Yee *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 9564-9568). Sin embargo, cualquier promotor interno de las LTR en dichos vectores será aún transcripcionalmente activo. Esta tragedia se ha empleado para eliminar efectos de los potenciadores y promotores

en las LTR virales en transcripción de genes colocados de forma interna. Dichos efectos incluyen aumento de la transcripción (Jolly *et al.* (1983) *Nucleic Acids Res.* 11: 1855-1872) o supresión de la transcripción (Emerman y Temin (1984) *Cell* 39: 449-467). Esta estrategia también puede usarse para eliminar la transcripción cadena abajo de la 3' LTR en ADN genómico (Herman y Coffin (1987) *Science* 236: 845-848). Esto es particularmente importante en la terapia génica humana donde tiene importancia crítica evitar la activación adventicia de un oncogén endógeno.

Sin embargo, el vector plasmídico usado para producir el genoma viral dentro de una célula hospedadora/célula de empaquetamiento también incluirá secuencias de control reguladoras de la transcripción unidas operativamente con el genoma lentiviral para dirigir la transcripción del genoma en una célula hospedadora/célula de empaquetamiento. Estas secuencias reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas con la secuencia lentiviral transcrita, es decir, la región 5' U3, o pueden ser un promotor heterólogo tal como otro promotor viral, por ejemplo el promotor de CMV. Algunos genomas lentivirales requieren secuencias adicionales para producción de virus eficaz. Por ejemplo, en el caso de VIH, se incluyen preferentemente secuencias de *rev* y RRE. Sin embargo, el requisito de *rev* y RRE puede reducirse o eliminarse por optimización de codones. Pueden encontrarse más detalles de esta estrategia en el documento WO 01/79518 de los inventores. También se conocen secuencias alternativas que realizan la misma función que el sistema de *rev*/RRE. Por ejemplo, se encuentra un análogo funcional del sistema de *rev*/RRE en el virus de mono Mason Pfizer. Este se conoce como el elemento de transporte constitutivo (ETC) y comprende una secuencia de tipo RRE en el genoma que se cree que interacciona con un factor en la célula infectada. El factor celular puede considerarse un análogo de *rev*. Por lo tanto, ETC puede usarse como una alternativa al sistema de *rev*/RRE. Cualquier otro equivalente funcional que se conozca o esté disponible puede ser relevante para la invención. Por ejemplo, también se sabe que la proteína Rex de VLTH-1 puede reemplazar funcionalmente la proteína de Rev de VIH-1. También se sabe que Rev y Rex tienen efectos similares a IRE-BP.

En una realización particularmente preferida, el vector lentiviral consiste en vector lentiviral mínimo auto-inactivante, derivado de virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que codifica preferentemente tres enzimas que están implicadas en la ruta sintética de dopamina. Las proteínas codificadas por dicho vector pueden comprender una forma truncada del gen de tirosina hidroxilasa humana (TH*) (que carece de los 160 aminoácidos N terminales implicados en la regulación de retroalimentación de TH), la descarboxilasa de L-aminoácido aromático humana (AADC) y el gen de la GTP-ciclohidrolasa 1 humana (CH1). El vector puede producirse por la transfección transitoria de células (por ejemplo, células HEK293T) con tres plásmidos, que codifican: (1) el genoma de vector de VAIE recombinante ProSavin® (Oxford BioMedica plc, Oxford Reino Unido) (pONYK1-ORT, documento WO 02/29065 y Farley *et al.* (2007) *J. Gen. Med.* 9: 345-356), (2) el vector de expresión de *gag/pol* de VAIE sintético (pESGPK, documentos WO 01/79518, WO 05/29065), (3) el vector de expresión de envoltura de VSV-G (pHGK).

Secuencia de empaquetamiento

Como se utiliza dentro del contexto de la presente invención la expresión "señal de empaquetamiento" que se denomina indistintamente "secuencia de empaquetamiento" o "psi" se usa en referencia a la secuencia de acción en *cis*, no codificante, requerida para encapsidación de cadenas de ARN lentiviral durante la formación de partículas virales. En VIH-1, esta secuencia se ha mapeado en loci que se extienden desde cadena arriba del sitio donador de corte y empalme principal (SD) hasta al menos el codón de inicio de *gag*.

Como se usa en el presente documento, la expresión "señal de empaquetamiento extendida" o "secuencia de empaquetamiento extendida" se refiere al uso de secuencias alrededor de la secuencia psi con extensión adicional al gen de *gag*. La inclusión de estas secuencias de empaquetamiento adicionales puede aumentar la eficacia de inserción de ARN de vector en partículas virales.

Pseudotipificación

Preferentemente, el vector retroviral se ha pseudotipificado. A este respecto, la pseudotipificación puede conferir una o más ventajas. Por ejemplo, con los vectores lentivirales, el producto génico de *env* de los vectores basados en VIH restringirían estos vectores para infectar solamente células que expresan una proteína denominada CD4. Pero si el gen *env* en estos vectores se ha sustituido con secuencias de *env* de otros virus de ARN, estos pueden entonces tener un espectro infeccioso más amplio (Verman y Somia (1997)). Por ejemplo, Miller *et al.* pseudotipificaron un vector de VLMMo con la envoltura del retrovirus anfitriónico 4070A (*Mol. Cell. Biol.* 5: 431-437), otros trabajadores han pseudotipificado un vector basado en VIH con la glucoproteína de VSV (Verman y Somia (1997)).

En otra alternativa, la proteína Env puede ser una proteína Env modificada tal como una proteína Env mutante o modificada por ingeniería genética. Pueden realizarse modificaciones o seleccionarse para introducir capacidad de dirección o para reducir la toxicidad o para otro fin (Valesia-Wittman *et al.* (1996); Nilson *et al.* (1996); Fielding *et al.* (1998) y referencias citadas en las mismas).

El vector retroviral puede pseudotipificarse con cualquier molécula elegida, pero se prefiere en particular la envoltura de VSV-G.

VSV-G:

La glucoproteína de envoltura (G) del virus de la estomatitis Vesicular (VSV), un rabdovirus, es una proteína de envoltura que se ha mostrado que es capaz de pseudotipificar ciertos retrovirus.

Su capacidad para pseudotipificar vectores retrovirales basados en VLM en ausencia de cualquiera proteína de la envoltura retroviral se mostró por primera vez en Emi *et al.* (1991) J. Virol. 65: 1202-1207). El documento WO 94/294440 enseña que los vectores retrovirales pueden pseudotipificarse con éxito con VSV-G. Estos vectores VSV-G pseudotipificados pueden usarse para transducir una amplia serie de células de mamífero. Más recientemente, Abe *et al.* (1998) J. Virol. 72(8) 6356-6361 enseñan que partículas retrovirales no infecciosas pueden hacerse infecciosas por la adición de VSV-G.

Burns *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-7) pseudotipificaron con éxito el retrovirus VLM con VSV-G y esto dio como resultado un vector que tenía un rango de hospedador alterado en comparación con VLM en su forma nativa. Se ha mostrado que los vectores pseudotipificados con VSV-G infectan no solamente células de mamífero, sino también líneas celulares derivadas de peces, reptiles e insectos (Burns *et al.* (1993) misma referencia). Se ha mostrado también que son más eficaces que las envolturas anfotrópicas tradicionales para una diversidad de líneas celulares (Yee *et al.*, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9564-9568, Lin, Emi *et al.* (1991) J. Virol. 65: 1202-1207). La proteína VSV-G también puede usarse para pseudotipificar ciertos lentivirus y retrovirus debido a que su cola citoplasmática es capaz de interactuar con los núcleos retrovirales.

La provisión de una envoltura de pseudotipificación no lentiviral tal como proteína VSV-G proporciona la ventaja de que las partículas de vector pueden concentrarse a una alta titulación sin pérdida de infectividad (Akkina *et al.* (1996) J. Virol. 70: 2581-5). Las proteínas de envoltura de lentivirus y retrovirus son aparentemente incapaces de soportar las fuerzas de corte durante la ultracentrifugación, probablemente porque consisten en dos subunidades unidas de forma no covalente. La interacción entre las subunidades puede romperse por la centrifugación. En comparación la glucoproteína de VSV está compuesta de una única unidad. La pseudotipificación de proteína VSV-G puede por lo tanto ofrecer ventajas potenciales.

El documento WO 00/52188 describe la generación de vectores retrovirales pseudotipificados, de líneas celulares productoras estables, que tienen proteína de virus G de la estomatitis vesicular (VSV-G) como la proteína de envoltura viral asociada a membrana, y proporciona una secuencia génica para la proteína VSV-G.

Virus del Río Ross

La envoltura viral del Río Ross se ha usado para pseudotipificar un vector lentiviral no primate (VIF) y después de la administración sistémica se transdujo predominantemente al hígado (Kang *et al.* (2002)). Se ha indicado que la eficacia es 20 veces mayor que la obtenida con el vector pseudotipificado con VSV-G, y provocó menos citotoxicidad como se mide por niveles en suero de enzimas hepáticas que sugieren hepatotoxicidad.

El Virus del Río Ross (VRR) es un alfavirus propagado por mosquitos que son endémicos y epidémicos en regiones tropicales y templadas de Australia. Las tasas de anticuerpos en poblaciones normales en la zona costera templada tienden a ser bajas (de 6 % al 15 %) aunque la sero-prevalencia alcanza de 27 al 37 % en las llanuras del sistema del Río del Valle de Murray. En 1979 a 1980 el Virus del Río Ross se hizo epidémico en las Islas del Pacífico. La enfermedad no es contagiosa entre seres humanos y nunca es letal, siendo el primer síntoma dolor de las articulaciones con fatiga y letargo en aproximadamente la mitad de los pacientes (Fields Virology).

