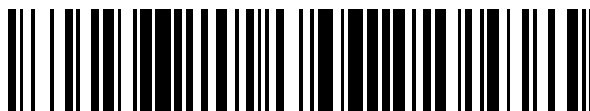


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 815**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2012 PCT/EP2012/073645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13076309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2012 E 12795778 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2782997**

54 Título: **Sistema de producción de un vector lentiviral escalable compatible con aplicaciones farmacéuticas industriales**

30 Prioridad:

24.11.2011 EP 11306551
24.11.2011 US 201161563566 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2018

73 Titular/es:

GENETHON (100.0%)
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry, FR

72 Inventor/es:

MARCEAU, NICOLAS y
GASMI, MEHDI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 663 815 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

Sistema de producción de un vector lentiviral escalable compatible con aplicaciones farmacéuticas industriales

La presente invención versa sobre la industrialización de la producción de vectores lentivirales recombinantes para fabricar suficientes materiales para aplicaciones terapéuticas tales como la terapia génica y/o la vacunación de ADN, para ser usada en ensayos clínicos y/o en un uso comercial.

Antecedentes de la invención

Los avances en el uso de vectores virales recombinantes para aplicaciones de terapia génica y de vacunación de ADN han creado la necesidad de una fabricación a gran escala de vectores virales de calidad clínica para la transferencia de materiales genéticos. Una familia tal de vectores virales es el género de los lentivirus dentro de la familia vírica de los retrovirus.

Los vectores lentivirales usados en aplicaciones de terapia génica son fabricados convencionalmente por transfección con fosfato cálcico de células adherentes que requieren suero fetal bovino en los caldos de cultivo, con un sistema de ADN para constructos lentivirales (Merten et al., 2011, Hum Gene Ther. 22(3):343-56). La presencia de este componente de origen animal en el cultivo constituye un riesgo de seguridad que limita la adecuación del método a NCF. Además, este método de producción está seriamente limitado en términos de escalado al alza y no está adaptado a la producción de grandes cantidades de partículas vectoriales requeridas para aplicaciones terapéuticas, comerciales y/o industriales de terapia génica. Por ejemplo, el método convencional actual permite la generación, en una tanda, y antes de la purificación, de 24 a 48 L de una suspensión de vectores lentivirales a una valoración de aproximadamente 1×10^7 a 3×10^7 partículas vectoriales funcionales por mL que, con un rendimiento estándar de purificación del 20%, generaría en el mejor de los casos 3×10^{11} partículas en el producto final. En cambio, un ensayo clínico de fase I requeriría al menos 5×10^{11} partículas vectoriales lentivirales funcionales (McGregor et al., 2001, Hum Gene Ther., 12:2028-2029). Por lo tanto, existe hoy una gran necesidad de procedimientos industriales de biofabricación de vectores lentivirales que satisfagan la necesidad de cantidades suficientes de vectores terapéuticos cuando se requiera una gran cantidad de vector por paciente o cuando deban tratarse muchos pacientes o, más en general, para mantener los costes a niveles razonables y mantener la adecuación a normas de correcta fabricación (NCF).

Una vía potencial de mejora es el uso de cultivos celulares en suspensión desarrollados en caldos químicamente acondicionados en ausencia de suero fetal bovino (SFB) para superar el riesgo de seguridad ligado al uso de SFB, pero también la necesidad de recipientes de cultivo celular, que son los principales culpables de la falta de escalabilidad del procedimiento convencional. Por ejemplo, recientemente se ha descrito la producción de vectores virales por transfección transitoria en cultivos en suspensión en ausencia de suero. En particular, Ansorge et al. han propuesto un procedimiento para la producción de lentivirus por transfección transitoria de células HEK293SF-3F6 desarrolladas en suspensión en cultivos por perfusión (Ansorge et al., 2009, J Gene Med, 11: 868-876). Sin embargo, el método propuesto es, a la vez, complicado y limitado en escala. De hecho, el método de Ansorge et al. se lleva a cabo en cultivos por perfusión que necesitan varias etapas de recogida y complicadas medidas de control. Además, la producción propuesta en ese estudio está limitada a volumen de 3 litros. Segura et al. también han propuesto un procedimiento para la producción de vectores lentivirales por transfección transitoria de cultivos en suspensión (Segura et al., 2007, Biotechnology and Bioengineering, 98 (4): 789-799). No obstante, el método propuesto es complicado, porque requiere varias etapas de recogida con una sustitución total de caldos en los días 3, 4 y 5 posteriores a la transfección y complejas medidas de control. Además, la producción de vectores virales está limitada a un volumen de 3 litros y a la producción únicamente de proteínas recombinantes, pero está documentado que la producción de vectores no virales ha tenido un escalado al alza hasta la escala de 60 L. En consecuencia, a pesar de estos informes, sigue existiendo la necesidad de un desarrollo de un procedimiento industrial sencillo para la producción de vectores lentivirales a partir de un cultivo celular en suspensión que aborde problemas tanto cuantitativos como cualitativos que se imponen a una vacuna de tipo lentiviral a escala comercial y/o a un producto de terapia génica. La presente invención aborda y cubre estas necesidades dando a conocer un procedimiento optimizado de cultivo celular y producción de lentivirus, que da como resultado una mayor productividad viral.

Compendio de la invención

La presente invención versa sobre un método para la producción a escala industrial de vectores lentivirales recombinantes de calidad farmacéutica. Los resultados posteriormente presentados demuestran que los inventores han podido proporcionar un método que, en términos de productividad y calidad, es tan bueno o mejor que los métodos existentes de producción según NCF usando células adherentes, pero que tiene un potencial de producción escalable mucho mayor.

Así, la presente divulgación proporciona un método para la producción de un vector lentiviral recombinante, de lentivirus y pseudovirus, que comprende:

- el cultivo, en suspensión en un caldo libre de suero, de células de mamífero transfectadas con al menos un plásmido adaptado para la producción de un vector lentiviral, llevándose a cabo el cultivo en un volumen de al menos 5 L;
- la recogida del vector recombinante producido del caldo de cultivo.

5 En la presente invención, las células de mamífero son células embrionarias de riñón humano 293T (también denominadas células HEK293T o células 293T) capaces de desarrollarse en suspensión en condiciones libres de suero. Los inventores han demostrado que estas células son particularmente aptas para la industrialización de la producción de grandes cantidades de un vector lentiviral recombinante que satisface los requisitos tanto
10 cuantitativos como cualitativos para ser usados en la terapia, en particular en ensayos clínicos de terapia génica y aplicaciones comerciales.

En una realización particular, los vectores lentivirales son recogidos entre 36 horas y 72 horas después de la transfección, preferentemente después de 48 horas. En la presente invención, el cultivo se implementa a una escala de al menos 50 L, preferentemente de al menos 100 L y puede estar particularmente adaptado a una producción industrial de vectores lentivirales que permita la recogida de al menos 10^7 genomas infecciosos GI/mL. El método de
15 la invención es el primero en permitir la producción industrial de lentivirus, y se lograrán niveles muy elevados de vectores virales, según se muestra, por la linealidad del escalado al alza de 100 mL a 50 L presentada en la parte experimental. Por lo tanto, se lograrán niveles muy elevados de vectores virales implementando este método (por ejemplo, a una escala de 1000 L). En otra realización preferente, la etapa de recogida consiste en la recogida de un único lentivirus. Hasta donde saben los inventores, este es el primer informe de la producción de vectores lentivirales
20 a una escala tan alta implementando una sola recogida. Esta realización tiene la ventaja de proporcionar un método sencillo que requiere tan pocas etapas como sea posible y que permite el control de costes.

