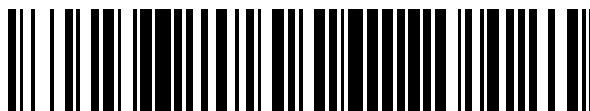


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 477**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2005 PCT/US2005/019235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2005 WO05118792**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2005 E 05755269 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1751275**

54 Título: **Composiciones y métodos para prevenir la agregación del vector AAV**

30 Prioridad:

01.06.2004 US 575997 P
22.12.2004 US 639222 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WRIGHT, JOHN FRASER y
QU, GUANG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 647 477 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

Composiciones y métodos para prevenir la agregación del vector AAV

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para preparar y almacenar viriones de AAV que previenen la agregación.

Antecedentes

El virus adenoasociado recombinante (rAAV) es un vector prometedor para la transferencia de genes humanos. Grimm, D., y Kleinschmidt, J. A. (1999) Hum Gene Ther. 10: 2445-2450; High, K. A. (2001) Ann. N. Y. Acad. Sci. 953: 64-67; Pfeifer, A. y Verma, I. M. (2001) Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211. AAV es un miembro del género Dependovirus de los parvovirus. El serotipo de AAV 2 (AAV2) está compuesto por una molécula de ADN de una sola hebra de 4680 nucleótidos que codifican genes de replicación (*rep*) y encapsidación (*cap*) flanqueados por secuencias de repetición terminal invertida (ITR). Berns, K. I. (1996) en Fields Virology (B. N. Fields y cols. Eds.), pp. 2173-2197. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia. El genoma está empaquetado por tres proteínas de cápside (VP1, VP2 y VP3), que son variantes aminoterminales de producto del gen *cap*. La partícula viras icosaédrica resultante tiene un diámetro de ~26 nm. Se ha presentado una estructura cristalina a alta resolución de AAV2. Xie, Q. y cols. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 10405-10410.

La solubilidad de partículas virales de AAV2 purificadas es limitada, y la agregación de partículas de AAV2 se ha descrito como un problema. Croyle, M. A. y cols. (2001) Gene Therapy 8: 1281-1290; Huang, J. y cols. (2000) Mol. Therapy 1: S286; Wright, J. F. y cols. (2003) Curr. Opin. Drug Disc. Dev. 6: 174-178; Xie, Q. y cols. (2004) J. Virol. Methods 122: 17-27. En las soluciones salinas tamponadas comúnmente usadas, se produce una agregación significativa a concentraciones de 10^{13} partículas/ml, y la agregación se incrementa a concentraciones superiores. Huang y colaboradores presentaron que los vectores de AAV sufren una agregación dependiente de la concentración. Huang, J. y cols. (2000) Mol. Therapy 1: S286. Xie y colaboradores (Xie, Q. y cols. (2004) J. Virol. Methods 122: 17-27) presentaron de forma similar que a concentraciones que superan 0,1 mg/ml, los vectores de AAV2 requieren concentraciones elevadas de sal para prevenir la agregación. La agregación de vectores de AAV2 se produce a concentraciones de partículas que superan 10^{13} partículas/ml en soluciones tamponadas en neutro comúnmente usadas tales como solución salina tamponada con fosfato y Tris. Esto corresponde a una concentración de proteína de ~0,06 mg/ml y enfatiza la baja solubilidad de AAV2 bajo estas condiciones. El límite de concentración efectiva de vector puede ser incluso inferior para vectores purificados usando técnicas de cromatografía en columna debido a que las cápsides vacías en exceso se copurifican y contribuyen a la concentración de partículas.

La agregación de partículas es un problema significativo pero no totalmente resuelto también para los vectores adenovirales. Se ha presentado recientemente la estabilidad de un material de referencia adenoviral (ARM) recientemente establecido. Adadevoh, K. y cols. (2002) BioProcessing 1(2): 62-69. La agregación del material de referencia, formulado en Tris 20 mM, NaCl 25 mM y 2,5% de glicerol a pH 8,0, se determinó mediante dispersión dinámica de luz, espectroscopía de correlación fotónica y la apariencia visual. Se observó un nivel variable de agregación de vectores después del sometimiento bien a ciclos de congelación-descongelación o bien a almacenamiento sin congelación, dando como resultado protocolos restrictivos para el uso del ARM.

La agregación puede conducir a pérdidas durante la purificación e incoherencias en las pruebas de preparaciones de vectores purificados. La administración *in vivo* de vectores de AAV2 a ciertas zonas, tales como el sistema nervioso central, puede requerir pequeños volúmenes de vector muy concentrado, y la dosis máxima alcanzable puede estar limitada por la baja solubilidad del vector.

También es probable que la agregación de vectores influya en la biodistribución después de la administración *in vivo*, y provoque respuestas inmunitarias adversas a los vectores después de su administración. Como se ha presentado para proteínas (Braun, A. y cols. (1997) Pharm. Res. 14: 1472-1478), la agregación de vector puede incrementar la inmunogenicidad al dirigir el vector a células que presentan antígeno, e inducir respuestas inmunitarias potenciadas a las proteínas de la cápside y el producto transgénico. Los informes de respuestas inmunitarias a vectores de AAV en estudios preclínicos (Chenuaud, P. y cols. (2004) Blood 103: 3303-3304; Flotte, T. R. (2004) Human Gene Ther. 15: 716-717; Gao, G. y cols. (2004) Blood 103: 3300-3302) y clínicos (High, K. A. y cols. (2004) Blood 104: 121a) ilustran la necesidad de tratar todos los factores que puedan contribuir a la inmunogenicidad del vector.

También es probable que los protocolos de prueba para caracterizar vectores purificados estén afectados por la agregación del vector. Se presentó que la determinación del título de infectividad del vector era muy sensible a la agregación del vector. Zhen, Z. y cols. (2004) Human Gene Ther. 15: 709-715. Una preocupación importante es que

los agregados de vector puedan tener consecuencias perjudiciales después de la administración *in vivo* debido a que su eficacia de transducción, biodistribución e inmunogenicidad pueden diferir de las partículas monómeras. Por ejemplo, el aporte intravascular de vectores de AAV a hepatocitos requiere que los vectores atraviesen el revestimiento de células endoteliales perforado de los sinusoides hepáticos. Estas perforaciones tienen un radio que varía de 50 a 150 nm (Meijer, K. D. F., y Molema, G. (1995) *Sem. Liver Dis.* 15: 206) que se predice que permite el paso de vectores de AAV monoméricos (diámetro ~26 nm), pero evita el paso de agregados de vector mayores. En estudios de biodistribución en ratones, vectores de AAV2 agregados marcados con la molécula fluorescente Cy3 fueron secuestrados en macrófagos hepáticos después del aporte vascular. Huang, J. y cols. (2000) *Mol. Therapy* 1: S286.

El desarrollo de formulaciones para vectores de transferencia génica basados en virus es un área de investigación relativamente reciente, y solo se han presentado unos pocos estudios que describen esfuerzos sistemáticos para optimizar la formulación y la estabilidad de vectores de AAV. Croyle, M. A. y cols. (2001) *Gene Therapy* 8: 1281-1290; Wright, J. F. y cols. (2003) *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* 6: 174-178; Xie, Q. y cols. (2004) *J. Virol. Methods* 122: 17-27. Definir formulaciones compatibles con aplicaciones preclínicas y clínicas que minimicen los cambios en preparaciones de vectores es un requisito importante para alcanzar característica de seguridad y funcionales del vector coherentemente altas. Como está bien establecido para los tratamientos proteínicos (Chen, B. y cols. (1994) *J. Pharm. Sci.* 83: 1657-1661; Shire, S. J. y cols. (2004) *J. Pharm. Sci.* 93: 1390-1402; Wang, W. (1999) *Int. J. Pharm.* 185: 129-188; Won, C. M. y cols. (1998) *Int. J. Pharm.* 167: 25-36), un aspecto importante de la estabilidad del vector es la solubilidad durante la preparación u el almacenamiento, y la agregación del vector es un problema que necesita ser tratado a fondo. La agregación del vector conduce a pérdidas durante la purificación del vector, y aunque los agregados se pueden retirar mediante filtración, la pérdida de rendimiento da como resultado costes superiores y limitaciones de capacidad cuando se produce vector para estudios preclínicos y clínicos. Incluso después de la filtración para retirar agregados, se pueden formar nuevos agregados en preparaciones concentradas de vector de AAV2 en soluciones salinas tamponadas.