GP64 de Baculovirus

Se ha mostrado que la proteína GP64 de baculovirus es una alternativa atractiva a VSV-G para vectores virales usados en la producción a gran escala de virus de alto título requeridos para aplicaciones clínicas y comerciales (Kumar M, Bradow BP, Zimmerberg J (2003) Hum. Gene Ther. 14(1): 67-77). En comparación con vectores pseudotipificados con VSV-G, los vectores pseudotipificados con GP64 tienen un tropismo general similar y títulos nativos similares. Debido a que la expresión de GP64 no destruye células, pueden generarse líneas celulares basadas en 293T que expresan GP64 de forma constitutiva.

G de Rabia

En la presente invención el vector puede pseudotipificarse con al menos una parte de la proteína G de rabia o un mutante, una variante, un homólogo o un fragmento de la misma.

Pueden encontrarse enseñanzas sobre la proteína G de la rabia, así como mutantes de la misma, en el documento WO 99/61639 así como Rose *et al.* (1982) J. Virol. 43: 361-364, Hanham *et al.* (1993) J. Virol. 67: 530-542, Tuffereau *et al.* (1998) J. Virol. 72: 1085-1091, Kucera *et al.* (1985) J. Virol. 55: 158-162, Dietzschold *et al.* (1983) PNAS 80: 70-74, Seif *et al.* (1985) J. Virol. 53: 926-934, Coulon *et al.* (1998) J. Virol. 72: 273-278, Tuffereau *et al.* (1998) J. Virol. 72: 1085-10910, Burger *et al.* (1991) J. Gen. Virol. 72: 359-367, Gaudin *et al.* (1995) J. Virol. 69:

5528-5534, Benmansour *et al.* (1991) *J. Virol.* 65: 4198-4203, Luo *et al.* (1998) *Microbiol. Immunol.* 42: 187-193, Coll (1997) *Arch. Virol.* 142: 2089-2097, Luo *et al.* (1997) *Virus Res.* 51: 35-41, Luo *et al.* (1998) *Microbiol. Immunol.* 42: 187-193, Coll (1995) *Arch. Virol.* 140: 827-851, Tuchiya *et al.* (1992) *Virus Res.* 25: 1-13, Morimoto *et al.* (1992) *Virology* 189: 203-216, Gaudin *et al.* (1992) *Virology* 187: 627-632, Whittetal (1991) *Virology* 185: 681-688, Dietzschold *et al.* (1978) *J. Gen. Virol.* 40: 131-139, Dietzschold *et al.* (1978) *Dev. Biol. Stand.* 40: 45-55, Dietzschold *et al.* (1977) *J. Virol.* 23: 286-293, y Otvos *et al.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1224: 68-76. También se describe una proteína G de la rabia en el documento EP 0445625.

Envolturas alternativas

Otras envolturas que pueden usarse para pseudotipificar vectores retrovirales incluyen Mokola, Ebola, 4070A y VCML (virus de la coriomeningitis linfocítica).

Nucleótido de interés (NOI)

En una realización, el virus es un vector retroviral de tipo silvestre, o un mutante o parte del mismo que aún es infeccioso en células. En otra realización, el virus es un vector retroviral recombinante que comprende información heteróloga, que puede usarse en una situación terapéutica para fines de terapia génica, o como un antígeno para fines de vacunación. Esta es una realización preferida que emplea por ejemplo vectores retrovirales. La información heteróloga se denomina "nucleótido de interés" (NOI).

El NOI puede tener una aplicación terapéutica o de diagnóstico. Los NOI adecuados incluyen, pero sin limitación: secuencias que codifican enzimas, citocinas, quimiocinas, hormonas, anticuerpos, moléculas antioxidantes, moléculas de tipo inmunoglobulina modificadas técnicamente, un anticuerpo monocatenario, proteínas de fusión, moléculas co-estimulantes inmunitarias, moléculas inmunomoduladoras, ARN antisentido, microARN, ARNhp, ARNip, ribozimas, un mutante negativo de transdominio de una proteína diana, una toxina, una toxina condicional, un antígeno, una proteína supresora de tumores y factores de crecimiento, proteínas de membrana, proteínas y péptidos vasoactivos, proteínas y ribozimas antivirales y derivados de los mismos (tales como con un grupo indicador asociado). Los NOI también pueden codificar enzimas activadoras de pro-fármacos.

En otra realización, el NOI puede ser útil en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

En otra realización, el NOI puede ser útil en el tratamiento de enfermedad de Parkinson.

En otra realización más, el NOI puede codificar una enzima o enzimas implicadas en la síntesis de dopamina. Por ejemplo, la enzima puede ser una o más de las siguientes: tirosina hidroxilasa, GTP-ciclohidralasa I y/o aminoácido aromático dopa descarboxilasa. Las secuencias de los tres genes están disponibles: N.º de Referencia de GenBank® X05290, U19523 y M76180 respectivamente.

Como alternativa el NOI puede codificar el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2). En una realización alternativa el genoma viral comprende un NOI que codifica aminoácido aromático dopa descarboxilasa y un NOI que codifica VMAT 2. Dicho genoma puede usarse en el tratamiento de enfermedad de Parkinson, en particular junto con administración periférica de L-DOPA.

En otra realización el NOI puede codificar una proteína terapéutica o combinación de proteínas terapéuticas.

En otra realización, el NOI puede codificar una proteína o proteínas seleccionadas del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), neurotrofina-3 (NT-3), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento de insulina 2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C/VEGF-2, VEGF-D, VEGF-E, PDGF-A, PDGF-B, hetero- y homo-dímeros de PDFG-A y PDFG-B.

En otra realización, el NOI puede codificar una proteína anti-angiogénica o proteínas anti-angiogénicas seleccionadas del grupo que consiste en angiostatina, endostatina; factor plaquetario 4, factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), restina, interferón-alfa, proteína inducible por interferón, gro-beta y tubedown-1, Interleucina (IL)-1, IL-12, ácido retinoico, anticuerpos anti-VEGF, aptámeros, oligos antisentido, ARNip, trombospondina, proteínas del receptor de VEGF tales como las descritas en los documentos US 5.952.199 y US 6.100.071 y anticuerpos anti-receptor de VEGF.

En otra realización, el NOI puede codificar una proteína que se expresa normalmente en una célula ocular. En otra realización, el NOI puede codificar una proteína que se expresa normalmente en una célula fotorreceptora.

En otra realización, el NOI puede codificar una proteína seleccionada del grupo que comprende RPE65, proteína receptora que interacciona con aril-hidrocarburo de tipo 1 (AIPL1), CRB1, acetiltransferasa retiniana de lecitina (LRAT), caja homeótica específica de fotorreceptor (CRX), guanilato ciclasa retiniana (GUCY2D), proteína de

interacción con RPGR 1 (RPGRIP1), LCA2, LCA3, LCA5, distrofina, PRPH2, CNTF, ABCR/ABCA4, EMP1, TIMP3, MERTK, ELOVL4, MYO7A, USH2A y opticina.

5 Por lo tanto, el vector retroviral puede usarse para suministrar uno o más NOI útiles en el tratamiento de los trastornos enumerados en los documentos WO 98/05635, WO 98/07859, WO 98/09985. El nucleótido de interés puede ser ADN o ARN. Se proporcionan ejemplos de dichas enfermedades a continuación:

10 Un trastorno que responde a citocina y actividad de proliferación/diferenciación de células; actividad inmunosupresora o inmunoestimulante (por ejemplo, para tratar deficiencia inmunitaria, incluyendo infección con virus de la inmunodeficiencia humana; regulación del crecimiento de linfocitos; tratamiento del cáncer y muchas enfermedades autoinmunitarias y para el rechazo de trasplante o inducir inmunidad tumoral; regulación de hematopoyesis, por ejemplo tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides; promoción del crecimiento de hueso, cartílago, tendón, ligamiento y tejido nervioso, por ejemplo para curar heridas, tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y neurodegeneración, inhibición o activación de hormona estimulante del folículo (modulación de la fertilidad); actividad quimiotáctica/quimiocinética (por ejemplo para movilizar tipos celulares específicos a sitios de lesión o de infección); actividad hemostática y trombolítica (por ejemplo para tratar hemofilia e ictus); actividad antiinflamatoria (para tratar por ejemplo choque séptico o enfermedad de Crohn); actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de linfocitos T y por lo tanto, actividad antiinflamatoria; actividad antiinmunitaria, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada con inflamación; inhibir la capacidad de macrófagos y linfocitos T para adherirse a componentes de la matriz extracelular y fibronectina, así como expresión del receptor de fas regulado positivamente en linfocitos T.

25 Trastornos de tumores malignos incluyendo cáncer, crecimiento, invasión y propagación de tumores benignos y malignos, angiogénesis, metástasis, ascitis y efusión de la pleura maligna.

Enfermedades autoinmunitarias incluyendo artritis, incluyendo artritis reumatoide, hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades de colágeno y otras enfermedades.

30 Enfermedades cardiovasculares incluyendo arteriosclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión de perfusión, parada cardíaca, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de dificultad respiratoria, efectos cardiovasculares, migraña y anti-trombosis dependiente de aspirina, ictus, isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica u otras enfermedades.

35 Enfermedades del tracto gastrointestinal incluyendo úlcera péptica, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y otras enfermedades.

Enfermedades hepáticas incluyendo fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades.

40 Enfermedades renales y urológicas incluyendo tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis u otras enfermedades.

Trastornos del oído, la nariz y la boca, incluyendo otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas.