Además, la presente invención también versa sobre el anterior método en el que la transfección de las células es una transfección transitoria y la etapa de recogida consiste en una sola recogida implementada entre 48 y 72 horas después de la transfección.

25 La invención da a conocer, además, optimizaciones en el procedimiento de transfección antes del cultivo de las células para la producción de lentivirus. En una realización particular, las células son transfectadas con una mezcla de polietilénimina (PEI) y plásmidos. En una realización específica, el anterior método comprende una etapa de transfección en la que las células son transfectadas con tal mezcla de PEI y plásmidos. En una variante particular, la transfección se lleva a cabo con una cantidad total de ADN de plásmidos de al menos $1,5 \mu\text{g}/10^6$ células. En otra
30 variante específica, la PEI es una PEI lineal de 20 - 25 kD. En una variante específica adicional, una optimización proporcionada con la presente invención también está relacionada con las cantidades relativas de cada componente de la mezcla. En particular, en una variante específica de la invención la PEI y los plásmidos son mezclados antes de la transfección según una proporción N/P de menos de 10, refiriéndose N/P al número de átomos de nitrógeno en la PEI por fosfato de oligonucleótido. En una variante preferente, la proporción N/P es aproximadamente 6. En una
35 variante específica adicional, también se ha explorado el tiempo de contacto entre la PEI y los plásmidos antes de la adición al cultivo celular, e, idealmente, puede estar comprendido entre 5 y 30 minutos, siendo el tiempo de contacto en particular de aproximadamente 10 minutos.

El método para la producción de la invención puede ser optimizado ventajosamente añadiendo butirato sódico al cultivo celular 24 horas después de la transfección, sin cambiar el caldo. Preferentemente, se añade butirato sódico
40 al cultivo a una concentración final comprendida entre 2 mM y 12 mM, en particular entre 2 mM y 10 mM o entre 5 mM y 12 mM (por ejemplo, aproximadamente 5, 8 o 12 mM), más particularmente a una concentración final de 5 mM.

En una realización adicional del método de la invención, los plásmidos transfectados en las células comprenden cuatro plásmidos, que incluyen un plásmido que codifica las proteínas de envoltura (plásmido Env), que puede derivarse del lentivirus en cuestión, pero que también puede derivarse de otros virus encapsulados; un plásmido que
45 codifica proteínas lentivirales Gag y Pol (plásmido Gag-Pol); un plásmido que codifica una proteína lentiviral Rev (plásmido Rev); y un plásmido que comprende un casete de expresión de transgenes de interés (TOI) entre una 3'-LTR lentiviral y una 5'LTR lentiviral (plásmido TOI).

En un aspecto adicional, la invención proporciona un dispositivo (o biorreactor) de cultivo celular, conteniendo dicho dispositivo de cultivo un volumen de al menos 50 L de un medio de cultivo libre de suero que comprende células HEK293T transfectadas con al menos un plásmido adaptado para la producción de un vector lentiviral,
50 desarrollándose dichas células en suspensión en dicho dispositivo de cultivo.

En otro aspecto, la invención versa sobre un método de optimización de la producción de un vector lentiviral por parte de células HEK293T desarrolladas en suspensión en un caldo libre de suero, transfectadas con plásmidos requeridos para dicha producción, que comprende la adición de butirato sódico 24 horas después de la transfección
55 al cultivo sin cambiar el caldo del cultivo. Preferentemente, se añade butirato sódico a una concentración final de 5 mM.

Descripción detallada de la invención

La presente invención versa sobre un método para la producción a escala industrial de vectores lentivirales recombinantes de calidad farmacéutica. Los vectores producidos pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones en un sujeto animal, en particular un mamífero, más en particular en un sujeto humano necesitado del mismo.

5 Plásmidos para la producción de lentivirus

Los lentivirus son retrovirus exógenos de mamíferos y forman un género de los retrovirus. Los vectores lentivirales (VL) se derivan de varios lentivirus de primate, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-1 o 2, o diversos virus de inmunodeficiencia en simios (VIS), o de lentivirus de no primate, tales como el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), el virus de inmunodeficiencia felina (VIF) o el virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC).

10 En la técnica son conocidos los componentes lentivirales útiles para la producción de un vector lentiviral recombinante. Véanse, por ejemplo, Zufferey et al., 1997, Nat. Biotechnol. 15:871-875 y Dull et al., 1998, J. Virol. 72(11):8463-8471. Un sistema de vectores lentivirales de “segunda generación” se refiere a un sistema de empaquetado que carece de genes accesorios funcionales, tales como uno del que han sido borrados o inactivados los genes accesorios vif, vpr, vpu y nef (Zufferey et al., citado *supra*). Un sistema de vectores lentivirales de “tercera generación” se refiere a un sistema de empaquetado lentiviral que tiene las características de un sistema vectorial de segunda generación y que carece además de un gen tat funcional, tal como uno del que ha sido borrado o inactivado el gen tat. Normalmente, se proporciona el gen que codifica la proteína Rev en un constructo de expresión separado (véase, por ejemplo, Dull et al., citado *supra*). Para una reseña más reciente de sistemas de vectores lentivirales que pueden ser usados para la producción de un vector lentiviral recombinante, véase también Schweizer y Merten, 2010, Current Gene Therapy 10(6), 474-486, en particular, sobre todo, la parte 2.2 (“Lentiviral vector systems”). Schweizer y Merten documentan procedimientos no industrializables.

Las diferentes funciones necesarias para la producción de un vector lentiviral pueden ser proporcionadas a las células mediante un número cualquiera de plásmidos. En particular, estas funciones pueden ser proporcionadas por al menos uno, dos, tres o cuatro plásmidos. En una realización particular de la invención, las diferentes funciones necesarias para la producción de un vector lentiviral son proporcionadas a las células 293T (desarrollándose en suspensión en condiciones libres de suero) mediante la transfección, en particular la transfección transitoria, de cuatro plásmidos adaptados para producir vectores lentivirales, codificando un plásmido las proteínas de envoltura (plásmido Env), codificando un plásmido las proteínas lentivirales Gag y Pol (plásmido Gag-Pol), codificando un plásmido una proteína lentiviral Rev (plásmido Rev) y comprendiendo un plásmido un casete de expresión de transgenes de interés (TOI) entre una 3'-LTR lentiviral y una 5'LTR lentiviral (plásmido TOI).

Cada función (o componente) puede derivarse de cualquier lentivirus adecuado. Sin embargo, en una realización preferente, las proteínas *gag-pal*, *rev* y el genoma lentiviral (3'-LTR y una 5'LTR) se derivan de un virus VIH, en particular de un VIH-1 o un VIH-2.

Además, el vector lentiviral recombinante puede ser un vector pseudotipado, que comprende una proteína de envoltura modificada, una proteína de envoltura derivada de un virus diferente o una proteína de envoltura quimérica. En consecuencia, el plásmido Env puede codificar, por ejemplo, una proteína Env del VSV-G, aunque los expertos en la técnica apreciarán que se pueden emplear otros genes env.