Existe la necesidad de formulaciones y métodos para la purificación y el almacenamiento de vectores de AAV, tales como rAAV2, mejorados que eviten la agregación de partículas de virus.

Sumario de la invención

Estas y otras necesidades de la técnica son satisfechas por la presente divulgación, que proporciona soluciones de alta fuerza iónica para el uso en la preparación y el almacenamiento de vectores de AAV que mantienen un título de infectividad y una eficacia de transducción altas, incluso después de ciclos de congelación-descongelación.

En un aspecto la divulgación se refiere a métodos para prevenir la agregación de viriones en una preparación de viriones al añadir excipientes para alcanzar una fuerza iónica suficientemente alta para prevenir la agregación. En otro aspecto la divulgación se refiere a composiciones de viriones que tienen una fuerza iónica suficientemente alta para prevenir la agregación.

En algunas realizaciones de la divulgación, la fuerza iónica es al menos aproximadamente 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM o más. En algunas realizaciones esta fuerza iónica se consigue usando excipientes que comprenden uno o más iones multivalentes, por ejemplo citrato, sulfato, magnesio o fosfato.

En realizaciones adicionales, la osmolaridad de la preparación de viriones se mantiene a niveles casi isotónicos, por ejemplo 200 mOsm, 250 mOsm, 280 mOsm, 300 mOsm, 350 mOsm o 400 mOsm, aunque la fuerza iónica sea suficientemente alta para prevenir la agregación de viriones.

En algunas realizaciones los viriones son viriones de virus adenoasociados (AAV), por ejemplo AAV-2.

En otras realizaciones de los métodos de la presente divulgación, las preparaciones de viriones se tratan con una nucleasa, por ejemplo Benzonase[®]. En realizaciones adicionales, el tratamiento con nucleasa se combina con la adición de excipientes que alcanzan una fuerza iónica suficientemente alta para prevenir la agregación.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, se añade el tensioactivo Pluronic[®] F68 a una preparación de viriones, por ejemplo hasta 0,001%. En una realización, la composición comprende partículas virales purificadas, Tris 10 mM pH 8,0, citrato sódico 100 mM y 0,001% de Pluronic[®] F68.

En una realización, los vectores de AAV se pueden almacenar como composiciones de la presente divulgación a concentraciones que superen 1×10^{13} vg/ml, por ejemplo 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} y hasta $6,4 \times 10^{13}$ vg/ml, sin agregación significativa. En algunas realizaciones, los vectores de AAV almacenados usando los métodos y las composiciones de la divulgación no exhiben una agregación significativa cuando se almacenan a 4°C durante cinco días. En otras realizaciones, los vectores de AAV que se almacenan como estas composiciones no exhiben una agregación significativa después de uno, cinco, diez o más ciclos de congelación-descongelación a -20°C a -80°C.

En algunas realizaciones, las preparaciones de viriones almacenadas según los métodos y las composiciones de la divulgación exhiben un radio de partícula medio (Rh), según se mide mediante dispersión dinámica de luz, indicando que no ha tenido lugar una agregación significativa de viriones. En algunas realizaciones, las preparaciones de viriones almacenadas según los métodos y las composiciones de la divulgación exhiben un radio de partícula medio (Rh) mayor de aproximadamente 15 nm, 20 nm o 30 nm.

En algunas realizaciones, la recuperación de viriones de preparaciones de viriones almacenadas según los métodos y las composiciones de la divulgación es mayor de aproximadamente 85%, 90% o 95% después de la filtración a través de un filtro de 0,22 μ m.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a estuches que comprenden las formulaciones de alta fuerza iónica de la divulgación. En una realización, el estuche comprende una solución premezclada de excipientes. En otra realización, el estuche comprende dos o más componentes separados de una composición de alta fuerza iónica de la presente divulgación para ser mezclados por un usuario. En algunas realizaciones, el estuche comprende citrato sódico, Tris® y Pluronic® F68. En otras realizaciones, el estuche comprende además instrucciones para elaborar una composición o realizar un método de la presente divulgación.

Basándose en la presente divulgación, la presente invención proporciona un método para prevenir la agregación de viriones de AAV2 en una preparación de dichos viriones, que comprende añadir uno o más excipientes a viriones de AAV2 para producir una preparación isotónica de viriones con una fuerza iónica de al menos 250 mM, en donde la concentración de viriones de AAV2 dentro de la preparación supera 1×10^{13} vg/ml, y en donde uno o más de los excipientes comprende un ion multivalente.

Aspectos y realizaciones adicionales de la invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de los dibujos

Las FIGS. 1A y 1B presentan datos que muestran la agregación de partículas de AAV2-FIX como una función de la osmolaridad (FIG. 1A) o la fuerza iónica (FIG. 1B) para diversas composiciones tamponadoras. Los vectores de AAV2-FIX se preparan mediante el Método 2 del Ejemplo 1. El radio de partícula medio se mide mediante dispersión dinámica de luz (DLS) después de la dilución del vector en concentraciones variables de excipientes tamponados con fosfato sódico 10 mM a pH 7,5. Los excipientes incluyen cloruro sódico (), citrato sódico (), fosfato sódico (), sulfato sódico (), sulfato magnésico () y glicerol ().

La FIG. 2 presenta datos sobre la agregación de AAV2-FIX como una función del método de purificación. El radio de partícula medio se mide mediante DLS después de la dilución del vector en concentraciones variables de cloruro sódico tamponado con fosfato sódico 10 mM a pH 7,5. Los vectores se purifican mediante el Método 1 (doble gradiente de CsCl) (); Método 2 (cromatografía de intercambio catiónico) (); Método 2 más digestión con nucleasa (); o Método 3 (cromatografía más un gradiente de CsCl) (). Los Métodos de purificación 1-3 se describen en el Ejemplo 1.

La FIG. 3 presenta datos sobre la expresión transgénica desde células D7/4 transducidas con viriones de rAAV2-AADC preparados y almacenados en una formulación de alta fuerza iónica () o en una formulación de control (). La concentración de AADC se midió mediante ELISA (por triplicado para cada punto de datos) 72 horas después de la transducción. Las barras de error representan desviaciones estándar.

Descripción detallada de la invención

Frecuentemente, se observa agregación del vector AAV2 en preparaciones concentradas de vectores y puede afectar a la recuperación de la purificación y a la potencia y seguridad *in vivo*. De ahí que un objetivo importante para el desarrollo de vectores de AAV2 sea identificar métodos y formulaciones que prevengan la agregación de vectores cuando se preparan soluciones madre concentradas.

A menos que se indique otra cosa, el término "vector" según se usa en la presente se refiere a un virión, o partícula de virus, de AAV recombinante, independientemente del uso frecuente de "vector" para referirse también a moléculas no virales ADN, tales como plásmidos, en otros contextos.

La presente invención se basa en parte en la observación de que la fuerza iónica de la solución es un parámetro importante en la agregación de vectores de AAV, implicando la involucración de interacciones iónicas entre partículas de virus en el proceso de agregación. La observación de que la fuerza iónica elevada incrementa la solubilidad de vectores de AAV2 independientemente de la identidad del excipiente cargado apoya la hipótesis de que la fuerza iónica de la solución de por sí, más que las interacciones que involucran a una especie iónica específica, es el parámetro fisicoquímico pertinente. Se requiere una fuerza iónica liminar de al menos 250 mM para prevenir la agregación con las concentraciones de partículas de vector examinadas en la presente.