45 Trastornos dentales y orales incluyendo enfermedades periodontales, periodontitis, gingivitis u otras enfermedades dentales/orales.

50 Enfermedades testiculares incluyendo orquitis o epidídimo-orquitis, infertilidad, traumatismo orquidial u otras enfermedades testiculares.

Enfermedades ginecológicas incluyendo disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, pre-eclampsia, endometriosis y otras enfermedades ginecológicas.

55 Trastorno oftalmológico tal como uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo, retinitis o edema macular cistoide, oftalmia simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, degeneración macular incluyendo degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y degeneración macular juvenil incluyendo Enfermedad de Best, Enfermedad de Stargardt, síndrome de Usher, distrofia retiniana en panal de Doyme, Distrofia Macular de Sorby, retinosquiasis juvenil, Distrofia de Conos-Bastones, Distrofia Corneana, Distrofia de Fuch, amaurosis congénita de Leber, neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), síndrome de Adie, enfermedad de Oguchi, enfermedad de fundus degenerativo, traumatismo ocular, inflamación ocular provocada por infección, vitreorretinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, por ejemplo, después de operación de filtración de glaucoma, reacción contra implantes oculares, rechazo de injerto de trasplante corneano y otras enfermedades oftálmicas.

65

Trastornos neurodegenerativos y neurológicos incluyendo enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionado con SIDA, encefalopatía relacionada con VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, afecciones o trastornos degenerativos del SNC, ictus, síndrome post-polio, trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, pseudo-tumor cerebral, Síndrome de Down, enfermedad de Huntington, compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, atrofas y distrofias musculares, enfermedades, afecciones o trastornos de los sistemas nerviosos central y periférico, enfermedad de las neuronas motoras incluyendo esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, lesión de la médula espinal y avulsión.

Otras enfermedades y afecciones tales como inflamación post-traumática, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones de trasplante y/o efectos secundarios, complicaciones y efectos secundarios de la terapia génica, por ejemplo, debido a infección con un vehículo viral, o SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, para la prevención y/o el tratamiento de rechazo de injertos en casos de trasplante de células, tejido y órganos naturales o artificiales tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido cutáneo natural o artificial.

ARNip/micro-ARN

El NOI puede comprender o codificar un ARNip o micro-ARN o ARNhp o micro ARN o ARNhp regulado (Dickins *et al.* (2005) Nature Genetics 37: 1289-1295, Silva *et al.* (2005) Nature Genetics 37: 1281-1288).

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) mediado por ARN bicatenario (ARNbc) es un mecanismo de defensa celular conservado para controlar la expresión de genes ajenos. Se cree que la integración aleatoria de elementos tales como transposones o virus provoca la expresión de ARNbc lo que activa la degradación específica de secuencia de ARNm monocatenario homólogo o ARN genómico viral. El efecto de silenciamiento se conoce como interferencia de ARN (ARNi) (Ralph *et al.* (2005) Nature Medicine 11: 429-433). El mecanismo de ARNi implica el procesamiento de ARNbc largos en dobles cadenas de aproximadamente 21-25 nucleótidos (nt) de ARN. Estos productos se denominan ARN de interferencia pequeños o de silenciamiento (ARNip) que son los mediadores específicos de secuencia de degradación de ARNm. En células de mamífero diferenciadas se ha descubierto que ARNbc > 30 pb activa la respuesta de interferón que conduce a la detención de la síntesis de proteínas y degradación de ARNm no específico (Stark *et al.* (1998)). Sin embargo esta respuesta puede evitarse usando dobles cadenas de ARNip de 21 nt (Elbashir *et al.* (2001), Hutvagner *et al.* (2001)) lo que permite que la función génica se analice en células de mamífero cultivadas.

En otra realización el NOI comprende un micro-ARN. Los micro-ARN son un grupo muy grande de ARN pequeños producidos de forma natural en organismos, al menos algunos de los cuales regulan la expresión de genes diana. Son miembros fundacionales de la familia de micro-ARN *let-7* y *lin-4*. El gen *let-7* codifica una especie de ARN altamente conservada, pequeña, que regula la expresión de genes que codifican proteínas endógenas durante el desarrollo del gusano. La especie de ARN activa se transcribe inicialmente como un precursor de ~70 nt, que se procesa postraduccionalmente en una forma madura de ~21 nt. Tanto *let-7* como *lin-4* se transcriben como precursores de ARN en horquilla que se procesan hasta sus formas maduras mediante enzima de Dicer.

Promotores

La expresión de un NOI puede controlarse usando secuencias de control, que incluyen promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden usarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucariotas. Pueden usarse promotores específicos de tejidos o específicos de estímulos. También pueden usarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencias de dos o más promotores diferentes.

Las secuencias promotoras adecuadas son promotores fuertes incluyendo los que derivan de los genomas de virus, tales como poliomavirus, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), retrovirus y Virus de Simio 40 (SV40), o de promotores de mamíferos heterólogos, tales como el promotor de actina o el promotor de proteína ribosómica. La transcripción de un gen puede aumentarse adicionalmente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son relativamente independientes de orientación y posición; sin embargo, se puede emplear un potenciador de un virus de célula eucariota, tal como el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270) y el potenciador del promotor temprano de CMV. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' del promotor, pero está preferentemente localizado en un sitio 5' del promotor.

El promotor puede incluir adicionalmente elementos para asegurar o para aumentar la expresión en un hospedador adecuado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas, por ejemplo una caja Pribnow o una caja TATA. El promotor puede incluso contener otras secuencias para afectar a (tal como mantener, potenciar, reducir) los niveles de expresión de una secuencia de nucleótidos. Otras secuencias adecuadas incluyen el intrón de

Sh1 o un intrón de ADH. Otras secuencias incluyen elementos inducibles, tales como elementos inducibles por temperatura, productos químicos, luz o tensión. Además, pueden estar presentes elementos adecuados para potenciar la transcripción o traducción.

5 Optimización de codones

Los polinucleótidos usados en la presente invención (incluyendo los componentes de NOI y/o vector) pueden tener codones optimizados. La optimización de codones se ha descrito previamente en los documentos WO 99/41397 y WO 01/79518. Diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Esta preferencia codónica corresponde a una desviación en la abundancia relativa de un ARNt particular en el tipo celular. Alterando los codones de la secuencia de modo que se adapten para coincidir con la abundancia relativa de ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión. Por la misma razón, es posible reducir la expresión eligiendo deliberadamente codones para los que se sabe que los ARNt correspondientes son poco habituales en el tipo celular particular. Por lo tanto, está disponible un grado adicional de control de la traducción.

Muchos virus, incluyendo VIH y otros lentivirus, usan un gran número de codones poco habituales y cambiando estos para corresponder con codones de mamíferos usados habitualmente, se puede conseguir expresión aumentada de un gen de interés, por ejemplo un componente NOI o de empaquetamiento en células productoras de mamífero. Se conocen en la técnica tablas de uso codónico para células de mamífero, así como para una diversidad de otros organismos.

La optimización de codones de componentes de vectores virales tiene varias otras ventajas. En virtud de alteraciones en sus secuencias, se eliminan secuencias de inestabilidad de ARN (INS) de las secuencias de nucleótidos que codifican los componentes de empaquetamiento de las partículas virales requeridas para ensamblaje de partículas virales en las células productoras/células de empaquetamiento. Al mismo tiempo, la secuencia codificante de secuencias de aminoácidos para los componentes de empaquetamiento se conserva de modo que los componentes virales codificados por las secuencias permanezcan iguales, o al menos suficientemente similares de modo que la función de los componentes de empaquetamiento no esté comprometida. En vectores lentivirales la optimización de codones también supera el requisito de Rev/RRE para exportación, haciendo las secuencias optimizadas independientes de Rev. La optimización de codones también reduce la recombinación homóloga entre diferentes construcciones dentro del sistema de vector (por ejemplo entre las regiones de solapamiento en las fases abiertas de lectura de gag-pol y env). El efecto general de optimización de codones es por lo tanto un aumento notable en el título viral y mejora de la seguridad.

En una realización, solamente se optimizan los codones relacionados con INS. Sin embargo, en una realización mucho más preferida y práctica, las secuencias se optimizan con respecto a sus codones en su totalidad, con algunas excepciones, por ejemplo la secuencia que abarca el sitio de desplazamiento de fase de gag-pol (véase posteriormente).

El gen *gag-pol* comprende dos fases de lectura solapantes que codifican las proteínas gag-pol. La expresión de ambas proteínas depende de un desplazamiento de fase durante la traducción. Este desplazamiento de fase sucede como resultado de "deslizamiento" de ribosomas durante la traducción. Se cree que este deslizamiento está provocado al menos en parte por estructuras secundarias de ARN que detienen el ribosoma. Dichas estructuras secundarias existen cadena abajo del sitio de desplazamiento de fase en el gen *gag-pol*. Para VIH, la región de solapamiento se extiende desde el nucleótido 1222 cadena abajo del comienzo de *gag* (en la que el nucleótido 1 es la A de la ATG de *gag*) hasta el final de *gag* (nt 1503). En consecuencia, un fragmento de 281 pb que abarca el sitio de desplazamiento de fase y la región de solapamiento de las dos fases de lectura preferentemente no tiene codones optimizados. La conservación de este fragmento permitirá una expresión más eficaz de las proteínas gag-pol.

Para VAIE se ha considerado que el comienzo del solapamiento es nt 1262 (en el que el nucleótido 1 es la A de la ATG de *gag*). El final del solapamiento está en 1461 pb. Para asegurar que el sitio de desplazamiento de fase y el solapamiento de *gag-pol* están conservados, se ha conservado su secuencia de tipo silvestre de nt 1156 a 1465.