Por supuesto, el TOI usado en el o los plásmidos dependerá del uso específico previsto para el vector lentiviral. Ejemplos ilustrativos no limitantes de TOI incluyen un TOI que codifica un ARN terapéutico (por ejemplo, un TOI que codifica un ARN no codificante complementario de una secuencia diana de ARN o ADN), un TOI de terapia génica que codifica una proteína defectuosa o ausente en un sujeto enfermo, y un TOI de vacuna usado para la vacunación de ADN: es decir, que codifica una proteína cuya expresión inducirá la vacunación del organismo receptor contra dicha proteína.

Células de mamífero en suspensión

45 En la técnica son conocidas las células de mamífero para la producción de lentivirus. Ejemplos representativos de tales células incluyen células embrionarias de riñón humano (HEK) 293 y derivados de las mismas (por ejemplo, la línea 293SF-3F6) seleccionados por su capacidad de desarrollarse en suspensión en condiciones libres de suero y que son idealmente muy transfectables. Otros tipos de células incluyen, sin limitación, células HeLa, células A549, células KB, células CKT1, células NIH/sT3, células Vero, células de ovario de hámster chino (CHO) o cualquier célula eucariota que soporte el ciclo vital del lentivirus.

En la presente invención, las células son células 293T, que son muy conocidas en la técnica. Las células 293T están comercialmente disponibles en varios proveedores. Estas células corresponden a una línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano transformadas con antígeno T SV40 grande que requieren suero fetal bovino para su desarrollo. Específicamente, la línea celular HEK 293 se derivó en su origen de células embrionarias de riñón humano transfectadas con fragmentos de adenovirus humano de tipo 5 (Ad5) cortados mecánicamente mediante la selección de células que mostraban muchas de las características de la transformación Ad. La región

transformante del adenovirus humano contiene una región temprana 1 (E1), consistente en dos unidades de transcripción, E1a y E1b, productos que son necesarios y suficientes para la transformación de células de mamífero mediante los Ad. Estas células 293 son un subclón de las células 293 originales de Frank Graham que fueron seleccionadas para una mayor producción de virus (probablemente adenovirus) y un mejor desarrollo celular (Graham et al, 1977, J Gen Virol, 36, 59-74). La línea celular 293T fue creada a partir de células HEK 293 en el laboratorio de Michele Calos (Universidad de Stanford) por transfección con un gen que codificaba el antígeno T SV-40 y un gen de resistencia a la neomicina.

Anteriormente se han usado células 293T adherentes para producir vectores lentivirales. Sin embargo, los presentes inventores son los primeros en proponer un método eficaz para producir vectores lentivirales a partir de estas células adaptadas a condiciones de cultivo en suspensión en ausencia de suero para dar cabida a la producción a escala industrial de vectores lentivirales. De hecho, en los ejemplos de esta solicitud, los inventores presentan por vez primera un método para producir vectores lentivirales cuyo escalado al alza es lineal de 100 mL a 50 L. Por lo tanto, implementando este método serán obtenibles niveles muy elevados de vectores virales (por ejemplo, a una escala de 1000 L).

Las células son cultivadas en un caldo libre de suero seleccionado con respecto a la célula específica usada y que permite la producción del vector lentiviral. El caldo libre de suero permite la producción de un vector lentiviral adecuado para aplicaciones terapéuticas. Para una reseña sobre caldos libres de suero, véase el capítulo 9 ("Serum-free media") de Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique; Ed. Freshen, Rhode Island, 2000, Wiley-Lisps, pp. 89-104 y 105-120. En general, los caldos libres de suero estarán manipulados para potenciar el desarrollo de la respectiva línea celular en el cultivo con un potencial de inclusión de cualesquiera de los siguientes: una selección de proteínas celulares, nutrientes difusibles, aminoácidos, sales orgánicas y/o inorgánicas, vitaminas, metales traza, azúcares y lípidos segregados, así como quizá otros compuestos, tales como sustancias promotoras del crecimiento (por ejemplo, citoquinas). También es deseable que tales caldos estén complementados con glutamina o una alternativa a la glutamina, tal como GlutaMAX™, según se da a conocer en la presente memoria. Tales caldos están disponibles comercialmente y, con el conocimiento añadido de la presente invención, la persona experta en la técnica podrá seleccionar los apropiados con respecto a las células de mamífero anfitrionas. El caldo puede ser complementado con aditivos tales como un tensioactivo no iónico, tal como Pluronic® F68 (Invitrogen, nº de catálogo 24040-032), usado para controlar las fuerzas de cizalladura en cultivos en suspensión, un antiaglutinante (por ejemplo, de Invitrogen, nº de catálogo 0010057AE) y L-glutamina o una alternativa de la L-glutamina, tal como un dipéptido de L-alanil-L-glutamina; por ejemplo, GlutaMAX™ (Invitrogen, nº de catálogo 35050-038). Los caldos y los aditivos usados en la presente invención se adecuan, ventajosamente, a las NCF. Por ejemplo, caldos libres de suero comercialmente disponibles representativos que pueden ser usados para el desarrollo de células 293T en suspensión incluyen caldo F17® (Invitrogen) y el Ex-Cell 293® (SAFC). En particular, las células 293T pueden desarrollarse en caldo F17® adaptado complementado con aditivos que eviten la formación de agregados celulares. En particular, en la presente memoria se muestra que el método de la presente invención mejora cuando el caldo F17® es complementado con Pluronic® F68 entre 0,05% y 0,1%, y, más en particular, a 0,08%, antiaglomerante GIBCO® entre 0,01% y 0,1%, y, más en particular, a 0,01%, y GlutaMAX™ entre 2 y 6 mM y, más en particular, a una concentración final de 4 mM. Estos aditivos usados en las cantidades proporcionadas en la presente memoria son ventajosos, porque permiten evitar óptimamente los agregados de células 293T.

Ventajosamente, los caldos y los aditivos usados en la presente invención, al estar libres de suero y estar libres de componentes animales, respetan las NCF y, así, permiten la producción industrial de vectores lentivirales para ser usados en la terapia de animales, en particular de seres humanos.

En una realización particular, las células pueden ser usadas a una densidad celular comprendida entre 0,8 y $1,3 \times 10^6$ células/mL.

45 Transfección transitoria

En el método de la presente invención las células 293T anteriormente descritas son transfectadas con uno o más plásmidos adaptados para la producción de un vector lentiviral. Preferentemente, la transfección es una transfección transitoria.

Para introducir moléculas de ácidos nucleicos en las células pueden emplearse diversas técnicas conocidas en la técnica. Tales técnicas incluyen una transfección facilitada químicamente usando compuestos tales como fosfato cálcico, lípidos catiónicos, polímeros catiónicos, una transfección arbitrada por liposomas, métodos no químicos tales como la electroporación, el bombardeo con partículas, o la microinyección, e infección con un virus que contiene la molécula de ácido nucleico de interés (denominada a veces "transducción").