Desde el punto de vista práctico, las soluciones salinas tamponadas comúnmente usadas tienen una fuerza iónica insuficiente para prevenir la agregación de vectores de AAV2 a concentraciones que superan 10^{13} partículas/ml. Se sabe que las concentraciones altas de sal incrementan la solubilidad de vectores de AAV2 (p. ej., los vectores de AAV2 muy concentrados recuperados de gradientes generalmente permanecen solubles en CsCl concentrado). Sin embargo, las formulaciones óptimas para estudios preclínicos y clínicos deben ser casi isotónicas (280-400 mOsm), especialmente para la administración *in vivo* de vector a zonas en las que la dilución de soluciones hipertónicas puede ser lenta. En realizaciones de la presente invención, la relación exponencial de la fuerza iónica con la valencia de carga se usa para desarrollar formulaciones isotónicas con altas fuerzas iónicas. Las especies salinas con múltiples valencias de carga (p. ej. sales de sulfato, citrato y fosfato) que se usan comúnmente como excipientes en formulaciones parenterales humanas pueden proporcionar el nivel de fuerza iónica necesario para prevenir la agregación de vectores de AAV2 cuando se usan en concentraciones isotónicas. Mientras que el cloruro sódico isotónico (150 mM) tiene una fuerza iónica de 150 mM, un valor insuficiente para mantener la solubilidad de AAV2 a altas concentraciones de vector, el citrato sódico isotónico, con una fuerza iónica de ~500 mM, puede soportar concentraciones de vector de AAV2 de al menos $6,4 \times 10^{13}$ vg/ml sin agregación.

Sin pretender limitarse por una teoría, la baja solubilidad de partículas de AAV2 puede estar provocada por su naturaleza altamente asimétrica junto con el efecto estabilizador de regiones cargadas complementarias entre partículas próximas en los agregados. La densidad de carga superficial basada en la estructura cristalina de AAV2 (Xie, Q. y cols. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 10405-10410) revela un patrón de cargas positivas y negativas sobre la superficie del virus. Informes previos han mostrado que la agregación de vectores de AAV2 depende del pH, y se establece como hipótesis que aminoácidos con grupos laterales cargados están implicados en la unión entre partículas. Qu, G. y cols. (2003) Mol. Therapy 7: S238. Estos informes establecen como hipótesis que si están implicadas cadenas laterales de aminoácidos cargadas en la agregación de vectores, las concentraciones altas de aminoácidos libres podrían bloquear las interacciones de partículas vectoriales. Sin embargo, se ha encontrado que los aminoácidos con cadenas laterales cargadas no son eficaces para prevenir la activación de vectores de AAV2 más allá de su contribución a la fuerza iónica.

También se encontró que la agregación de vectores a baja fuerza iónica se reducía pero no se prevenía mediante un tratamiento eficaz con nucleasa de las partículas vectoriales purificadas. La digestión en una fase temprana del procedimiento de purificación (lisado de células HEK clarificado) no reducía la agregación después de la purificación del vector. Es probable que la digestión de viriones ya purificados sea más eficaz debido a una relación superior de enzima a sustrato de ácido nucleico. Un mecanismo para explicar estos resultados es que las impurezas de ácido nucleico residuales (p. ej. célula hospedadora y ADN plasmídico) unidas a la superficie del vector pueden servir de puente a sitios de unión sobre partículas virales próximas y provocar así la agregación. Se ha presentado que los vectores de AAV2 purificados (libres de cápside vacía) contienen aproximadamente 1% de ADN no vectorial. Smith, P. y cols. (2003) Mol. Therapy 7: S348. Aunque se presentó que >50% de este ADN no vectorial era resistente a nucleasa y estaba empaquetado dentro de partículas de cápside, algo de ADN de las impurezas era resistente a nucleasa y parecía estar asociado con la superficie de partículas vectoriales purificadas. La observación de que el tratamiento eficaz con nucleasa puede reducir la agregación del vector sugiere que los ácidos nucleicos asociados con la superficie del vector a un nivel medio no mayor de ~25 nucleótidos por partícula de vector pueden contribuir a la agregación de vectores de AAV.

En resumen, el uso de soluciones de gran fuerza iónica durante la purificación y la formulación final de vectores de AAV2 y la retirada eficaz de ADN residual de la superficie del vector son dos estrategias eficaces para conseguir soluciones muy concentradas de vectores de AAV2 para el uso en estudios preclínicos y clínicos. Las soluciones de alta fuerza iónica y el tratamiento con nucleasas se pueden usar en combinación o separadamente. Aunque los datos se obtuvieron usando vectores de AAV2, la composición y los métodos de la presente divulgación también pueden ser útiles con otros serotipos / variantes de AAV, u otros vectores virales tales como adenovirus, lentivirus y retrovirus.

Agregación de AAV como una función de la concentración de excipiente

Se realizan experimentos de cribado iniciales para elucidar el mecanismo de agregación del vector de AAV y para identificar clases de excipientes que pueden reducir / prevenir la agregación. La agregación de vector puede estar provocada por dilución (5 veces) de vector en solución salina tamponada hasta neutralidad con tampón de baja concentración (fosfato sódico 20 mM, pH 7,2). Los excipientes se criban usando este método de "estrés por dilución" para identificar excipientes que son capaces de prevenir la agregación del vector cuando se incluyen en el diluyente. Para el cribado, la agregación se mide mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Las clases de excipientes examinadas incluían sales inorgánicas, aminoácidos, carbohidratos no cargados y tensioactivos seleccionados. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Cribado con respecto a excipientes que previenen la agregación de vectores de AAV2 usando un método de estrés por dilución

Excipiente	Osm requerida para prevenir la agregación (máx. probada)
Sulfato magnésico	180 mOsm
Citrato sódico	220 mOsm
Cloruro sódico	320 mOsm
Fosfato sódico	220 mOsm
Sulfato sódico	220 mOsm
Arginina	SIN (200 mOsm)
Ácido aspártico	320 mOsm
Ácido glutámico	320 mOsm
Glicina	SIN (200 mOsm)
Histidina	SIN (200 mOsm)
Lisina	300 mOsm
Glicerol	SIN (5% p/v, 543 mOsm)
Iodixanol	SIN (5% p/v, 32 mOsm)
Manitol	SIN (5% p/v, 275 mOsm)
Sorbitol	SIN (5% p/v, 275 mOsm)
Sacarosa	SIN (5% p/v, 146 mOsm)
Trehalosa	SIN (5% p/v, 146 mOsm)
Pluronic® F68	SIN (10% p/v, 12 mOsm)
Polisorbato 80	SIN (1% p/v)

5

SIN: Sin inhibición de la agregación

Según se ilustra en la Tabla 1, los excipientes cargados (sales inorgánicas y aminoácidos) previenen la agregación cuando están presentes en concentraciones suficientes. Sin embargo, las concentraciones de sal requeridas para prevenir la agregación del vector varían, cambiando de 180 mOsm para el sulfato magnésico a 320 mOsm para el cloruro sódico. Los aminoácidos arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina y lisina no previenen la agregación a 200 mOsm, pero la lisina, el ácido aspártico y el ácido glutámico previenen la agregación a 300-320 mOsm. La arginina, la glicina y la histidina no se probaron a concentraciones distintas a 200 mOsm. Carbohidratos seleccionados no tienen efecto sobre la agregación del vector cuando están presentes en concentraciones hasta 5% p/v. Por ejemplo, 5% p/v de glicerol (543 mOsm) no previene la agregación. De forma similar, los tensioactivos polisorbato 80 (1% p/v) y Pluronic® F68 (10% p/v) no tienen efecto sobre la agregación usando el método de "estrés por dilución".