Pueden realizarse derivaciones de uso de codón óptimo, por ejemplo, para acomodar los sitios de restricción convenientes y pueden introducirse cambios de aminoácidos conservativos en las proteínas gag-pol.

En una realización, la optimización de codones se basa en genes de mamíferos expresados ligeramente. La tercera y en ocasiones la segunda y la tercera bases pueden cambiarse.

Debido a la naturaleza degradada del Código Genético, se apreciará que un experto en la materia puede conseguir numerosas secuencias de *gag-pol*. También existen muchas variantes retrovirales descritas que pueden usarse como un punto de partida para generar una secuencia de *gag-pol* de codones optimizados. Los genomas lentivirales pueden ser bastante variables. Por ejemplo existen muchas cuasiespecies de VIH-1 que aún son funcionales. Este también es el caso para VAIE. Estas variantes pueden usarse para potenciar partes particulares del proceso de transducción. Pueden encontrarse ejemplos de variantes de VIH-1 en las Bases de datos de VIH operadas por Los

Alamos National Security, LLC en <<http://hiv-web.lanl.gov>>. Pueden encontrarse detalles de clones de VAIE en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) localizada en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

5 La estrategia para secuencias de *gag-pol* con codones optimizados puede usarse en relación con cualquier retrovirus. Esto se aplicaría a todos los lentivirus, incluyendo VAIE, VIF, VIB, VAEC, VMR, VIS, VIH-1 y VIH-2. Además este método podría usarse para aumentar la expresión de genes de VLTH-1, VLTH-2, HFV, HSRV y retrovirus endógenos humanos (HERV), MLV y otros retrovirus.

10 La optimización de codones puede hacer a la expresión de *gag-pol* independiente de Rev. Para permitir el uso de factores anti rev o RRE en el vector lentiviral, sin embargo, sería necesario hacer al sistema de generación de vectores virales totalmente independiente de Rev/RRE. Por lo tanto, también es necesario modificar el genoma. Esto se consigue optimizando componentes de genoma del vector. Provechosamente, estas modificaciones también conducen a la producción de un sistema más seguro desprovisto de todas las proteínas adicionales tanto en la
15 célula productora como en la transducida.

Sistemas de producción de vectores retrovirales

20 Los vectores retrovirales pueden propagarse convenientemente en células (denominados en ocasiones “células hospedadoras”).

Una célula puede ser cualquier célula en la que pueda propagarse un vector retroviral deseado.

25 Usando líneas celulares productoras/de empaquetamiento estables, es posible propagar cantidades de partículas de vectores virales (por ejemplo preparar títulos adecuados del vector lentiviral) para purificación posterior.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula productora” o “célula productora de vector” se refiere a una célula que contiene todos los elementos necesarios para producción de partículas de vectores lentivirales.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “célula de empaquetamiento” se refiere a una célula que contiene los elementos necesarios para la producción de virus recombinante infeccioso que están ausentes en el genoma de ARN. Típicamente, dichas células de empaquetamiento contienen uno o más plásmidos productores que son capaces de expresar proteínas estructurales virales (tales como *gag-pol* y *env* con codones optimizados) pero no contienen una señal de empaquetamiento.

35 Preferentemente las células productoras/células de empaquetamiento derivan de una célula de mamífero y, preferentemente, de una célula de primate tal como una célula de riñón embrionario humano que se prefiera particularmente. Aunque se prefieren células de primates, cualquier tipo de célula que sea capaz de soportar la replicación del virus sería aceptable en la práctica de la invención. Otros tipos celulares podrían incluir, pero sin limitación, cualquier célula eucariota para la que se establezcan técnicas de cultivo tisular siempre que las células sean permisivas para retrovirus.
40

La célula puede derivar de una línea celular existente, por ejemplo, de una línea celular HEK 293.

45 Para mejorar la seguridad, se han producido líneas celulares en las que se suprime la 3' LTR del provirus. En dichas células, serían necesarias dos recombinaciones para producir un virus de tipo silvestre. Una mejora adicional implica la introducción de los genes *gag-pol* y el gen *env* en construcciones separadas. Estas construcciones pueden introducirse secuencialmente para evitar la recombinación durante la transfección. En estas líneas celulares de construcción dividida, puede conseguirse una reducción adicional en la recombinación cambiando los codones. Esta
50 técnica, basada en la redundancia del código genético, se dirige a reducir la homología entre las construcciones separadas, por ejemplo entre las regiones de solapamiento en las fases abiertas de lectura de *gag-pol* y *env*.

En una realización las células de producción de vector usadas en la presente invención usan como su sistema de producción, tres unidades de transcripción que expresan un genoma, los componentes de *gag-pol* y una envoltura.
55 El casete de expresión de envoltura puede incluir una de varias envolturas tales como VSV-G o diversas envolturas de retrovirus murino tales como 4070A. La envoltura de VSV-G se prefiere particularmente.

60 En una realización las secuencias de proteína de envoltura y secuencias de nucleocápsida están todas integradas de forma estable en la célula productora y/o de empaquetamiento. Sin embargo, una o más de estas secuencias también podrían existir en forma episómica y podría producirse expresión génica del episoma.

Una realización adicional utiliza un sistema inducible por ejemplo, el sistema Tet (Gossen y Bujard) para generar células productoras/de empaquetamiento estables que expresan un producto génico tóxico tal como VSV-G (documento EP 0572401B).
65

En una realización alternativa se usa transfección transitoria para generar las células productoras virales. La transfección transitoria evita el tiempo más largo requerido para generar líneas celulares productoras de vectores estables y puede usarse si el genoma de vector o componentes de empaquetamiento lentiviral son tóxicos para células.

5 En una realización particularmente preferida, la célula de empaquetamiento usada para producir el vector retroviral se produce por la transfección de células (por ejemplo, células HEK293T) con tres plásmidos que codifican (i) el genoma de vector retroviral recombinante, (ii) un vector de expresión que codifica *gag/pol* y (iii) un vector de expresión que codifica *env*.

10 Los métodos de transfección pueden realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el proceso de transfección puede realizarse usando fosfato cálcico o formulaciones disponibles en el mercado tales como Lipofectamine™ 2000CD (Invitrogen, CA) o polietilimina (PEI).

15 También pueden generarse células productoras/de empaquetamiento transduciendo una línea celular adecuada con un vector retroviral que expresa uno de los componentes de la célula productora/de empaquetamiento, es decir, un genoma, los componentes de *gag-pol* y una envoltura como se describe en el documento WO 2004/022761.

20 Se cultivan células transfectadas con los componentes que codifican el vector retroviral para aumentar los números de células y virus y/o los títulos virales. El cultivo de una célula se realiza para permitir que metabolice y/o crezca y/o se divida y/o produzca virus de interés de acuerdo con la invención. Esto puede conseguirse por métodos bien conocidos por los expertos en la materia, e incluye pero sin limitación proporcionar nutrientes para la célula, por ejemplo en el medio de cultivo apropiado. Los métodos pueden comprender crecimiento adherido a superficies, crecimiento en suspensión o combinaciones de los mismos. El cultivo puede realizarse por ejemplo en matraces de cultivo tisular, placas, frascos rotatorios o en biorreactores, usando sistemas discontinuos, semicontinuos, continuos, de fibra hueca y similares. Para conseguir producción a gran escala (continua) de virus a lo largo del cultivo celular se prefiere en la técnica tener células capaces de crecer en suspensión. Se conocen condiciones adecuadas para cultivar células (véase por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973), y R. I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, cuarta edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

30 Preferentemente las células se “desarrollan a granel” en matraces de cultivo tisular y posteriormente se cultivan en recipientes de cultivo multicapas para generar las células productoras de vectores.

35 Preferentemente se cultivan células de un modo adherente para generar las células productoras de vectores.

Preferentemente se cultivan células en un modo discontinuo para generar las células productoras de vectores.

40 Clarificación

En realizaciones preferidas de la invención, el sobrenadante recogido del cultivo celular se clarifica.

De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas la etapa de clarificación se realiza antes de la adición de nucleasa.

45 La clarificación puede realizarse por una etapa de filtración, retirando residuos celulares y otras impurezas. Los filtros adecuados pueden utilizar filtros de celulosa, fibras de celulosa regeneradas, fibras de celulosa combinadas con auxiliares de filtros inorgánicos (por ejemplo tierras diatomeas, perlita, sílice pirógena), filtros de celulosa combinados con auxiliares de filtros inorgánicos y resinas orgánicas, o cualquier combinación de los mismos, y filtros poliméricos (los ejemplos incluyen pero sin limitación, nylon, polipropileno, polietersulfona) para conseguir retirada eficaz y recuperaciones aceptables. En general, es preferible pero no se requiere un proceso de múltiples etapas. Un proceso ejemplar de dos o tres etapas consistiría en un filtro o filtros gruesos para retirar precipitados grandes y residuos celulares seguido de filtro o filtros de segundo estadio de refinamiento con tamaños de poros nominales mayores de 0,2 micrómetros pero menores de 1 micrómetro. La combinación óptima puede estar en función de la distribución del tamaño del precipitado así como otras variables. Además, también pueden usarse para clarificación operaciones de una única etapa que emplean un filtro de tamaño de poro relativamente pequeño o centrifugación. Más generalmente, será aceptable usar en la etapa de clarificación de la presente invención cualquier enfoque de clarificación incluyendo pero sin limitación filtración de punto muerto, microfiltración, centrifugación o adición de auxiliares de filtro (por ejemplo tierras diatomeas) en combinación con filtración de punto muerto o en profundidad, que proporciona un filtrado de claridad adecuada para no obstruir la membrana y/o resinas en las etapas posteriores.