Sin embargo, según una realización preferente de la invención, la transfección transitoria se lleva a cabo usando polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección. La PEI tiene una elevada actividad de transferencia de genes en muchas líneas celulares, a la vez que manifiesta baja citotoxicidad, es rentable y, por lo tanto, es compatible con aplicaciones de producción a escala industrial. Este polímero está disponible como isómeros tanto lineales como ramificados con un amplio intervalo de pesos moleculares y polidispersidades, parámetros físico-químicos que son cruciales para una actividad eficaz para la transferencia de genes (Godbey W. T. et al., J. Control Release,

60,149160 (1999). En una realización particular, la PEI usada en la presente invención es una PEI lineal de 20 - 25 kD. Por ejemplo, en una realización particular, la PEI usada en la presente invención es JetPEI® o PEIPro® (disponibles ambas en PolyPlus). Los reactivos de transfección JetPEI® y PEIPro® son derivados de polietilimina lineal, están libres de componentes de origen animal, que proporcionan una administración muy eficaz y reproducible de genes. En la patente estadounidense nº 6.013.240 y la patente EP nº 0770140 se dan a conocer otras PEI o polímeros catiónicos similares en estructuras a la misma para la transfección de células.

Los plásmidos y la PEI son mezclados antes de su adición al caldo de cultivo.

La proporción N/P es una medida del equilibrio iónico de los complejos. En el caso de la implementación con JetPEI® o PEIPro®, se refiere al número de residuos de nitrógeno de JetPEI® por fosfato de oligonucleótido. Preferentemente, la proporción N/P está por debajo de 10. En una realización específica, esta proporción es de aproximadamente 6. Optimizar esta proporción permite un rendimiento óptimo de un vector lentiviral producido por las células transfectadas asociado con una toxicidad limitada.

El tiempo durante el cual los plásmidos y la PEI están en contacto antes de la etapa de transfección propiamente dicha también es un parámetro importante, para combinar debidamente el ADN plasmídico y las moléculas de la PEI. Los presentes inventores han sido capaces de demostrar que la puesta en contacto de los plásmidos con la PEI durante de 5 a 30 minutos da como resultado en una mezcla que tiene una capacidad de transfección muy buena. Preferentemente, el tiempo de contacto será de aproximadamente 10 minutos para optimizar la formación del complejo de transfección.

La proporción molar entre los diferentes plásmidos usados para la producción de un lentivirus también puede ser adaptada para optimizar el escalado al alza de esta producción. Gracias a los resultados proporcionados en la presente memoria, la persona experta en la técnica es capaz de adaptar este parámetro a los plásmidos específicos que use para producir el lentivirus de interés. Por ejemplo, los presentes inventores demuestran aquí que una proporción de 1:1:2:1 (plásmido Env:plásmido Gag-Pol:plásmido Rev:plásmido TOI) lleva a una transfección más robusta y que satisface la producción de lentivirus con respecto a los lentivirus mostrados en los ejemplos. Por supuesto, la persona experta en la técnica es capaz de adaptar esta proporción a los lentivirus específicos cuya producción se busca. La proporción puede ser fácilmente adaptada para cada nueva situación (por ejemplo, con respecto a cada vector plasmídico específico usado para la transfección) con base en la enseñanza de la presente invención (véanse los ejemplos posteriores) y el conocimiento general común en la técnica de la producción de lentivirus recombinantes. En particular, la proporción molar de los plásmidos será tenida en cuenta para optimizar la cantidad de cada uno de estos plásmidos. Esta noción de usar proporciones molares más que proporciones de pesos no es obvia, porque, en la técnica de la presente invención se usan generalmente proporciones de pesos para determinar la cantidad de cada plásmido requerido para la producción de un vector viral.

La persona experta en la técnica puede adaptar el método de transfección al cultivo celular particular implementado. En particular, la cantidad de ADN total (que comprende en particular los cuatro plásmidos requeridos para la producción de un lentivirus recombinante) puede variar. Sin embargo, en una realización específica de la invención, esta cantidad será de al menos 1,5 µg/10⁶ células. En una realización particular, la cantidad es de al menos 2 µg/10⁶ células, en particular de al menos 2,5 µg/10⁶ células. En una realización preferente, la cantidad de ADN total es de aproximadamente 2 µg/10⁶ células.

Cultivo celular

Después de la transfección —por ejemplo, después de añadir la mezcla de ADN y PEI al cultivo celular—, se permite que este cultivo celular se desarrolle durante un tiempo que puede estar comprendido entre 36 y 72 horas después de la transfección, en particular después de 48 horas.

En una realización particular, el caldo usado para cultivar las células es el mismo que el medio usado para transfectar dichas células. Por ejemplo, en el caso de una transfección con una mezcla de PEI y uno o más plásmidos, la mezcla puede ser realizada en caldo F17® y las células también pueden desarrollarse en dicho caldo F17® después de la transfección.

El cultivo se puede llevar a cabo en varios dispositivos de cultivo, tales como biorreactores adaptados al cultivo de células en suspensión. El biorreactor puede ser un biorreactor de un solo uso (desechable) o uno reutilizable. El biorreactor puede seleccionarse, por ejemplo, entre recipientes o bolsas de cultivo y reactores de tanque. Biorreactores representativos no limitantes incluyen un biorreactor de vidrio, un biorreactor de un solo uso que utiliza una agitación de movimiento de vaivén, tal como un biorreactor de olas, un biorreactor de tanque de agitación de un solo uso (Cultibag STR® 50L, Sartorius), o un biorreactor de tanque de acero inoxidable. El desarrollo se realiza en una condición controlada (por ejemplo, pH=7,2, pO₂=50%, 37°C y una agitación específica según el sistema, para el cultivo de las células 293T documentado en los ejemplos presentados en la presente memoria).

Según un aspecto particular, la invención versa también, por ello, sobre un dispositivo de cultivo celular (es decir, un biorreactor) que contiene un volumen de al menos 50 L de un medio de cultivo libre de suero que comprende células HEK293T transfectadas con al menos un plásmido adaptado para la producción de un vector lentiviral, estando

adaptadas dichas células para desarrollarse en suspensión en dicho dispositivo de cultivo. En una realización particular, el dispositivo de cultivo contiene un volumen de al menos 100 L, al menos 200 L o al menos 1000 L de un medio de cultivo libre de suero, según se ha definido anteriormente. En otras realizaciones, el caldo libre de suero, las condiciones de transfección, las condiciones de cultivo y las células son según se ha definido anteriormente.

- 5 A continuación, el lentivirus puede ser cosechado (o recogido), con una o más etapas de recogida. En una realización preferente, se realiza una sola recogida de los lentivirus presentes en el cultivo celular. Este es un avance significativo de la invención con respecto a la técnica anterior, en la que los informes disponibles generalmente recomiendan varias recogidas del cultivo con numerosos cambios del caldo. Aquí, la realización preferente comprende una sola recogida, sin cambiar el caldo de cultivo desde la siembra en el biorreactor hasta la
10 cosecha, es un método sencillo, rentable e industrialmente compatible. En una realización particular adicional, se lleva a cabo una sola recogida 48 horas después de la transfección. Las partículas de lentivirus así producidas pueden así ser recogidas y purificadas según métodos también muy conocidos para el experto en la técnica.

- Según se ha mencionado anteriormente, pueden añadirse al caldo de cultivo de 2 mM a 10 mM de butirato sódico, que es un inductor conocido de la producción de lentivirus en sistemas de células adherentes en presencia de suero.
15 Inesperadamente en vista de las condiciones implementadas en la presente memoria (caldo libre de suero y cultivo en suspensión), los presentes inventores han demostrado que se puede obtener una producción optimizada en un cultivo en suspensión en ausencia de suero cuando se añade butirato sódico al caldo de cultivo 24 horas después de la transfección, y especialmente cuando es usado a una concentración de 5 mM.