Aggregación de AAV como una función de la osmolalidad y la fuerza iónica

Las FIGS. 1A y 1B muestran los resultados de un análisis más detallado de la agregación del vector como una función de la concentración de diversas sales. La FIG. 1A muestra la agregación de vector como una función de la osmolalidad de excipientes seleccionados. Para especies cargadas, se observa una inhibición dependiente de la concentración de la agregación de vector de AAV2. Las sales con iones multivalentes alcanzan un grado similar de inhibición de la agregación a concentraciones inferiores que el cloruro sódico monovalente. Por ejemplo, el sulfato magnésico previene la agregación a 200 mOsm mientras que el cloruro sódico requiere 350 mOsm para alcanzar un efecto similar. El citrato sódico, el sulfato sódico y el fosfato sódico son intermedios en su potencia para prevenir la agregación del vector.

Aunque los resultados de la FIG. 1A y la Tabla 1 no muestran efecto del glicerol ni ciertos azúcares a concentraciones de hasta 5% sobre la agregación del vector de AAV2 inducida por baja fuerza iónica, los datos no pueden descartar una mejora de la solubilidad de AAV2 a concentraciones de glicerol por encima de 5%. Por

ejemplo, Xie y colaboradores presentaron que glicerol al 25% (p/v) permitía la concentración de AAV2 hasta concentraciones muy altas ($4,4$ a 18×10^{14} partículas/ml) en soluciones de baja fuerza iónica. Xie, Q. y cols. (2004) J. Virol. Methods 122: 17-27.

La FIG. 1B muestra los datos de la FIG. 1A representados como una función de la fuerza iónica calculada, en lugar de la osmolaridad, para cada excipiente. La FIG. 1B demuestra que la agregación del vector se previene cuando la fuerza iónica es ~ 200 mM o mayor independientemente de qué sal se use. Estos datos sugieren que la fuerza iónica (μ) de una solución, un parámetro que depende tanto de la concentración de soluto como de la valencia de carga, es el principal factor que afecta a la agregación.

Fuerzas iónicas útiles para prevenir la agregación en realizaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM o fuerzas iónicas superiores. Se prefieren iones multivalentes para alcanzar estas fuerzas iónicas en métodos y formulaciones de la presente divulgación, tales como iones divalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes e iones de valencia aún superior. El tampón de pH en las soluciones y formulaciones de la presente invención puede ser fosfato, Tris, o HEPES (u otros tampones de Good), pero se puede usar cualquier otro tampón de pH adecuado. En realizaciones preferidas, los iones multivalentes y el tampón se seleccionan para que sean compatibles con el tejido elegido para el vector que se prepara.

El uso de iones multivalentes en los métodos y las composiciones de la invención hace posible crear composiciones de alta fuerza iónica pero osmolaridad relativamente baja. Las composiciones de alta fuerza iónica de la presente invención pueden ser casi isotónicas, y pueden ser, por ejemplo, aproximadamente 200 mOsm, 250 mOsm, 280 mOsm, 300 mOsm, 350 mOsm o 400 mOsm.

Agregación de AAV como una función del método de purificación de AAV

Se esperaría que el AAV2 recombinante purificado usando diferentes métodos (p. ej. purificación por gradiente de densidad frente a cromatografía de intercambio iónico) tuviera diferentes perfiles de impurezas. La FIG. 2 muestra la agregación del vector como una función de la fuerza iónica para varias preparaciones de AAV que difieren en el método de purificación. Métodos de purificación se describen en el Ejemplo 1. Se usa cloruro sódico para variar la fuerza iónica. Los vectores de AAV2-FIX purificados mediante doble ultracentrifugación con gradiente de cloruro de cesio (Método 1), mediante cromatografía en columna de intercambio iónico (Método 2) o mediante columna y ultracentrifugación con gradiente de cloruro de cesio (Método 3) demuestran todos respuestas de agregación similares a medida que se disminuye la fuerza iónica. En contraste, AAV2-FIX purificado mediante el método en columna y a continuación sometido a una etapa de digestión con nucleasa (Método 2 + nucleasa) muestra una agregación reducida a baja fuerza iónica.

Agregación de AAV a escala preparativa

Los datos de la Tabla 1 y las FIGS. 1A, 1B y 2 implican la agregación del vector a escala analítica, empleando DLS para medir la agregación. La Tabla 2, en contraste, muestra los efectos de una fuerza iónica elevada y el tratamiento con nucleasa sobre la agregación del vector de AAV2 a mayor escala, usando métodos para inducir y cuantificar la agregación del vector que sean pertinentes para la purificación del vector a escala preparativa. Se proporcionan detalles experimentales en el Ejemplo 2. Los vectores de AAV purificados se diafiltran en soluciones de diversas fuerzas iónicas, el volumen se reduce para alcanzar altas concentraciones de vector y a continuación se determina la agregación al medir la recuperación de vector después de la filtración a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. Se usan como materia prima en los experimentos de diafiltración partes alícuotas procedentes de una sola fracción reunida de vector de AAV2-AADC purificado mediante el Método 1 a través de la segunda etapa de centrifugación en gradiente de CsCl ($1,8 \times 10^{15}$ vg en 91 ml, $1,8 \times 10^{13}$ vg/ml, en CsCl $\sim 3\text{M}$). Se usa para la diafiltración una filtración de flujo tangencial que usa fibras huecas debido a que se puede aumentar a escala y sin embargo todavía permite la preparación de volúmenes (mín. 1,4 ml), y así concentraciones, de AAV a las que se esperaría que se esperaría agregación en solución salina tamponada a neutralidad.

En el Experimento 1, se usan tres unidades de fibra hueca para diafiltrar vector de AAV2-AADC en las formulaciones CF, TF1 o TF2, y el volumen se reduce hasta un objetivo de $2,5 \times 10^{13}$ vg/ml. Véase el Ejemplo 2. A continuación, las muestras se filtran a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. Los resultados se muestran en la Tabla 2. La recuperación de vector ("% de Rendimiento") para ambas formulaciones de fuerza iónica elevada TF1 ($95 \pm 7,4\%$) y TF2 ($93 \pm 7,4\%$) es significativamente superior que la recuperación usando la formulación de control CF ($77 \pm 6,6\%$).

Tabla 2

Recuperación del vector de AAV a escala del procedimiento

Experimento	Formulación	μ (mM)	Objetivo (vg/ml)	Real (vg/ml)	% de Rendimiento (RSD)
1	CF	160	2,5E13	1,93E13	77 (6,6)
1	TF1	310	2,5E13	2,38E13	95 (7,4)
1	TF2	510	2,5E13	2,33E13	93 (7,4)
2	CF	160	6,7E13	3,98E13	59 (6,0)
2	TF2	510	6,7E13	6,42E13	96 (4,4)
3	CF (-Bz)	160	3,6E13	2,46E13	68 (11)
3	CF (+Bz)	160	3,6E13	3,29E13	91 (12)

5 En el Experimento 2, AAV2-AADC se concentra hasta un valor buscado superior ($6,7 \times 10^{13}$ vg/ml) en CF o TF2. La recuperación del vector usando TF2 ($96 \pm 4,4\%$) es de nuevo significativamente superior que la recuperación usando CF ($59 \pm 6,0\%$). Dentro de la variabilidad de los ensayos usados, el vector se recuperaba completamente a ambas concentraciones buscadas usando TF2, indicando que se prevenía la agregación. En contraste, se observaba una agregación significativa a ambas concentraciones buscadas usando CF, y el grado de agregación (es decir, la pérdida después de filtración en $0,22 \mu\text{m}$) era superior a la concentración de vector buscada superior. En un experimento adicional (no mostrado), se toman muestras de $50 \mu\text{l}$ de vector de AAV2 después de la concentración pero antes de la etapa de filtración en $0,22 \mu\text{m}$ del Experimento 2, y se examinan mediante microscopía óptica. El vector concentrado en CF contiene cantidades obvias de material visible (no mostrado), mientras que no se observa este material en vector concentrado en TF2.