60 En una realización, se usa filtración en profundidad y filtración de membrana. Se mencionan productos disponibles en el mercado útiles a este respecto, por ejemplo, en el documento WO 03/097797, p. 20-21. Las membranas que pueden usarse pueden estar compuestas de diferentes materiales, pueden diferir en su tamaño de poro y pueden usarse en combinaciones. Pueden obtenerse comercialmente de varios proveedores.

65

Preferentemente el filtro usado para clarificación está en el intervalo de 1,2 a 0,22 μm .

Más preferentemente el filtro usado para clarificación es un filtro de 1,2/0,45 μm o un filtro asimétrico con un tamaño de poro nominal mínimo de 0,22 μm

5

Tratamiento con nucleasa

La presente invención en realizaciones preferidas emplea nucleasa para degradar ADN/ARN contaminante, es decir principalmente ácidos nucleicos de células hospedadoras. Las nucleasas ejemplares adecuadas para su uso en la presente invención incluyen Nucleasa Benzonase® (documento EP 0229866) que ataca y degrada todas las formas de ADN y ARN (monocatenarios, bicatenarios, lineales o circulares) o cualquier otra DNasa y/o RNasa habitualmente usada dentro de la técnica con el fin de eliminar ADN y/o ARN no deseado o contaminante de una preparación. En realizaciones preferidas, la nucleasa es Nucleasa Benzonase®, que hidroliza rápidamente ácidos nucleicos hidrolizando enlaces fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos, reduciendo de este modo el tamaño de los polinucleótidos en el sobrenadante que contiene vectores. La Nucleasa Benzonase® puede obtenerse comercialmente de Merck KGaA (código W214950). La concentración en la que se emplea la nucleasa está preferentemente dentro del intervalo de 1-100 unidades/ml.

10

15

20

De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas se incluye más de un tratamiento de nucleasa. Por ejemplo, podría añadirse Nucleasa Benzonase® al sobrenadante que contiene vector antes y/o después de purificarse el vector por cromatografía.

25

Como un ejemplo no limitante, se añade Nucleasa Benzonase® al sobrenadante que contiene vector que está entre 37 °C y temperatura ambiente y cuando la mezcla se incuba de 2 a 8 °C, preferentemente durante una noche.

30

En lugar de o además de tratar con una nucleasa para fragmentar ácido nucleico libre (principalmente ADN de células hospedadoras), podría aplicarse precipitación selectiva (retirada) de ADN de impurezas en medio de cultivo celular, por ejemplo por precipitación con una cantidad apropiada de un agente de precipitación selectivo tal como bromuro de domifeno (DB), CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de bencetonio (BTC), cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTA) polietilenimina (PEI), etc., como se desvela en detalle en el documento WO 03/097797.

Ultrafiltración/diafiltración

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la suspensión de vector se somete a ultrafiltración (denominada en ocasiones diafiltración cuando se usa para intercambio de tampón) al menos una vez durante el proceso, por ejemplo para concentrar el vector y/o intercambio de tampón. El proceso usado para concentrar el vector de acuerdo con el método de la presente invención puede incluir cualquier proceso de filtración (por ejemplo, ultrafiltración (UF)) cuando la concentración del vector aumente obligando al diluyente a pasar a través de un filtro de tal manera que el diluyente se retire de la preparación de vector mientras que el vector es incapaz de pasar a través del filtro y permanece por lo tanto, en forma concentrada, en la preparación de vector. UF se describe en detalle, por ejemplo, en Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman y A. Zydny (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1996); y en: Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN n.º 87762-456-9). Un proceso de filtración preferido es la Filtración de Flujo Tangencial ("FFT") como se describe, por ejemplo, en el catálogo de MILLIPORE titulado "Pharmaceutical Process Filtration Catalog", pp. 177-202 (Bedford, Massachusetts, 1995/96). FFT se usa ampliamente en la industria de bioprocesamiento para recogida de células, clarificación, purificación y concentración de productos incluyendo virus. El sistema se compone de tres flujos de procesamiento distintos: la solución de alimentación, el permeado y el retenido. Dependiendo de la aplicación, pueden usarse filtros con diferentes tamaños de poros. En la presente invención el retenido contiene el producto (vector lentiviral). A este fin, la membrana de ultrafiltración particular seleccionada tendrá un tamaño de poro suficientemente pequeño para conservar el vector pero suficientemente grande para eliminar eficazmente impurezas. Dependiendo del fabricante y el tipo de membrana, para vectores retrovirales pueden ser apropiados puntos de corte de peso molecular nominales (PCPMN) entre 100 y 1000 kDa, por ejemplo membranas con PCPMN de 300 kDa o 500 kDa. La composición de membrana puede ser, pero sin limitación, celulosa regenerada, polietersulfona, polisulfona o derivados de las mismas. Las membranas pueden ser láminas planas (también denominadas pantallas planas) o fibras huecas. Una UF preferida usada en la presente invención es UF de fibras huecas. UF se refiere en general a filtración usando filtros con un tamaño de poro de menos de 0,1 μm . Los productos en general se conservan, mientras que el volumen puede reducirse mediante permeación (o mantenerse constante durante la diafiltración añadiendo tampón a la misma velocidad que la velocidad con la que el permeado, que contiene tampón e impurezas, se retira en el lado de permeado).

40

45

50

55

60

Las dos geometrías más ampliamente usadas para FFT en la industria biofarmacéutica son placa y marco (pantallas planas) y módulos de fibra hueca. Las unidades de fibra hueca para ultrafiltración y microfiltración se desarrollaron por Amicon y Ramicon a principios de los años 70 (Cheryan, M. Ultrafiltration Handbook), incluso aunque existen ahora múltiples proveedores incluyendo Spectrum y GE Healthcare. Los módulos de fibras huecas consisten en una serie de fibras autosustentables con una capa de piel densa. Los diámetros de las fibras varían de 0,5 mm a 3 mm.

65

Una ventaja de los módulos de fibras huecas es la disponibilidad de filtros de áreas de membranas pequeñas (aproximadamente 16 cm²) a áreas de membranas muy grandes (aproximadamente 20 m²) permitiendo un aumento de escala lineal y sencillo. En ciertas realizaciones preferidas de acuerdo con la invención, se usan fibras huecas para FFT. Se ha indicado que estas proporcionan menos cizalla y una mejor relación de partícula viral/unidad infecciosa (PV/UI) que las membranas de pantalla plana. Además, la presión transmembrana es generalmente menor en fibras huecas que con pantallas planas. En ciertas realizaciones, se usan fibras huecas de 500 kDa (0,05 μm) de tamaño de poro de acuerdo con la invención. La ultrafiltración puede comprender diafiltración (DF), usando ultrafiltros y es un modo ideal de retirar e intercambiar sales, azúcares, disolventes no acuosos, separación de especies libres de las unidas, retirada de material de bajo peso molecular o cambio rápido de ambientes iónicos y/o de pH. Se retiran microsolutos más eficazmente añadiendo disolvente a la solución que se ultrafiltra a una velocidad igual a la velocidad de UF. Esto lava las microespecies de la solución a un volumen constante, purificando el vector retenido.

UF/DF puede usarse para concentrar y/o intercambiar el tampón de las suspensiones de vector de acuerdo con la presente invención en diferentes estadios del proceso de purificación. La presente invención preferentemente utiliza una etapa de DF para intercambiar el tampón de un sobrenadante después de cromatografía u otras etapas de purificación, pero también puede usarse antes de la cromatografía.

Preferentemente, el eluato de la etapa de cromatografía de acuerdo con la presente invención se concentra y después se purifica por ultrafiltración-diafiltración. Durante este proceso el vector se cambia a tampón de formulación. Sin embargo, se ha descubierto sorprendentemente que puede conseguirse producción de vector mejorada si la concentración hasta la concentración final deseada no tiene lugar hasta después de la etapa de esterilización por filtrado. Después de dicha filtración estéril, la sustancia esterilizada por filtrado se concentra por UF aséptica para producir el producto de vector a granel.

En realizaciones de la invención la ultrafiltración/diafiltración puede ser diafiltración de flujo tangencial, diafiltración celular agitada y diálisis.

Cromatografía

Los expertos en la materia conocen bien técnicas de purificación. Estas técnicas tienden a implicar la separación de las partículas de vector del medio celular y, si es necesario, la purificación adicional de las partículas de vector. Pueden usarse para esta purificación uno o más de una diversidad de métodos cromatográficos. Aunque la cromatografía de intercambio iónico, y más particularmente de intercambio aniónico, es un método preferido para la presente invención, podrían usarse otros métodos. Se proporciona a continuación una descripción de algunas de las técnicas cromatográficas relevantes.

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico utiliza el hecho de que las especies con carga, tales como biomoléculas y vectores virales, pueden unirse de forma reversible con una fase estacionaria (tal como una membrana, o bien el empaquetamiento en una columna) que tiene grupos, fijados en su superficie, que tienen una carga opuesta. Existen dos tipos de intercambiadores iónicos. Los intercambiadores aniónicos son fases estacionarias que portan grupos que tienen una carga positiva y por lo tanto pueden unirse con especies con una carga negativa. Los intercambiadores catiónicos portan grupos con una carga negativa y por lo tanto pueden unirse con especies con carga positiva. El pH del medio tiene una influencia importante en esto, ya que puede alterar la carga de una especie. Por lo tanto, para una especie tal como una proteína, si el pH está por encima del pI, la carga neta será negativa, mientras que por debajo del pI, la carga neta será positiva.