Objetos adicionales

- 20 La invención también versa sobre un método para la producción a gran escala de un vector lentiviral recombinante que comprende:

- transfectar transitoriamente células HEK293T capaces de desarrollarse en suspensión con una mezcla de PEI y plásmidos adecuadas para la producción de un vector lentiviral recombinante;
- cultivar las células transfectadas en un caldo libre de suero en un cultivo por lotes en un volumen de al menos
25 50 L; y
- la recogida del vector recombinante producido del caldo de cultivo.

- En una realización particular de este método, los plásmidos incluyen un plásmido que codifica las proteínas de envoltura (plásmido Env), un plásmido que codifica proteínas lentivirales Gag y Pol (plásmido Gag-Pol), un plásmido que codifica una proteína lentiviral Rev (plásmido Rev) y un plásmido que comprende un casete de expresión de transgenes de interés (TOI) entre una 3'-LTR lentiviral y una 5'LTR lentiviral. En una variante específica, la transfección se lleva a cabo con una cantidad total de ADN de al menos $1,5 \mu\text{g}/10^6$ células. Además, en una realización particular, las células son transfectadas con una mezcla de polietilenimina (PEI) y ADN, siendo la PEI una PEI lineal de 20 - 25 kD. En una variante específica, la PEI y los plásmidos son mezclados antes de la transfección según una proporción N/P de menos de 10 (por ejemplo, una proporción de aproximadamente 6), refiriéndose N/P al número de átomos de nitrógeno en la PEI por fosfato de oligonucleótido. El tiempo de contacto entre la PEI y los plásmidos antes de la adición al cultivo celular puede adaptarse, pero está comprendido, en particular, entre 5 y 30 minutos; por ejemplo, durante aproximadamente 10 minutos. Puede añadirse butirato sódico al cultivo celular, por ejemplo, 24 horas después de la transfección sin cambiar el caldo. La concentración final de butirato sódico en el cultivo puede estar comprendida entre 2 mM y 10 mM. La recogida de las células puede llevarse a cabo como una recogida única, en particular una recogida única entre 48 horas y 72 horas después de la transfección. El método de la invención puede llevarse a cabo a una escala de al menos 100 L, o más. Este método puede estar relacionado, en particular, con un método para la producción a gran escala de vectores lentivirales que permita la recogida de al menos 10^7 genomas infecciosos/mL, preferentemente al menos 3×10^7 GI/mL.

La invención es ilustrada adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

45 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** es una representación gráfica de los cuatro plásmidos usados en el estudio presentado en los ejemplos.

La **Figura 2** es un gráfico que representa el ensayo de diferentes condiciones de transfección en un matraz centrifugador de 100 mL con células HEK293F y la medición de células positivas a la GFP (proteína verde fluorescente) por citometría de flujo.

- 50 La **Figura 3** es un gráfico que representa el ensayo de diferentes condiciones de transfección en un matraz centrifugador de 100 mL con células HEK293F y la medición de la cantidad de antígeno p24 de la cápside del VIH por ensayo ELISA de p24.

La **Figura 4** es un gráfico que representa el ensayo de diferentes condiciones de transfección en un matraz centrifugador de 100 mL con HEK293T y la medición de células positivas a la GFP por citometría de flujo.

La **Figura 5** es un gráfico que representa el ensayo de diferentes condiciones de transfección en un matraz centrifugador de 100 mL con células HEK293T y la medición de la cantidad de antígeno p24 de la cápside del VIH por ensayo ELISA de p24.

5 La **Figura 6** es un gráfico que representa el efecto en el rendimiento de la producción de dos caldos diferentes de SFM para la generación del complejo de transfección (caldo F17® y OptiProSFM®).

La **Figura 7** es un gráfico que muestra la transfección a la proporción molar óptima (1:1:2:1) de plásmidos en la producción de dos productos diferentes (diferentes TOI) que tienen diferentes tamaños. El ensayo se llevó a cabo en matraces centrifugadores de 100 mL en condiciones óptimas de transfección.

10 La **Figura 8** es un gráfico que muestra el impacto de la estrategia de adición de butirato sódico en la productividad, según la medición de la concentración de p24 en el sobrenadante.

La **Figura 9** es un gráfico que muestra el impacto de la estrategia de adición de butirato sódico en la productividad, según la medición de la concentración de genomas infecciosos (GI) en el sobrenadante.

La **Figura 10** es un gráfico que muestra el impacto de la estrategia de adición de butirato sódico en la productividad, según la medición de la proporción de partículas físicas/partículas infecciosas (PF/PI) en el sobrenadante.

15 La **Figura 11** es un gráfico que representa la media de 6 producciones de VIH-VSVG-WASp en un matraz centrifugador de 100 mL con adición de butirato sódico 24 horas después de la transfección, hpt, a una concentración final de 5 mM en el cultivo.

20 La **Figura 12** es un gráfico que muestra la comparación entre el protocolo de suspensión a 100 mL con células HEK293T desarrolladas en suspensión en un caldo libre de suero y el estándar en fábricas celulares de 10 niveles para la producción de un vector lentiviral VIH-VSVG-WASP, los resultados de GI y la proporción PF/PI en el sobrenadante 48 hpt.

La **Figura 13** es un gráfico que representa la evaluación del proceso de suspensión de la invención a diferentes escalas (100 mL a 50 L) en diferentes dispositivos de cultivo celular (tanque centrifugador, de olas y de agitación) y la comparación con el proceso convencional con células adherentes usando suero.

25 Ejemplos

El objetivo de este estudio era producir un vector lentiviral a una escala compatible con aplicaciones industriales, en un biorreactor en suspensión en un caldo libre de suero. Ventajosamente, el proceso fue desarrollado hasta 50 L y la producción es fácilmente adaptable hasta una escala de biorreactor de al menos 100 L, 200L, o incluso de al menos 1000 L.

30 Para la producción de lentivirus recombinantes los inventores usaron 4 plásmidos (véase la estrategia en la Figura 1).

Materiales y métodos

Cultivo celular

35 La totalidad de la producción de vectores y del cultivo celular se realizó con un banco celular operativo (WCB) de células HEK293T dependiente del anclaje, que se desarrollaba inicialmente en presencia de suero fetal bovino que fue adaptado para el desarrollo en suspensión en caldo libre de suero, y se estableció un nuevo banco celular operativo. Las células se cultivaron en caldo F17® modificado complementado con Pluronic® F68 (Invitrogen), antiaglutinante GIBCO® (Invitrogen) y 4 mM de GlutaMAX™ (Invitrogen). Para el desarrollo del procedimiento descrito, se usaron diferentes recipientes de cultivo en condiciones controladas:

- 40
- matraz centrifugador (Techne, Reino Unido) para la escala de 100mL en condiciones controladas (37°C, 120 rpm);
 - para una escala mayor: biorreactor de vidrio (B-DCU® 2L-10L, Sartorius), biorreactor de olas (Cultibag RM® 10L-25L, Sartorius), biorreactor de tanque de agitación de un solo uso (Cultibag STR® 50L, Sartorius) en condiciones controladas (pH=7,2, pO₂=50%, 37°C y una agitación específica según el sistema).