15 El Experimento 3 examina el efecto de la digestión previa con nucleasa del vector purificado sobre la agregación. En ausencia de digestión con nucleasa, la recuperación de AAV2-AADC en CF es $68 \pm 11\%$, similar a las recuperaciones de los Experimentos 1 y 2. En contraste, el vector purificado tratado con nucleasa y a continuación concentrado en CF da una recuperación superior ($91 \pm 12\%$). Estos resultados a escala preparativa reflejan el mismo efecto de la digestión con nucleasa mostrada en la FIG. 2 usando el método de "estrés por dilución" (escala analítica).

20 Los resultados presentados en la Tabla 2 demuestran que los métodos y las composiciones de la presente invención incrementan la recuperación del vector de AAV. Por ejemplo, en diversas realizaciones de la presente invención, la recuperación se mejora desde menos de aproximadamente 80% hasta al menos aproximadamente 85%, 90%, 95% o más.

25 Estabilidad y actividad de AAV después del almacenamiento o el sometimiento a ciclos de congelación-descongelación

30 Croyle y colaboradores presentaron una pérdida significativa de título de AAV y adenovirus después de someter a múltiples ciclos de congelación-descongelación en tampón de fosfato sódico, y demostraron que el mejor tamponamiento del pH proporcionado por el fosfato potásico durante el sometimiento a ciclos de congelación-descongelación prevenía la pérdida de título. Croyle, M. A. y cols. (2001) Gene Therapy 8: 1281-1290. Los resultados del estudio de estabilidad a la congelación-descongelación de los presentes inventores usando fosfato sódico apoyan estos hallazgos. Los presentes inventores encontraron que, aunque el fosfato sódico 150 mM proporciona suficiente fuerza iónica para prevenir la agregación durante la preparación y el almacenamiento sin congelación de vector de AAV2-AADC concentrado, incluso un solo ciclo de congelación-descongelación a -20 o -80°C da como resultado agregación.

40 La estabilidad de AAV después del almacenamiento o el sometimiento a ciclos de congelación-descongelación (F/T) se determina en tampones de la presente invención como sigue. Los vectores concentrados preparados en CF, TF1 y TF2 (Tabla 2, Experimento 1) se someten a un corto estudio de estabilidad para investigar si se producirá agregación durante el almacenamiento refrigerado, o después de múltiples ciclos de congelación-descongelación (F/T). La agregación se determina mediante DLS usando muestras no diluidas, y se considera que los valores de $R_h > 20 \text{ nm}$ indican la presencia de algún nivel de agregación.

Tabla 3

Estabilidad de vectores de AAV2

Formulación	Radio de partícula - Rh (nm)							
	Pre	4 °C	- 20 °C			- 80 °C		
		5d	1 F/T	5 F/T	10 F/T	1 F/T	5 F/T	10 F/T
CF	14,5	27,0	22,4	56,1	94,5	20,6	57,5	141
TF1	13,8	16,3	TH	TH	TH	TH	TH	TH
TF2	13,8	14,4	14,2	14,0	14,1	13,8	21,3	50,9

- 5 Pre: Radio por DLS medido inmediatamente después de la filtración en 0,2 µm.
 Concentraciones de vector (vg/ml): CF: 1,93E13, TF1: 2,38E13, TF2: 2,33E13.
 TH: la intensidad de la señal es demasiado alta para medir debido a una agregación intensiva.

10 Según se muestra en la Tabla 3, el vector de AAV2-AADC preparado en CF muestra algo de agregación después de 5 días de almacenamiento a 4°C, así como después de uno o más ciclos de F/T a -20 o -80°C. Para el vector preparado en TF1, no se produce agregación después de 5 días a 4°C, pero se produce agregación después de un solo ciclo de F/T a -20 o -80°C según se indica por una intensidad de señal de DLS que es demasiado alta para medir. La inspección visual de estas muestras revela una ligera turbidez, que es coherente con la agregación. Para el vector preparado en TF2, no se observa agregación a 4°C, o después de hasta 10 ciclos de F/T a -20°C. Se observa algo de agregación después de 5 y 10 ciclos de F/T a -80 °C.

20 La actividad de AAV después del almacenamiento o el sometimiento a ciclos de F/T en TF2 se determina como sigue. Según se describe anteriormente, la formulación isotónica de alta fuerza iónica TF2 previene eficazmente la agregación del vector durante la concentración y el almacenamiento, por lo tanto, representa un candidato prometedor para un estudio adicional. Una cuestión importante es si la preparación y el almacenamiento del vector en TF2 de alta fuerza iónica afectarían adversamente a su actividad funcional. Para determinar esto, se realizan ensayos para medir el título infeccioso y la eficacia de transducción de vectores preparados y almacenados durante un período prolongado en TF2.

25 Para la infectividad, se usa un ensayo de infectividad muy sensible capaz de detectar episodios infecciosos individuales. Zhen, Z. y cols. (2004) Human Gene Ther. 15: 709-715. Se prepara AAV2-AADC en TF2 a una concentración de $6,4 \times 10^{13}$ vg/ml. Después de almacenarse durante 45 días a 4°C, la preparación tiene una relación unitaria de genoma vectorial a unidad infecciosa (vg/IU) de 13, en comparación con un valor de 16 vg/IU para el vector de referencia. Esta diferencia no es significativa dada la variabilidad presentada de este ensayo (RSD ~50%).

30 La eficacia de transducción se determina al medir la expresión de proteína de AADC mediante ELISA después de la transducción de células D7/4. La FIG. 3 no muestra una diferencia significativa entre un vector preparado en TF2 y el control de referencia para un aporte de vector que varía de 10 a 10^5 vg/célula. Conjuntamente, estos datos indican que la preparación y el almacenamiento de vectores de AAV2 en TF2 de alta fuerza iónica no tiene un efecto perjudicial sobre la infectividad del vector o la eficacia de transducción.

Conclusión

40 Se determina el efecto de la fuerza iónica (µ) sobre las interacciones de partículas virales para elucidar el mecanismo de agregación del vector. La fuerza iónica de la solución salina isotónica tamponada hasta neutralidad (µ = 150 mM) es insuficiente para prevenir la agregación de vectores de AAV2 purificados mediante ultracentrifugación en gradiente o mediante cromatografía de intercambio iónico a concentraciones que superan $\sim 10^{13}$ partículas/ml. La inclusión de azúcares (sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa, glicerol) en concentraciones hasta 5% (p/v) o de tensioactivos Tween80® (1%) o Pluronic® F68 (10%) no previenen la agregación de partículas vectoriales.

45 En contraste, las partículas vectoriales permanecen solubles cuando se usan soluciones de fuerza iónica elevada (µ > 200 mM) durante la purificación y para la formulación final del vector. Las soluciones de fuerza iónica elevada que usan concentraciones isotónicas de excipiente para la administración *in vivo* se preparan con sales de iones multivalentes, incluyendo citrato sódico, fosfato sódico y sulfato magnésico. Una formulación isotónica que contiene 10 mM de Tris, 100 mM de citrato sódico, 0,001% de Pluronic® F68, pH 8,0 (µ ~500 mM) permite la concentración de vectores de AAV2-AADC hasta $6,4 \times 10^{13}$ vg/ml sin que se observe agregación durante la preparación y después de diez ciclos de congelación-descongelación a -20°C. Véase la Tabla 3, posteriormente, y el análisis adjunto. Los vectores de AAV2-AADC preparados y almacenados durante un período prolongado en una formulación de fuerza iónica elevada retienen un título de infectividad (13 IU/vg) y una eficacia de transducción altos.