El desplazamiento (elución) de la especie unida puede efectuarse mediante el uso de tampones adecuados. Por lo tanto habitualmente la concentración iónica del tampón aumenta hasta que la especie se desplaza mediante competición de iones de tampón por los sitios iónicos en la fase estacionaria. Un método alternativo de elución implica cambiar el pH del tampón hasta que la carga neta de la especie ya no favorece la unión con la fase estacionaria. Un ejemplo sería reducir el pH hasta que la especie adopte una carga neta positiva y ya no se una a un intercambiador aniónico.

Puede conseguirse algo de purificación si las impurezas no tienen carga, o bien si portan una carga de signo opuesto a la de la especie deseada, pero el mismo signo que el del intercambiador iónico. Esto se debe a que las especies sin carga y las que tienen una carga del mismo signo que un intercambiador iónico, normalmente no se unirán. Para diferentes especies unidas, la fuerza de la unión varía con factores tales como la densidad de carga y la distribución de cargas en las diversas especies. Por lo tanto aplicando un gradiente iónico de pH (como un gradiente continuo, o como una serie de etapas), la especie deseada podría eluirse por separado de las impurezas.

Cromatografía de Exclusión por Tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño es una técnica que separa especies según su tamaño. Típicamente se realiza mediante el uso de una columna empaquetada con partículas que tienen poros de un tamaño bien definido. Para la separación cromatográfica, se seleccionan partículas que tienen tamaños de poros que son apropiados con respecto a los tamaños de la especie en la mezcla para separar. Cuando se aplica a la mezcla, como una solución (o suspensión, en el caso de un virus), a la columna y después se eluye con tampón, las partículas mayores se eluirán en primer lugar ya que tienen acceso limitado (o no) a los poros. Partículas más pequeñas se eluirán después ya que pueden entrar en los poros y por lo tanto toman una ruta más larga a través de la columna. Por lo tanto al considerar el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño para la purificación de vectores virales, se esperaría que el vector se eluyera antes que las impurezas más pequeñas tales como proteínas.

Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC)

Especies, tales como proteínas, tienen en su superficie, regiones hidrófobas que pueden unirse de forma reversible a sitios débilmente hidrófobos en una fase estacionaria. En medios que tienen una concentración de salinidad relativamente alta, se promueve esta unión. Típicamente en HIC la muestra para purificarse se une a la fase estacionaria en un ambiente de alta salinidad. Se consigue después elución mediante la aplicación de un gradiente (continuo, o como una serie de etapas) de concentración salina decreciente. Una sal que se usa habitualmente es sulfato de amonio. Las especies que tienen diferentes niveles de hidrofobicidad tenderán a eluirse a diferentes concentraciones salinas y por lo tanto las especies diana pueden purificarse de impurezas. Otros factores, tales como pH, temperatura y aditivos al medio de elución tales como detergentes, sales caotrópicas y compuestos orgánicos también pueden influir en la fuerza de unión de especies a fases estacionarias de HIC. Pueden ajustarse uno o más de estos factores o utilizarse para optimizar la elución y purificación del producto.

Los vectores virales tienen en su superficie, restos hidrófobos tales como proteínas, y por lo tanto HIC podría emplearse potencialmente como un medio de purificación.

Cromatografía de Fase Inversa (RPC)

Como HIC, RPC separa especies según diferencias en sus hidrofobicidades. Se usa una fase estacionaria de mayor hidrofobicidad que la empleada en HIC. La fase estacionaria consiste con frecuencia en un material, típicamente sílice, con el que se unen restos hidrófobos tales como grupos alquilo o grupos fenilo. Como alternativa la fase estacionaria podría ser un polímero orgánico, sin ningún grupo unido. La muestra que contiene la mezcla de especies para resolver se aplica a la fase estacionaria en un medio acuoso de polaridad relativamente alta que promueve la unión. Después se consigue elución reduciendo la polaridad del medio acuoso mediante la adición de un disolvente orgánico tal como isopropanol o acetonitrilo. Habitualmente se usa un gradiente (continuo o como una serie de etapas) de concentración de disolvente orgánico creciente y las especies se eluyen en orden de sus hidrofobicidades respectivas.

Otros factores, tales como el pH del medio de elución, y el uso de aditivos, también pueden influir en la fuerza de unión de especies con fases estacionarias de RPC. Uno, o más, de estos factores pueden ajustarse o utilizarse para optimizar la elución y purificación del producto. Un aditivo común es el ácido trifluoroacético (TFA). Esto suprime la ionización de grupos ácidos tales como restos de carboxilo en la muestra. También reduce el pH en el medio de elución y esto suprime la ionización de grupos de silanol libres que pueden estar presentes en la superficie de fases estacionarias que tienen una matriz de sílice. TFA es uno de una clase de aditivos conocidos como agentes de emparejamiento de iones. Estos interactúan con grupos iónicos, presentes en especies en la muestra, que portan una carga opuesta. La interacción tiende a enmascarar la carga, aumentando la hidrofobicidad de la especie. Otros agentes de emparejamiento de iones, tales como TFA y ácido pentafluoropropiónico interactúan con grupos con carga positiva en una especie. Agentes de emparejamiento de iones catiónicos tales como trietilamina, interactúan con grupos con carga negativa.

Los vectores virales tienen en su superficie restos hidrófobos, tales como proteínas, y por lo tanto RPC, potencialmente, podría emplearse como un medio de purificación. Considerando su uso, sin embargo, se requeriría tener cuidado para limitar el daño al vector debido al uso de disolventes orgánicos y también las condiciones de pH bajo usadas con frecuencia en la técnica.

Cromatografía de Afinidad

La cromatografía de afinidad utiliza el hecho de que ciertos ligandos que se unen específicamente con biomoléculas tales como proteínas o nucleótidos, pueden inmovilizarse en una fase estacionaria. La fase estacionaria modificada puede después usarse para separar la biomolécula relevante de una mezcla. Son ejemplos de ligandos altamente específicos anticuerpos para la purificación de antígenos diana e inhibidores enzimáticos para la purificación de enzimas. También pueden utilizarse interacciones más generales tales como el uso del ligando de proteína A para el aislamiento de una amplia serie de anticuerpos.

Típicamente, se realiza cromatografía de afinidad mediante la aplicación de una mezcla, que contiene la especie de interés, a la fase estacionaria que tiene el ligando relevante unido. En condiciones apropiadas esto conducirá a la unión de la especie con la fase estacionaria. Después se retiran por lavado componentes no unidos antes de aplicar un medio de elución. El medio de elución se elige para romper la unión del ligando con la especie diana. Esto se consigue habitualmente mediante la elección de una fuerza iónica apropiada, pH o mediante el uso de sustancias que competirán con la especie diana por sitios del ligando. Para algunas especies unidas, se usa un agente caotrópico tal como urea para efectuar el desplazamiento del ligando. Esto, puede dar como resultado, sin embargo, una desnaturalización irreversible de la especie.

Los vectores virales tienen en su superficie restos tales como proteínas, que podrían ser capaces de unirse específicamente con ligandos apropiados. Esto significa que, potencialmente, podría usarse cromatografía de afinidad en su aislamiento.

Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados (IMAC)

Las biomoléculas, tales como proteínas, pueden tener en su superficie restos donadores de electrones que pueden formar enlaces coordinados con iones metálicos. Esto puede facilitar su unión con fases estacionarias que portan iones metálicos inmovilizados tales como Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} o Fe^{3+} . Las fases estacionarias usadas en IMAC tienen agentes quelantes, típicamente ácido nitriloacético o ácido iminodiacético unido covalentemente con su superficie y es el agente quelante que retiene el ion metálico. Es necesario que el ion metálico quelado tenga al menos un sitio de coordinación restante disponible para formar un enlace coordinado con una biomolécula. Potencialmente existen varios restos en la superficie de biomoléculas que podrían ser capaces de unirse con el ion metálico inmovilizado. Estos incluyen restos de histidina, triptófano y cisteína, así como grupos fosfato. Para proteínas, sin embargo, el donador predominante parece ser el grupo imidazol del resto de histidina. Pueden separarse proteínas nativas usando IMAC si muestran restos donadores adecuados en su superficie. De otro modo puede usarse IMAC para la separación de proteínas recombinantes que portan una cadena de varios restos de histidina unidos.

Típicamente, se realiza IMAC mediante la aplicación de una mezcla, que contiene la especie de interés, a la fase estacionaria. En condiciones apropiadas esto conducirá al enlace coordinado de la especie con la fase estacionaria. Después se retiran por lavado componentes no unidos antes de aplicarse un medio de elución. Para elución, pueden usarse gradientes (continuos o como una serie de etapas) de concentración salina creciente o pH decreciente. Además un procedimiento habitualmente usado es la aplicación de un gradiente de concentración de imidazol creciente. Pueden separarse biomoléculas que tengan propiedades donadoras diferentes, por ejemplo que tengan restos de histidina en diferentes ambientes, mediante el uso de elución de gradiente.

Los vectores virales tienen en su superficie restos tales como proteínas, que podrían ser capaces de unirse con fases estacionarias de IMAC. Esto significa que, potencialmente, podría usarse IMAC en su aislamiento.

Centrifugación

Las técnicas de centrifugación adecuada incluyen centrifugación zonal, ultracentrifugación isopícnica y centrifugación de sedimentación.