45 *Vectores y plásmidos*

El vector W1.6-huWASP-WPRE descrito en Zanta-Boussif et al., 2009, Gene Ther.; 16(5):605-19, fue producido por transfección transitoria de células 293T usando 4 plásmidos consistentes en plásmidos de transferencia pCCL W1.6-huWASP-WPREmut6-K combinados con los plásmidos Gag-Pol, VSV-G, Rev, que codifican, respectivamente, los genes *gag-pal*, *rev* del VIH-1 y la glicoproteína no relacionada del virus de la estomatitis vesicular G. Todos los plásmidos contienen el gen de resistencia a la kanamicina. Se proporcionan detalles adicionales en Merten et al., citado *supra*.

50

Se produjo el vector VIH-VSVG-GFP usando el mismo reactivo, salvo el plásmido del transgén, que es pRRLSINcPPT-PGK-eGFP-WPRE.

Butirato sódico

- 5 El butirato sódico está disponible comercialmente (butirato sódico $\geq 98,5\%$ (GC) I Sigma-Aldrich). Se prepara una solución madre a 500 mM en caldo F17® adaptado y filtrada a 0,22.

Caldo

Se adapta caldo F17® (Invitrogen) mediante complementación con Pluronic® F68 al 0,08%, antiaglutinante GIBCO® al 0,01%, y GlutaMAX™ a una concentración final de 4 mM.

Producción de vectores lentivirales

- 10 Se sembraron recipientes o bolsas de cultivo en suspensión a $0,2 \times 10^6$ células/mL. La transfección se llevó a cabo 72 horas después de la siembra. La densidad celular estaba entre 0,8 y $1,3 \times 10^6$ células/mL en el momento de la transfección.

Ejemplo para la producción de WASp (modo óptimo)

- 15 En la Figura 1 están representados los cuatro plásmidos usados en este estudio. Se sometieron a ensayo diferentes cantidades de ADN total. Se sometieron a ensayo diferentes concentraciones, pero, en las condiciones más óptimas, se usó ADN total en una cantidad de aproximadamente $2 \mu\text{g}/10^6$ células. El reactivo de transfección usado fue JetPEI® (producto de Polyplus) con una proporción N/P de aproximadamente 6. El ADN y la JetPEI® fueron diluidos, respectivamente, en caldos de cultivo antes de ser mezclados con cuidado durante aproximadamente 10 minutos. Esta mezcla llevó a la formación de un complejo de transfección, que fue añadido directamente al cultivo celular. Veinticuatro horas después de la transfección, se añadió butirato sódico para obtener una concentración final de aproximadamente 5 mM. Con fines analíticos, 72 horas después de la transfección se recogieron los caldos acondicionados que contenían las partículas vectoriales lentivirales.
- 20

Valoración

- 25 Las partículas físicas producidas fueron cuantificadas midiendo la cantidad de p24 (proteína de la cápside del VIH) usando un equipo específico de reactivos ELISA. Las partículas infecciosas fueron valoradas después de la infección de una línea celular susceptible de infección por vector lentiviral usando qPCR (TaqMan), según se describió previamente en Merten et al. (*supra*).

Resultados

30 A-Descripción de la adaptación de células HEK293T a un cultivo en suspensión en caldos definidos químicamente en ausencia de suero

- Origen de la línea celular HEK293T:
Las células provenían de un vial de un banco celular maestro (operativo) de células 293T adherentes según NCF cultivadas en DMEM con SFB al 10%.
- 35 – Adaptación a la suspensión en el caldo libre de suero:
Las células fueron descongeladas en un matraz de cultivos tisulares T75 (DMEM + SFB al 10%). Después de 2 pasadas y amplificación en un matraz de cultivos tisulares T175, los inventores llevaron a cabo un cambio completo del caldo en células adherentes sustituyendo el DMEM con caldo F17® modificado (caldo libre de suero). 48 horas después del cambio de caldo, todas las células se desprendieron del soporte y la viabilidad seguían siendo de aproximadamente 90%. Las células fueron cultivadas continuamente en F17 en un matraz de cultivos tisulares T175. Después de 3 pasadas en F17 y amplificación en un matraz de cultivos tisulares T225, las células fueron sembradas en un matraz centrifugador de 50 ml en condición de suspensión (utilizando un matraz centrifugador de un solo uso, Corning). En la pasada 8 (P8), se generó un banco celular de 54 viales (50×10^6 células/vial) de células 293T en suspensión.
- 40
- Generación de un banco celular:
45 La formulación para la crioconservación es: 80% de F17, 10% de DMSO y 10% de metilcelulosa al 1%.

B-Producción de un vector lentiviral que expresa la proteína verde fluorescente en células HEK293F clásicas en contraposición con las HEK293T

Uno de los objetivos del trabajo de los inventores era establecer un procedimiento de fabricación de vectores lentivirales en un cultivo en suspensión en ausencia de suero para aplicaciones industriales.

Inicialmente, se realizaron experimentos con una línea celular HEK293F, línea celular disponible comercialmente adaptada para el cultivo en suspensión en ausencia de suero.

5 Para generar los vectores lentivirales VIH-GFP mediante el sistema de transfección de 4 plásmidos descrito en Zanta-Boussif et al., 2009, Gene Ther.; 16(5):605-19, se sembraron células HEK293F en matraces centrifugadores de 100 mL a $1E+06$ células/mL. Diferentes condiciones de transfección fueron sometidas a ensayo a una escala de 100 mL. Los parámetros variables fueron: la cantidad de ADN total usada por cada 1×10^6 células, así como la proporción molar entre los 4 plásmidos/ $1E+06$ células. Aunque son posibles variaciones en estos parámetros, el tiempo de contacto para la formación del complejo (10 minutos) con el reactivo de transfección (JetPEI®) y la proporción ADN/PEI (N/P=6) fueron fijados como condiciones óptimas para la producción de lentivirus.

10 El complejo de ADN/PEI fue generado en 10mL de OptiProSFM® (Invitrogen), un caldo definido químicamente. Después de 10 minutos de contacto, se añadió directamente al cultivo la mezcla del complejo de ADN/PEI.

Para evaluar la eficacia de la transfección, los cultivos celulares fueron analizados por citometría de flujo para medir la expresión de la proteína verde fluorescente.

15 Además, los sobrenadantes del cultivo celular fueron sometidos a ensayo ELISA de p24 para medir la concentración del antígeno p24 de la cápside del VIH, que es indicativa de la presencia de partículas lentivirales.

Las Figuras 2 y 3 presentan los resultados.

Eficacia de la transfección 48 horas después de la transfección

20 Los resultados demuestran que, aunque las células HEK293F pueden ser eficazmente transfectadas en ciertas condiciones de concentración y proporción de ADN (2,5 µg, 1:1:1:1 y 1:1:1:2, respectivamente), pueden detectarse cantidades muy pequeñas (< 50 ng/mL) de antígeno p24. Una cantidad de p24 por encima de 150 ng/mL es indicativa de una producción lentiviral eficaz, mientras que un valor menor se debe esencialmente a ausencia de p24. Podemos correlacionar la cantidad de p24 con la cantidad de partículas físicas usando un equipo de reactivos ELISA (Alliance HIV-1 P24 ANTIGEN ELISA Kit (480 Test), PerkinElmer) que da esta información: 1 ng de p24 = $1,2 \times 10^7$ PF.