El tratamiento con nucleasa de vectores de AAV2 purificados reduce el grado de agregación del vector, implicando impurezas de ácido nucleico en la superficie del vector en las interacciones entre partículas. De ahí que los métodos de purificación para retirar eficazmente ácidos nucleicos residuales de la superficie del vector, acoplados con el uso de formulaciones isotónicas de fuerza iónica elevada, sean métodos útiles para prevenir la agregación de vectores de AAV2.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos de purificación de AAV

Vectores de AAV2 que expresan factor de coagulación humano IX (FIX) o aminoácido carboxilasa humana (AACD) se producen mediante la transfección triple de células HEK293 según se describe previamente (Matsushita, T. y cols. (1998) *Gene Therapy* 5: 938-945), con modificaciones. Para las preparaciones a gran escala, las células se cultivan y se transfectan en botellas giratorias de 850 mm² (Corning). Los vectores se purifican mediante uno de tres métodos.

En el Método de purificación 1, modificado a partir de Matsushita, células HEK293 transfectadas en botellas giratorias se recogen mediante centrifugación (1000 g, 15 min), se resuspenden en fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 500 mM, pH 7,2, y se someten a lisis mediante tres ciclos de congelación / descongelación (alternando un baño de etanol / hielo seco y un baño de agua a 37°C). El lisado celular se clarifica mediante centrifugación (8.000 g, 15 min). A continuación, el sobrenadante se diluye hasta 200 mM de NaCl mediante la adición de 10 mM de fosfato sódico, pH 7,2, y se digiere con Benzonase® (Merck, Grado de Pureza 1; 200 U/ml, 1 h, 37°C). El lisado se ajusta hasta 25 mM de CaCl₂ usando una solución madre 1 M, y se incuba a 4°C durante una hora.

La mezcla se centrifuga (8.000 g, 15 min) y el sobrenadante que contiene vector se recoge. Para precipitar el virus en el lisado celular clarificado, se añade polietilenglicol (PEG8000) hasta una concentración final de 8%, la mezcla se incuba a 4°C durante tres horas y a continuación se centrifuga (8.000 g, 15 min). Las pellas que contienen vector se resuspenden con mezcladura en 0,15 M de NaCl, 50 mM de Hepes, 25 mM de EDTA, pH 8,0 y se incuban a 4°C durante 16 horas. El material resuspendido se reúne y se añade cloruro de cesio sólido hasta una densidad final de 1,40 g/ml. A continuación, se forman bandas del vector mediante ultracentrifugación (SW28, 27.000 rpm, 24 h, 20°C) usando una centrifuga Beckman modelo LE-80. Los tubos de centrifugación se fraccionan y las densidades de 1,38 a 1,42 g/ml que contienen vector se reúnen. Se forman bandas de este material una segunda vez mediante ultracentrifugación (rotor NVT65, 65.000 rpm, 16 h, 20°C), y las fracciones que contienen vectores de AAV2 purificados se reúnen. Para concentrar el vector y para realizar intercambio de tampón, los vectores en solución concentrada de cloruro de cesio se someten a ultrafiltración / diafiltración (UF/DF) mediante filtración de flujo tangencial según se describe posteriormente (Ejemplo 2).

En el Método de purificación 2, las recolecciones de células que contienen AAV se microfluidizan y se filtran secuencialmente a través de filtros de 0,65 y 0,22 µm (Sartorius). El virus se purifica de los lisados celulares clarificados mediante cromatografía de intercambio iónico usando resina Poros HS50 según se describe previamente. Pat. EE.UU. N° 6.593.123. Para la digestión con nucleasa descrita en la FIG. 2, vectores purificados en columna se incuban (4 h, TA) con 100 U/ml de Benzonase y 10 U/ml de ADNsa I (libre de ARNsa, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana).

Para el Método de purificación 3, vectores AAV2 purificados mediante cromatografía de intercambio catiónico se someten a una etapa adicional de ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (SW28, 27.000 rpm, 20 h) para retirar cápsides vacías antes de UF/DF.

Se usa PCR cuantitativa (Q-PCR) en tiempo real para cuantificar preparaciones de AAV según se describe previamente. Sommer, J. M. y cols. (2003) *Mol. Therapy* 7: 122-128. Los vectores purificados mediante cada uno de los tres métodos se analizan mediante SDS-PAGE / análisis de tinción con plata, y en todos los casos VP1, VP2 y VP3 están presentes en las relaciones esperadas, con las proteínas de la cápside representando >95% de las proteínas totales según se determina mediante densitometría de barrido. Sin embargo, a diferencia de los vectores de AAV2 purificados en gradiente, purificados usando los Métodos 1 y 3, los vectores purificados mediante el Método 2 (cromatografía en columna) contienen cápsides vacías, que varían de 3-10 cápsides vacías por genoma vectorial.

Ejemplo 2

Ultrafiltración y diafiltración para detectar la agregación de AAV

Se usan dispositivos desechables de filtración de flujo tangencial de fibra hueca (Amersham BioSciences 8" Midgee, tamaño de poro nominal 100 kDa) para concentrar y diafiltrar vectores de AAV2 purificados mediante los métodos

descritos anteriormente, y para los experimentos de UF/DF descritos en la Tabla 2. Para todos los procedimientos de UF/DF, se usa un volumen de tampón de diafiltración correspondiente a 10 veces el volumen del producto, y se añade en incrementos de ~1 ml para aproximarse a la diafiltración continua. Usando este método, el CsCl residual calculado después de la diafiltración es < 0,5 mM.

Las tres formulaciones siguientes se usaron para UF/DF: Formulación de control (CF: 140 mM de cloruro sódico, 10 mM de fosfato sódico, 5% de sorbitol, pH 7,3); Formulación de prueba 1 (TF1: 150 mM de fosfato sódico, pH 7,5); y Formulación de prueba 2 (TF2: 100 mM de citrato sódico, 10 mM de Tris, pH 8,0). Para el Experimento 1 mostrado en la Tabla 2, la diafiltración se realiza en un volumen correspondiente a una concentración de vector de 1×10^{13} vg/ml, y después de la diafiltración el volumen se reduce hasta un valor correspondiente a $2,5 \times 10^{13}$ vg/ml (suponiendo que no hay pérdida de vector).

Para el Experimento 2, la diafiltración se realiza a un volumen correspondiente a 2×10^{13} vg/ml, y el volumen se reduce a continuación hasta un valor correspondiente a $6,7 \times 10^{13}$ vg/ml.

Para el Experimento 3 (CF $\pm$ Bz), AAV2-AADC (aproximadamente $1,2 \times 10^{14}$ vg) se diafiltra en primer lugar en TF1 (una formulación compatible con actividad de nucleasa) y a continuación se pasa a través de un filtro de 0,22 μ m. Se determina el título de este material y el volumen se ajusta para corresponder a una concentración de 1×10^{13} vg/ml. Se añade MgCl₂ hasta una concentración de 2 mM a 10 ml de este material, y a continuación se divide en dos partes alícuotas iguales. Una parte alícuota se incuba con Benzonase (200 U/ml, 4 h, TA) y la segunda se incuba simuladamente. A continuación, cada parte alícuota se diafiltra a un volumen correspondiente a una concentración de vector 2×10^{13} vg/ml y a continuación se concentra hasta un objetivo de $3,6 \times 10^{13}$ vg/ml. Siguiendo todos los protocolos de UF/DF, se añade Pluronic® F-68 (BASF Corp., Mount Olive, NJ) a partir de una solución madre al 1% al producto vectorial hasta una concentración final de 0,001% y la solución se hace pasar a través de un filtro de jeringa de 0,22 μ m (Sartorius). Todos los procedimientos de UF/DF se realizan en una cámara de flujo laminar.