Esterilización por Filtrado

La esterilización por filtrado es común en procesos para materiales de uso farmacéutico, y es conocida por los expertos en la materia. La esterilización por filtrado hace a la formulación resultante sustancialmente libre de contaminantes. El nivel de contaminantes después de esterilización por filtrado es tal que la formulación es adecuada para uso clínico. De acuerdo con la presente invención, cualquier concentración adicional (por ejemplo mediante ultrafiltración) después de la etapa de esterilización por filtrado se realiza en condiciones asépticas.

Los expertos en la materia conocen bien filtros de esterilización adecuados para uso en la presente invención. El filtro de esterilización tiene un tamaño de poro máximo de 0,22 μm .

Verificación de la Integridad del Vector

Pueden usarse diversos ensayos para verificar la integridad genética del vector retroviral durante el proceso de purificación. Uno de dichos métodos es confirmar la presencia de un gen codificado por el vector. En una realización preferida, el método puede confirmar la presencia de uno más nucleótidos de interés (NOI) codificados por el vector. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante aislamiento de ARN a partir de la preparación de vector, y digestión con DNasa para degradar ADN plasmídico residual. Las reacciones de transcriptasa inversa (RT) convierten las secuencias de ARN en ADNc, y estas se siguen de amplificación por PCR específica de regiones seleccionadas de la secuencia de NOI.

65

Composiciones Farmacéuticas y Administración

La presente divulgación proporciona una formulación (composición farmacéutica) para tratar a un individuo por terapia génica, en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector. La composición farmacéutica puede ser para uso humano o animal. Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular.

La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección de vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante o aglutinantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento, agente o agentes de solubilización adecuados y otros agentes transportadores que pueden ayudar o aumentar la entrada viral en el sitio diana (tal como por ejemplo un sistema de suministro lipídico).

Cuando sea apropiado, la composición puede administrarse por uno cualquiera o más de: inhalación, en forma de un supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo de uso externo, mediante el uso de un parche cutáneo, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saporíferos o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intracavernosa, vía intravenosa, vía intramuscular, vía intracraneal, vía intraocular o vía subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden usarse mejor en forma de solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para hacer a la solución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o grageas que pueden formularse de una manera convencional.

Tratamiento

El vector retroviral producido por el proceso de la presente invención puede usarse en el tratamiento. Se apreciará que todas las referencias en el presente documento al tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico. Se prefiere en particular el tratamiento de mamíferos. Los tratamientos tanto de humanos como veterinarios están dentro del alcance de la presente divulgación.

En un ejemplo, la formulación de vector retroviral producida por el proceso puede usarse para introducir los tres genes que codifican las tres enzimas de la ruta sintética de dopamina para tratar la enfermedad de Parkinson. El vector retroviral es un vector lentiviral mínimo auto-inactivante, sin replicación, derivado del virus de la anemia infecciosa Equina (VAIE) que puede pseudotipificarse con VSV-G o una proteína de envoltura viral alternativa. Los genes portados por el vector retroviral pueden comprender una forma truncada del gen de tirosina hidroxilasa humana (TH*) (que carece de los 160 aminoácidos N terminales implicados en la regulación de retroalimentación de TH*), la L-aminoácido descarboxilasa aromática humana (AADC), y el gen de la GTP-ciclohidrolasa 1 humana (CH1). El vector retroviral puede producirse por la transfección transitoria de células HEK293T con tres plásmidos, que codifican: (1) el genoma del vector de VAIE recombinante (pONYK1-ORT), (2) el vector de expresión de *gal/pol* de VAIE sintético (pESGPK), (3) el vector de expresión de envoltura de VSV-G (pHGK). La formulación del vector retroviral puede administrarse por inyección directa en el cuerpo estriado del cerebro.

En otro ejemplo, la formulación del vector retroviral producida por el proceso puede usarse como un producto de terapia génica diseñado para introducir el gen de MYO7A corrector en fotorreceptores y soportar células epiteliales de pigmento retiniano (RPE) y de este modo atenuar o invertir el deterioro de la visión que se asocia con el Síndrome de Usher 1B. El vector retroviral es un vector lentiviral mínimo auto-inactivante, no replicativo, derivado del virus de la anemia infecciosa Equina (VAIE) que puede pseudotipificarse con VSV-G o una proteína de envoltura viral alternativa. El gen portado por el vector retroviral es el ADNc de MYO7A, que codifica la proteína MYO7A (un gen grande que tiene más de 100 mb de longitud). La expresión de la proteína MYO7A grande puede optimizarse para dirigirse a RPE y células fotorreceptoras usando el nuevo promotor quimérico de CMV/MYO7A que evita la sobreexpresión de este subtipo de miosina. Sin embargo, también es posible que puedan usarse promotores alternativos, tales como CMV. La formulación del vector retroviral puede administrarse por inyección subretiniana directa después de vitrectomía del ojo.

En otro ejemplo, la formulación de vector retroviral producida por el proceso puede usarse para introducir el gen de casete de unión a ATP corrector, ABCA4 (también conocido como ABCR), en fotorreceptores y de este modo atenuar o invertir la patofisiología que conduce a enfermedad de Stargardt. El vector retroviral es un vector lentiviral mínimo no replicante, auto-inactivante, derivado del virus de la anemia infecciosa Equina (VAIE) que puede pseudotipificarse con VSV-G o una proteína de envoltura viral alternativa. El gen portado por el vector retroviral es el ADNc de ABCA4 que codifica la proteína ABCA4. La expresión de la proteína ABCA4 puede optimizarse para expresión en células fotorreceptoras tanto bastones como conos usando un promotor específico de fotorreceptor, tal como rodopsina quinasa, sin embargo, también es posible que puedan usarse promotores alternativos, tales como

CMV. La formulación de vector retroviral puede administrarse por inyección subretiniana directa después de vitrectomía del ojo.

En otro ejemplo, la formulación de vector retroviral producida por el proceso puede usarse como un producto de terapia génica diseñado para evitar la reaparición del crecimiento de vasos sanguíneos aberrantes en edema en los ojos de pacientes con la forma húmeda de degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Este vector retroviral suministra un gen o genes que codifican una proteína o proteínas anti-angiogénicas, tales como angiostatina y/o endostatina. El vector retroviral es un vector lentiviral mínimo no replicativo, auto-inactivante derivado del virus de la anemia infecciosa Equina (VAIE) que puede pseudotipificarse con VGS-G o una proteína de envoltura viral alternativa. En un ejemplo el vector retroviral expresa genes de endostatina y angiostatina humana en una configuración bicistrónica que utiliza un sitio de entrada ribosómica interna (IRES) para suministro a células del epitelio pigmentario retiniano. La expresión del gen o los genes anti-angiogénicos puede restringirse al epitelio pigmentario retiniano diana usando un promotor específico de RPE tal como el promotor de distrofia macular viteliforme 2 (VMD2), más recientemente conocido como el promotor de bestrofina, sin embargo también es posible que puedan usarse promotores alternativos tales como CMV. La formulación de vector retroviral puede administrarse por inyección subretiniana directa después de vitrectomía del ojo.

En otro ejemplo más, la formulación de vector retroviral producida por el proceso puede usarse como un producto de terapia génica diseñado para evitar el rechazo de injerto corneano como resultado de neovascularización por suministro de gen o genes anti-angiogénicos a la córnea del donante antes del injerto. El vector retroviral es un vector lentiviral mínimo no replicativo, auto-inactivante derivado del virus de la anemia infecciosa Equina (VAIE), que puede pseudotipificarse con VSV-G o una proteína de envoltura viral alternativa. En un ejemplo, el vector retroviral expresará un gen o genes anti-angiogénicos tales como genes de endostatina y angiostatina humanas en una configuración bicistrónica que utiliza un sitio de entrada ribosómica interna (IRES) para suministro *ex vivo* a injertos corneanos. La formulación de vector retroviral puede aplicarse a tejido de injerto corneano *ex vivo*, y el tejido donante transducido puede también almacenarse antes del trasplante. La expresión del gen o genes anti-angiogénicos puede estar conducida por un promotor constitutivo tal como el promotor de CMV, sin embargo también es posible que puedan usarse promotores alternativos.

30 Ejemplos

Se describirán ahora diversos elementos y realizaciones preferidos de la invención por medio de Ejemplos no limitantes en referencia a los ejemplos adjuntos.

35 Descripción del Proceso de Fabricación

ProSavin® es un vector lentiviral, diseñado para la tratar la enfermedad de Parkinson suministrando tres genes que codifican tres enzimas de la ruta biosintética de dopamina.

La sustancia activa del vector ProSavin® consiste en un vector lentiviral mínimo auto-inactivante, derivado del Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) y pseudotipificado con VSV-G, que codifica tres enzimas que están implicadas en la ruta sintética de dopamina.

Las proteínas codificadas por el vector ProSavin® son una forma truncada del gen de tirosina hidroxilasa humana (TH*) (que carece de los 160 aminoácidos N terminales implicados en la regulación de retroalimentación de TH), la L-aminoácido descarboxilasa aromática humana (AADC), y el gen de la GTP-ciclohidrolasa 1 humana (CH1).

El vector ProSavin® se produce por la transfección transitoria de células HEK293T con tres plásmidos que codifican: (1) el genoma del vector de VAIE recombinante ProSavin® (pONYK1-ORT), (2) el vector de expresión de *gal/pol* de VAIE sintético (pESGPK), (3) el vector de expresión de envoltura de VSV-G (pHGK).