25 C-Producción de VIH-GFP a partir de células HEK293T

La producción del vector lentiviral VIH-GFP se llevó a cabo en condiciones similares usando células HEK293T. La eficacia de la transfección y la concentración del antígeno p24 en los sobrenadantes del cultivo celular fueron determinadas 48 horas después de la transfección.

Las Figuras 4 y 5 presentan los resultados.

30 Los resultados demuestran que, con una eficacia similar de transfección (~90% a 2 y 2,5 µg de ADN, proporción 1:1:2:1), las células HEK293T son más eficaces que las HEK293F en la generación del antígeno p24 y, por lo tanto, de partículas del vector lentiviral del VIH (198 ng/mL y 314ng/mL).

35 En conclusión, estos experimentos permitieron a los inventores determinar condiciones eficaces para generar vectores lentivirales en células HEK293T a pequeña escala. Esas condiciones fueron investigadas ulteriormente para evaluar la viabilidad de fabricación de vectores lentivirales en suspensión en ausencia de suero a una escala que permitiera aplicaciones industriales.

D-Optimización del procedimiento de producción de vectores lentivirales en células HEK293T en suspensión en ausencia de suero fetal bovino

D1-Eliminación del caldo OptiProSFM® para la generación del complejo de PEI/ADN

40 Para simplificar el procedimiento, los inventores investigaron la posibilidad de generar el complejo de PEI/ADN directamente en el caldo F17® para evitar el uso de un caldo diferente (OptiProSFM®). La producción de vectores lentivirales se llevó a cabo a una escala de 100 mL en un matraz centrifugador usando las condiciones de transfección determinadas en experimentos anteriores; es decir, uso de células HEK293T, proporción molar de plásmidos de 1:1:2:1 y 2,5µg de ADN total/ 1×10^6 células. Las células y los sobrenadantes fueron recogidos para someterlos a ensayo, y los resultados se presentan en la Figura 6.

Los resultados demuestran que no hay ninguna diferencia importante en la concentración de p24 si se genera a partir del complejo de PEI/ADN combinado en el caldo Optipro, en contraposición con los caldos F17. Usando únicamente caldos F17 a lo largo del proceso, en vez de usar dos tipos de caldos diferentes, constituye una mejora fundamental hacia la adaptación del procedimiento para una escala industrial.

50 *D2-Importancia del uso de una proporción molar de plásmidos en lugar de una proporción de masas de plásmidos (ADN) en el sistema de producción: Flexibilidad del procedimiento gracias al uso de una proporción molar*

El sistema de vectores lentivirales de producción usado en los presentes experimentos implica a 4 plásmidos. Tres de ellos (el plásmido Gag-Pol, el plásmido VSV-G y el plásmido Rev) son comunes a todos los vectores lentivirales, ya que codifican funciones de acción *trans* necesarias para la formación de las propias partículas lentivirales; es decir, los elementos estructurales (cápside vectorial, envoltura del VSV-G), las proteínas enzimáticas (transcriptasa inversa, integrasa), y el factor regulador de la expresión (proteína Rev). El único factor que varía es el plásmido que codifica el genoma vectorial. Dado que el casete de expresión de transgenes codificado por el plásmido del genoma vectorial puede tener diferentes tamaños (promotores y ADNc diferentes), la cantidad final de plásmido necesaria para la generación de partículas funcionales puede variar de vector a vector, y con los diferentes casetes de expresión.

5 Por lo tanto, dado que la proporción molar 1:1:2:1 (plásmido Env:plásmido Gag-Pol:plásmido Rev:plásmido TOI) dio los mejores resultados, los inventores quisieron verificar que, manteniendo intacta la proporción molar, podían mantener de manera reproducible los rendimientos de producción lentiviral aunque variara el tamaño del plásmido. Gracias a esta proporción molar, que mantiene intacto el número de moléculas de cada plásmido con independencia de su tamaño en pares base (y, por lo tanto, de su peso), los inventores pueden garantizar las condiciones óptimas de transfección con independencia del producto.

La Figura 7 muestra un ejemplo en el que los inventores compararon un vector lentiviral que codificaba el ADNc de la proteína GFP (tamaño total del plásmido = 7388 pb) con un vector lentiviral que codificaba el ADNc de la proteína Wiskott-Aldrich (WASp) (tamaño total del plásmido = 9780 pb).

20 Los resultados demuestran que, manteniendo la proporción de plásmidos igual en términos del número de moléculas (lo cual afecta, a su vez, a la cantidad de plásmido individual usada), las producciones de vectores lentivirales permanecen intactas. Estos resultados sugieren que el método de producción de vectores lentivirales en células HEK293T, en suspensión en ausencia de suero con un total de 2,5 $\mu\text{g}/1\text{E}+06$ células a una proporción molar de 1:1:2:1, puede ser usado para diferentes vectores con independencia de su tamaño. Por supuesto, aunque óptimas, estas condiciones pueden ser variadas a partir de estos valores, por lo que una persona experta en la técnica puede adaptar los parámetros a las células y los plásmidos particulares usados para la producción del vector lentiviral deseado.

D3-Mejora de la productividad: Uso de butirato sódico

30 Se ha documentado que el butirato sódico potencia la producción de vectores lentivirales en un sistema de células adherentes (Gasmi *et al* Mar. 1999). Los inventores quisieron determinar si el butirato sódico sería útil en tales cultivos en suspensión. Sin embargo, si así era, el uso de butirato sódico no debería hacer el procedimiento más engorroso, siendo la prioridad mantener el procedimiento aplicable a aplicaciones industriales. Por lo tanto, los inventores decidieron comprobar si la adición de butirato sódico con posterioridad a la transfección sin cambio de caldo podría tener un impacto positivo en las producciones de vectores lentivirales en las condiciones previamente establecidas (HEK293T, cultivo en suspensión, ausencia de suero, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plásmido a una proporción de 1:1:2:1).

35 Se llevaron a cabo experimentos a la escala de 100 mL en matraces centrifugadores. El butirato sódico fue preparado en caldo F17® adaptado y fue añadido con posterioridad a la transfección a una concentración final de 5mM. El efecto en la producción de vectores lentivirales fue evaluada mediante medición del antígeno p24 por ELISA y midiendo la concentración de partículas infecciosas usando qPCR (TaqMan). La medición de ambos parámetros permite el cálculo de la proporción PF/PI (número total de partículas con respecto al de partículas infecciosas), que es un indicador de la calidad de una preparación de vectores lentivirales. Se considera que la calidad de la producción es aceptable cuando la proporción PF/PI está entre 100 y 250 (resultados comúnmente observados para la producción según NCF en GENETHON).

40 Inicialmente, los inventores sometieron a ensayo diferentes estrategias para el butirato sódico añadido en un matraz centrifugador de 100 mL. Una estrategia fue añadirlo 6 horas después de la transfección directamente en el cultivo. Otra estrategia fue llevar a cabo un cambio completo del caldo 24 horas después de la transfección y añadir el butirato sódico en el nuevo caldo usado para volver a suspender las células. Por último, la estrategia que dio los mejores resultados fue añadir directamente el butirato sódico en el cultivo 24 horas después de la transfección sin cambio de caldo. Observación: durante el cambio de caldo, las células fueron centrifugadas 5 minutos a 500g antes de volver a suspenderlas en F17 nuevo.

Los inventores llevaron a cabo un experimento en paralelo con tres centrifugadores para confirmar los experimentos previos; los resultados están en las Figuras 8, 9 y 10.