Ejemplo 3

Medida de la agregación del vector mediante dispersión dinámica de luz

Los vectores purificados se analizan con respecto a la agregación mediante dispersión dinámica de luz (DLS) usando un *DynaPro* 99 de Protein Solutions ($\lambda=825,4$ nm). Se usan datos primarios (radio de partícula - *Rh*, valor medio a lo largo de 30 ciclos, 10 ciclos/min) para todos los análisis presentados. Se usa un método de "estrés por dilución" para determinar el efecto de diversos excipientes sobre la agregación del vector. En este método, se añaden 80 μ l de diluyente de prueba a 20 μ l de solución de vector con mezclado en la misma cubeta usada para el tratamiento de DLS y la recogida de datos se inicia en los 10 segundos posteriores a la mezclado. Antes de la adición de los diluyentes de prueba, se mide el valor de *Rh* para preparaciones de vector de AAV2 y se confirma que es <15 nm para asegurar que la materia prima es monómera. Las muestras que no son 100% monómeras se hacen pasar a través de un filtro circular de jeringa de 0,22 μ m (Sartorius, baja unión a proteínas) para retirar agregados.

Los valores de osmolaridad y fuerza iónica dados en las FIGS. 1 y 2 se calculan usando todos los excipientes presentes en la mezcla (es decir, ponderados: diluyente de prueba (80%) y formulación de vector de partida (20%)). La osmolaridad se calcula según la ecuación: Osmolaridad = c_i , donde c_i es la concentración molar de cada especie de soluto. La fuerza iónica (μ) se calcula según la ecuación: $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$, donde z_i es la carga de cada especie. En condiciones que daban como resultado la agregación del vector (p. ej. μ baja) se observa un incremento progresivo en *Rh* a lo largo del transcurso de la recogida de datos. Para validar el uso del *Rh* medio medido a lo largo del intervalo de 3 minutos después de la dilución como una medida fiable de la agregación, también se determina la velocidad media de incremento de *Rh* ($\Delta Rh / \Delta t$) a lo largo del mismo intervalo de tiempo (no mostrado). El análisis de $\Delta Rh / \Delta t$ da resultados concordantes con los obtenidos usando el valor medio de *Rh* presentado en las FIGS. 1 y 2.

Ejemplo 4

Infectividad de viriones de AAV

La infectividad de vectores de AAV2-AADC se determina usando un ensayo muy sensible según se describe previamente. Zhen, Z. y cols. (2004) Human Gene Ther. 15: 709-715. Brevemente, las muestras se diluyen en serie (diluciones de 10 veces, 10 réplicas / dilución) y se añaden a células D7/4 (células HeLa modificadas que expresan *rep* y *cap* de AAV) desarrolladas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Falcon, n° cat. 353227) en medio DMEM que contiene 10% de FBS. Se añade adenovirus (Ad-5, 100 vp/célula) a cada pocillo para proporcionar funciones cooperadoras. Después de 48 h, la replicación del vector de AAV en cada pocillo se cuantifica mediante Q-PCR usando cebadores y sondas específicos de un transgén, y la frecuencia de infección en la dilución limitativa se analiza mediante el método de Karber para calcular el título de infectividad. La muestra de prueba se hace marchar simultáneamente con una referencia de AAV2-AADC previamente preparada en CF y almacenada a -80°C.

- La eficacia de transducción de vectores de AAV2 se cuantifica mediante un ELISA de células enteras. Las células D7/4 desarrolladas en placas de 96 pocillos se infectan con diluciones en serie de 10 veces de la muestra de prueba y el vector de referencia, correspondiente a un aporte de 10 a 10^5 vg / célula (5 réplicas / dilución). Después de 48 h, el medio de cultivo se retira y las células se lavan dos veces con 200 µl de PBS (10 mM de fosfato sódico, 140 mM de cloruro sódico, pH 7,2). A continuación, las células se permeabilizaron y se fijaron mediante la adición de 100 µl de PBS que contenía 0,5% de Triton X-100 y 4% de paraformaldehído a cada pocillo (15 min). La solución de fijación se retira y las células se lavan dos veces con PBS que contiene 0,5% de Triton X-100. Los sitios no específicos se bloquean al añadir PBS que contiene 3% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,5% de Triton X-100 (60 min).
- 5
- 10 Después del lavado, las células se incuban durante una hora y con anticuerpo anti-IgG de AADC de conejo (Chemicon, AB136) y se lavan. A continuación, las células se incuban durante una hora con anticuerpo caprino anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina y se lavan. Los anticuerpos se diluyen 1:1000 en PBS que contiene 1% de BSA, 0,5% de Triton X-100. A continuación, se añade sustrato (PNPP, Pierce, nº cat. 34047) (1 mg/ml en 1X tampón de sustrato de dietanolamina, Pierce, nº cat. 34064) y, después de la incubación durante 30 min, la concentración de sustrato escindido se mide espectrofotométricamente ($\lambda=405$ nm). La expresión de AADC humana como una función del aporte de vector se ajusta usando una curva "spline" (SigmaPlot). El vector de referencia de AAV2-AADC se mide simultáneamente con la muestra de prueba.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir la agregación de viriones de AAV2 (virus adenoasociado tipo 2) en una preparación de dichos viriones, que comprende añadir uno o más excipientes a viriones de AAV2 para producir una preparación isotónica de viriones con una fuerza iónica de al menos 250 mM, en donde la concentración de viriones de AAV2 dentro de la preparación supera 1×10^{13} vg/ml, y en donde uno o más de los excipientes comprende un ion multivalente.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además tratar dichos viriones con una nucleasa.
3. El método según la reivindicación 1, en el que el ion multivalente es citrato.
4. El método según la reivindicación 1, en el que la osmolaridad de la preparación de viriones después de la adición de uno o más excipientes no es mayor de 280 mOsm.
5. El método según la reivindicación 1, que comprende además almacenar la preparación de viriones.
6. Una composición isotónica que comprende:

partículas virales de AAV2 purificadas;

un tampón de pH; y

uno o más excipientes que comprenden uno o más iones multivalentes; en donde la fuerza iónica de la composición es al menos 250 mM y la concentración de partículas virales de AAV2 en la composición supera 1×10^{13} vg/ml.
7. La composición según la reivindicación 6, en la que uno de los uno o más iones multivalentes es citrato.
8. La composición según la reivindicación 6, en la que el tampón de pH es Tris 10 mM, pH 8,0 y los excipientes comprenden 100 mM de citrato sódico.
9. La composición según la reivindicación 6, en la que el radio de partícula medio (Rh) de las partículas virales purificadas es menor de 20 nm según se mide mediante dispersión dinámica de luz.
10. La composición según la reivindicación 6, en la que la recuperación de las partículas virales purificadas es al menos 90% después de la filtración de la composición de viriones a través de un filtro de 0,22 μ m.
11. Una composición isotónica que comprende viriones de AAV2 y uno o más excipientes, en donde la fuerza iónica de la composición es al menos 250 mM y la concentración de viriones de AAV2 dentro de la composición supera 1×10^{13} vg/ml, para el uso en un método de tratamiento médico, en donde uno o más de los excipientes comprende un ion multivalente.
12. Uso de uno o más excipientes para prevenir la agregación de viriones de AAV2 en una preparación isotónica de dichos viriones, en donde la fuerza iónica de la preparación es al menos 250 mM y la concentración de viriones de AAV2 dentro de la preparación supera 1×10^{13} vg/ml después de la adición del uno o más excipientes, y en donde uno o más de los excipientes comprende un ion multivalente.