Se expanden células HEK293T en matraces de cultivo tisular, en fábricas celulares (FC) de 10 capas como se muestra en la Figura 1. El volumen de sobrenadante, antes de la transfección, es de aproximadamente 24 litros. La mezcla de transfección, que contiene cantidades fijas de los plásmidos y reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, CA) CD o PEI se transfiere a un depósito, unido a una fábrica celular. El medio de cultivo de la FC se drena al depósito y, después de mezclar, el medio que contiene plásmido se devuelve a la FC. Este proceso se repite para todas las FC. A las 14-19 horas después de la transfección, el medio se reemplaza con medio de cultivo nuevo complementado con butirato sódico 10 mM. Después de 6-8 horas de inducción con butirato sódico, el medio que contiene butirato sódico se reemplaza por medio de cultivo nuevo sin butirato sódico. Después de 21-23 horas adicionales, el sobrenadante que contiene vector se recoge en una bolsa flexible estéril.

Después de la recogida de sobrenadante que contiene vector, se recogen muestras de células post producción de todas las FC. Las células post producción (CPP) se ensayan con respecto a lentivirus competente en replicación (LCR) (véase posteriormente). El sobrenadante que contiene vector se clarifica por filtrado, usando un filtro de 1,2/0,45 µm y, para digerir ADN, se añade Nucleasa Benzonase® hasta una concentración final de 5 U/ml (Figura 1). Después de incubación durante una noche a 2-8 °C, el vector tratado con Nucleasa Benzonase® se purifica por

5 cromatografía de membrana de intercambio aniónico, usando un gradiente de elución por etapas de cloruro sódico. La fracción que contiene vector del eluato después se concentra y se purifica adicionalmente por ultrafiltración/diafiltración de fibras huecas. Durante este proceso el vector se cambia a tampón de formulación para producir lotes de sustancias farmacológicas de aproximadamente 400 ml, que se separan en alícuotas y se almacenan congelados a ≤ -70 °C (Figura 1).

10 La sustancia o las sustancias farmacológicas, se descongelan, agrupan y se esterilizan por filtrado (0,2 μm). La sustancia farmacológica a granel esterilizada por filtrado se concentra después por ultrafiltración de fibras huecas para producir el producto farmacológico a granel mostrado en la (Figura 1).

10 Esterilización por Filtrado de Preparación de Vector ProSavin®

15 Para determinar el número y concentración de partículas de vector dentro de lotes individuales, se usó un ensayo de PCR de transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR) para cuantificar el número de secuencias de ARN genómico de vector dentro de preparaciones de vectores. Esto se basa en la naturaleza predecible del empaquetamiento de ARN de vector retroviral y se ha descrito previamente (Radcliffe *et al.* (2008) Gene Therapy 15: 289-297). Una preparación de VAIE, IH18, tuvo una concentración de partículas de vector en el estadio de producto final de $5,6 \times 10^{12}$ copias de ARN por ml. Un intento de filtrar a través de una unidad de filtración esterilizante a esta concentración condujo a solamente 18,5 % de recuperación (las copias de ARN total fueron $3,93 \times 10^{13}$ copias antes de la filtración y $7,26 \times 10^{12}$ después de la filtración). Diversas otras preparaciones también condujeron a escasas recuperaciones de filtración. Se decidió por lo tanto ensayar la hipótesis de que filtrar en un estadio anterior del proceso, en el que la concentración de partículas de vector era menor debido a menor concentración general, puede conducir a mayores recuperaciones del proceso de filtración. El proceso de fabricación ya incluía un estadio de retención intermedio, de modo que los estudios de filtración se centraron en este estadio de fabricación por conveniencia. Para ensayar la hipótesis de que concentraciones menores de vector conducirían a recuperación mejorada de la filtración esterilizante, se filtró material de una preparación de vector anterior, que se sabía que estaba a una concentración de partículas menor. Este lote, IH17, no se procesó inicialmente hasta el estadio de "producto final" debido a pérdidas que se habían producido durante el estadio de intercambio iónico, lo que condujo al número de copias de ARN menor de lo esperado en un estadio intermedio; $5,5 \times 10^{10}$ copias por ml. La filtración de este material condujo a una recuperación drásticamente mejorada del 82,4 %.

35 La confirmación de que concentraciones menores pero volúmenes mayores de partículas de vector conducían a recuperaciones mejoradas de la filtración esterilizante se consiguió posteriormente usando dos lotes diferentes, IH19 e IH21. Para IH19, el número de copias de ARN en el estadio de retención intermedio de fabricación fue de $1,2 \times 10^{12}$ copias por ml. Este se diluyó a $4,6 \times 10^{11}$ copias por ml antes de la filtración, dando como resultado una recuperación de 84,5 % de partículas de vector (las copias de ARN totales fueron de $9,2 \times 10^{13}$ copias antes de la filtración y $7,80 \times 10^{13}$ después de la filtración). Se demostró posteriormente que la fabricación de este lote de vector había tenido éxito por varias otras medidas de calidad de vector, incluyendo el ensayo de fuerza de vector. Para IH21, el número de copias de ARN en el estadio de retención intermedio de fabricación fue de $8,1 \times 10^{10}$ copias por ml. Esto se filtró, lo que condujo a una recuperación de 86,6 % de partículas de vector (las copias de ARN totales fueron $1,64 \times 10^{13}$ copias antes de la filtración y $1,42 \times 10^{13}$ después de la filtración). También se demostró que la fabricación de este lote de vector había tenido éxito por varias otras medidas de calidad de vector, incluyendo el ensayo de fuerza del vector.

45 A partir de estos estudios, se concluyó que se conseguía filtración de partículas de VAIE con altas recuperaciones cuando las concentraciones de vector fueron menores de o iguales a $4,6 \times 10^{11}$ copias por ml.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para producir una formulación de vector retroviral adecuada para la administración a un paciente, que comprende una etapa de esterilización por filtrado y una etapa de concertación, en el que la etapa de concentración es la etapa final en el proceso y la etapa de esterilización por filtrado es la penúltima etapa en el proceso, y en el que en la etapa de concentración se realiza en condiciones asépticas, y además en el que la etapa de esterilización por filtrado se realiza usando un filtro de esterilización con un tamaño de poro máximo de hasta o igual a 0,22 μm .
- 10 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas (i) a (vi) en orden cronológico:
- (i) cultivar células que producen vector retroviral;
 - (ii) recoger el sobrenadante que contiene vector retroviral;
 - 15 (iii) opcionalmente clarificar el sobrenadante;
 - (iv) purificar el vector retroviral para proporcionar una preparación de vector retroviral;
 - (v) esterilización por filtrado de la preparación de vector retroviral; y
 - (vi) concentrar la preparación de vector retroviral para producir el producto a granel final.
- 20 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la etapa (iv) se realiza utilizando un método o combinación de métodos seleccionados de cromatografía, ultrafiltración/diafiltración o centrifugación.
4. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3 en el que se incluye al menos una etapa para degradar ácido nucleico para mejorar la purificación.
- 25 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicha etapa es tratamiento con nucleasa.
6. Un proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 y 5 en el que se lleva a cabo una etapa de degradación de ácido nucleico en cualquier punto hasta e incluyendo la etapa (iv).
- 30 7. Un proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 y 5 en el que la etapa de purificación (iv) incluye una o más etapas de intercambio de tampón.
8. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 en el que la etapa (iii) se realiza por clarificación por filtrado.
- 35 9. Un proceso de acuerdo con cualquiera reivindicación precedente en el que la etapa de concentración se realiza usando ultrafiltración.
- 40 10. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que una preparación de vector retroviral se diluye antes de la esterilización por filtrado.
11. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el vector retroviral deriva de un lentivirus.
- 45 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el vector retroviral deriva de Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) y la concentración de vector retroviral antes de la esterilización por filtrado es menor que o igual a $4,6 \times 10^{11}$ copias de genoma de ARN por ml de preparación de vector retroviral.

Fig. 1

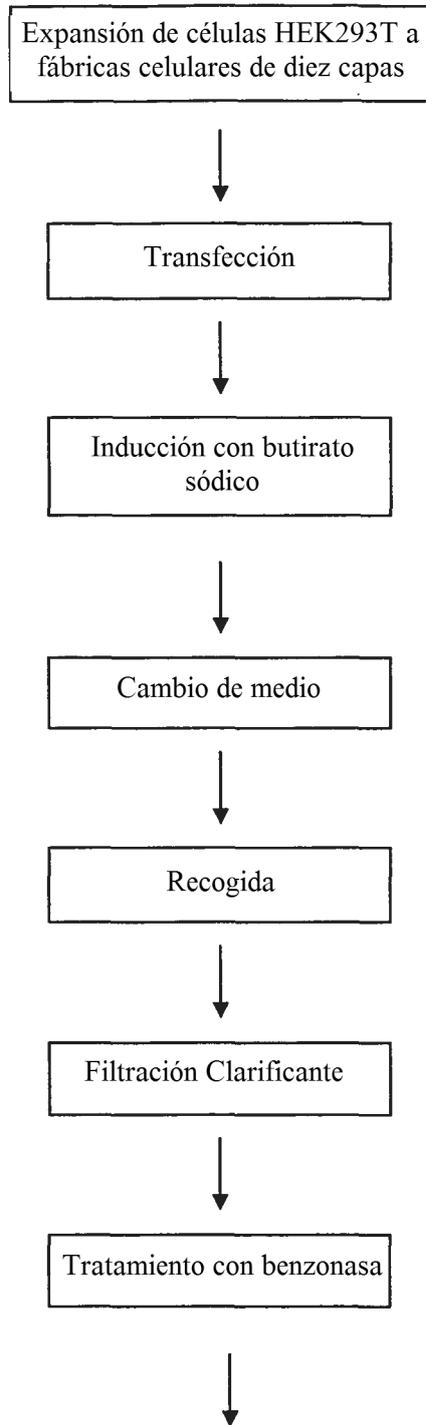


Fig. 1 (continuación)