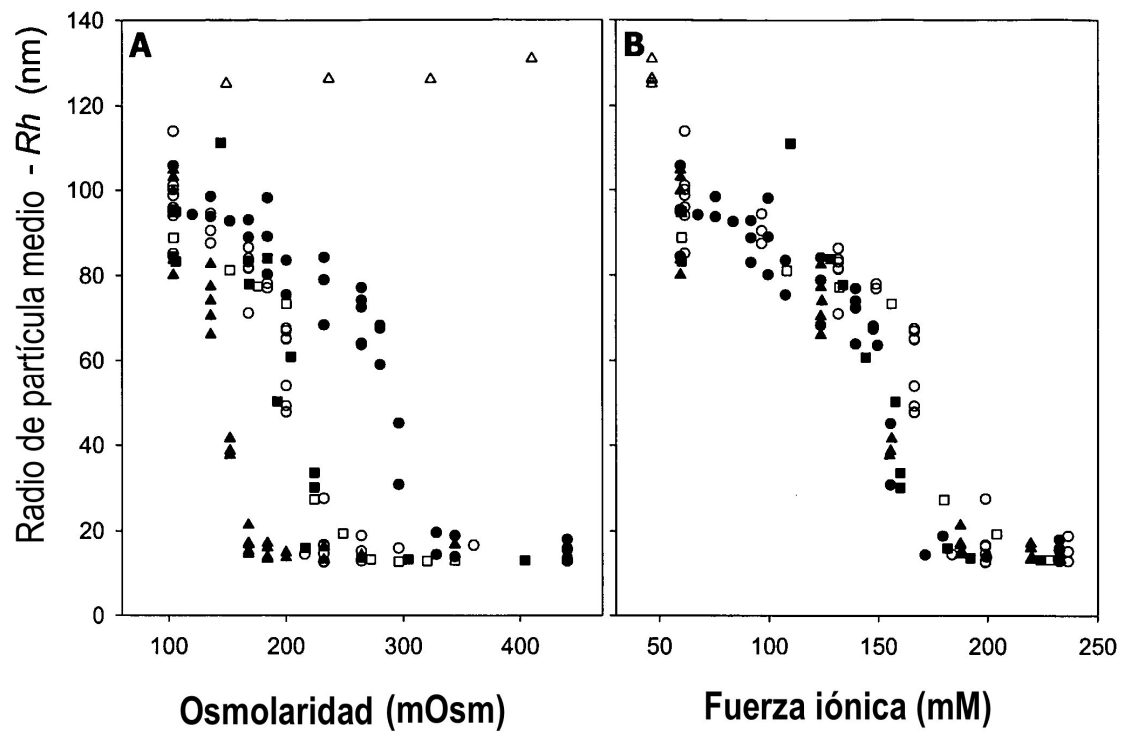


FIGURA 1

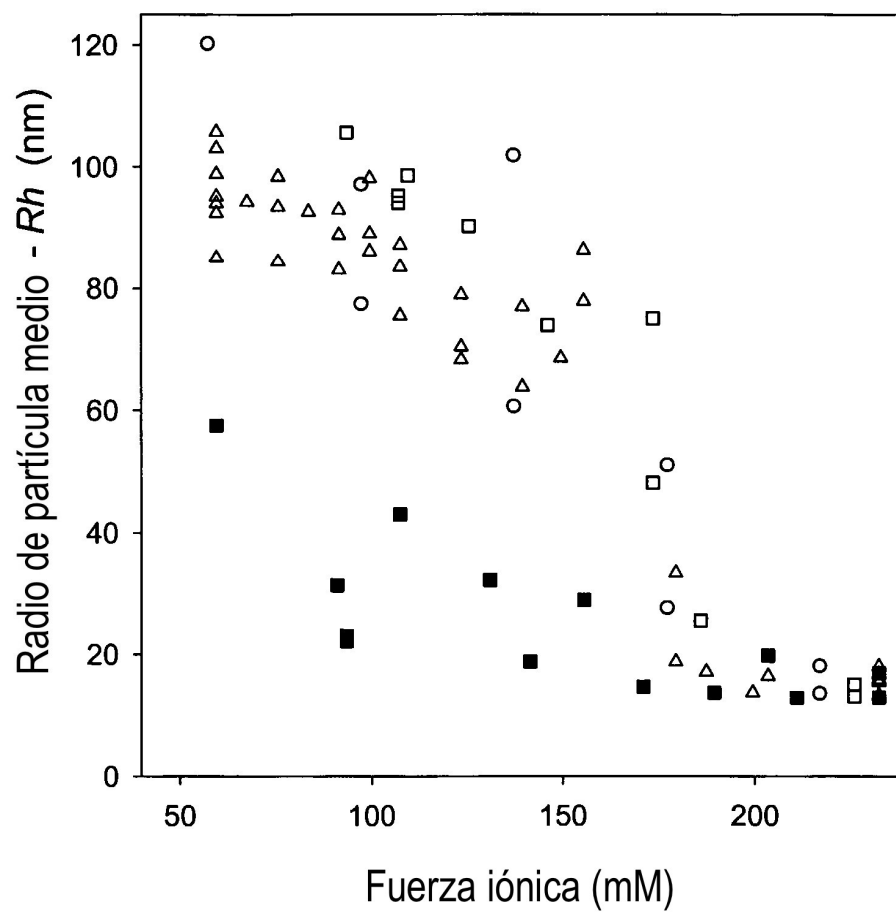


FIGURA 2

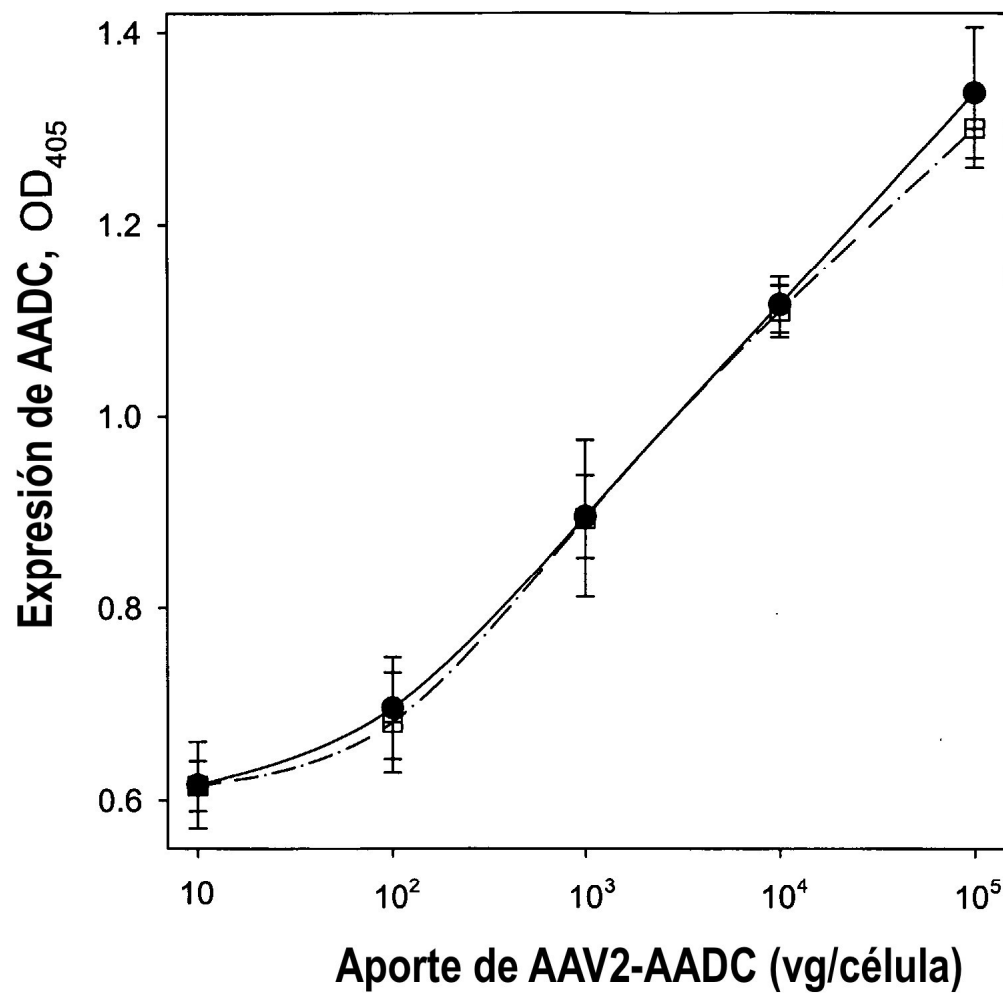


FIGURA 3