45 Los resultados demuestran que añadir butirato sódico a una concentración final de 5 mM, 24 horas después de la transfección aumenta la producción de vectores entre 3 y 4 veces en cuanto a partículas infecciosas y que también hay un aumento de la cantidad de p24 producido.

La Figura 10 presenta la proporción PF/PI que los inventores tuvieron para este experimento.

Este gráfico muestra que el butirato sódico permite no solo un aumento de la productividad, sino que también mantiene una cualidad aceptable de la producción al dar una proporción PF/PI en el intervalo aceptable (100-250).

La robustez de esta estrategia fue evaluada realizando 6 centrifugaciones con el mismo protocolo; los resultados están representados en la Figura 11.

- 5 Estos experimentos confirman que el mejor momento de recogida es 48 hpt según la concentración de GI y la calidad de la producción relativa a la proporción PF/PI 48 hpt.

E-Escalado al alza

- 10 *E1- Demostración de que el método de producción de vectores lentivirales en células desarrolladas en suspensión en ausencia de suero da resultados similares al sistema convencional de producción de vectores lentivirales en células adherentes en presencia de suero*

Comúnmente, las producciones a gran escala de vectores lentivirales para investigación o fines clínicos se llevan a cabo usando transfección de células adherentes HEK293 en presencia de suero. A causa de la valoración de los vectores, las HEK293T son las células usadas más comúnmente. Los protocolos de producción se basan en esencia en el uso de fábricas celulares de 2 niveles o 10 niveles o sistemas multibandeja equivalentes. Véase Schweizer y Merten, 2010 Current Gene Therapy 10(6), 474-486, en particular, sobre todo, la parte 2.3 ("Large scale process, Including Transient Transfection").

15

Este protocolo basado en células adherentes se comparó con el método óptimo definido en lo que antecede en el que células HEK293T fueron desarrolladas en suspensión en ausencia de suero, y transfectadas con 2,5 µg ADN/1×10⁶ células con una proporción molar de plásmidos de 1:1:2:1, con adición de butirato sódico a 5 mM 24 hpt sin cambio de caldo.

20

La Figura 12 muestra una comparación entre el protocolo de la suspensión de 100 mL con HEK293T y el estándar en fábricas celulares de 10 niveles para la producción del vector lentiviral VIH-VSVG-WAS.

Los resultados demuestran que el sistema en suspensión genera vectores lentivirales con rendimiento y calidad similares a los del sistema de células adherentes.

- 25 *E2-Demostración de que el sistema de producción de vectores lentivirales en suspensión en ausencia de suero según la invención puede ser escalado al alza y utilizado en aplicaciones industriales*

La escalabilidad del procedimiento óptimo de producción lentiviral anteriormente descrito (células HEK293T en suspensión en ausencia de suero con 2,5 µg/mL de ADN/1e6 células con una proporción de plásmidos de 1:1:2:1 con butirato sódico) fue evaluada en diversos volúmenes de cultivo en términos de producciones de partículas (ELISA de p24) y de partículas infecciosas (qPCR, TaqMan) en el caso de un vector lentiviral VIH-VSVG-WASp. Las proporciones de PF/PI fueron calculadas, según se ha descrito anteriormente, para cada escala y representadas gráficamente en el histograma presentado en la Figura 13 en comparación con los resultados obtenidos con el método de producción convencional en células adherentes en presencia de suero.

30

Los resultados demuestran que la productividad (número de genomas infecciosos, GI) y la calidad (PF/PI) de los vectores del sistema novedoso de producción de vectores lentivirales se mantienen en un amplio intervalo de volúmenes y de cultivo y que son comparables favorablemente con los obtenidos con el método convencional de producción que implementa células adherentes desarrolladas en un caldo que contiene suero (calidad y productividad iguales para toda la escala y competitivo con el procedimiento de fábricas celulares).

35

Estos resultados demuestran que el procedimiento novedoso de producción de vectores lentivirales en suspensión combina la eficacia con la practicidad y que, por lo tanto, puede ser usado en aplicaciones a escala industrial de vectores lentivirales.

40

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de un vector lentiviral recombinante que comprende:
 - el cultivo, en suspensión en un caldo libre de suero, de células HEK293T transfectadas con al menos un plásmido adaptado para la producción de un vector lentiviral, llevándose a cabo el cultivo en un volumen de al menos 50 L;
 - la recogida del vector recombinante producido del caldo de cultivo.
2. El método según la reivindicación 1 en el que la etapa de recogida consiste en la recogida de un único lentivirus.
3. El método según la reivindicación 2 en el que la transfección es una transfección transitoria y la recogida única es implementada entre 48 y 72 horas después de la transfección.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende una etapa de transfección en la que las células son transfectadas con una mezcla de polietilenimina (PEI), tal como una PEI lineal de 20 - 25 kD, y plásmidos.
5. El método según la reivindicación 4 en el que la transfección se lleva a cabo con una cantidad total de ADN de al menos $1,5 \mu\text{g}/10^6$ células.
6. El método según la reivindicación 4 o 5 en el que la PEI y los plásmidos son mezclados antes de la transfección según una proporción N/P de menos de 10, tal como de aproximadamente 6, refiriéndose N/P al número de átomos de nitrógeno en la PEI por fosfato de oligonucleótido.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en el que el tiempo de contacto entre la PEI y los plásmidos antes de la adición al cultivo celular está comprendido entre 5 y 30 minutos, el tiempo de contacto, siendo en particular de aproximadamente 10 minutos.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que se añade butirato sódico al cultivo celular 24 horas después de la transfección de las células sin cambiar el caldo, preferentemente en el que se añade butirato sódico al cultivo celular a una concentración final en el cultivo comprendida entre 2 mM y 12 mM, en particular entre 2 mM y 10 mM, más particularmente a una concentración final de 5 mM.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que las células son transfectadas con cuatro plásmidos que incluyen un plásmido que codifica las proteínas de envoltura (plásmido Env), un plásmido que codifica las proteínas lentivirales Gag-Pol (plásmido Gag-Pol), un plásmido que codifica la proteína lentiviral Rev (plásmido Rev) y un plásmido que comprende un transgén de interés (TOI) entre una 3'-LTR lentiviral y una 5'LTR lentiviral (plásmido TOI).
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que se producen al menos 10^7 genomas infecciosos/mL.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que:
 - las células son células 293T;
 - la transfección de las células se lleva a cabo con una mezcla de PEI y del o de los plásmidos requeridos;
 - se añade butirato sódico 24 horas después de la transfección sin cambiar el caldo del cultivo; y
 - se lleva a cabo una única recogida de los vectores lentivirales producidos.
12. Un dispositivo de cultivo celular, conteniendo dicho dispositivo de cultivo un volumen de al menos 50 L de un medio de cultivo libre de suero que comprende células HEK 293T, transfectadas con al menos un plásmido adaptado para la producción de un vector lentiviral, desarrollándose dichas células en suspensión en dicho dispositivo de cultivo.
13. Un método para optimizar la producción de un vector lentiviral por células HEK 293T cultivadas en suspensión en un caldo libre de suero, transfectadas con plásmidos requeridos para dicha producción, que comprende la adición de butirato sódico 24 horas después de la transfección a un cultivo celular sin cambiar el caldo del cultivo.
14. El método según la reivindicación 13 en el que se añade butirato sódico a una concentración final de 5 mM.

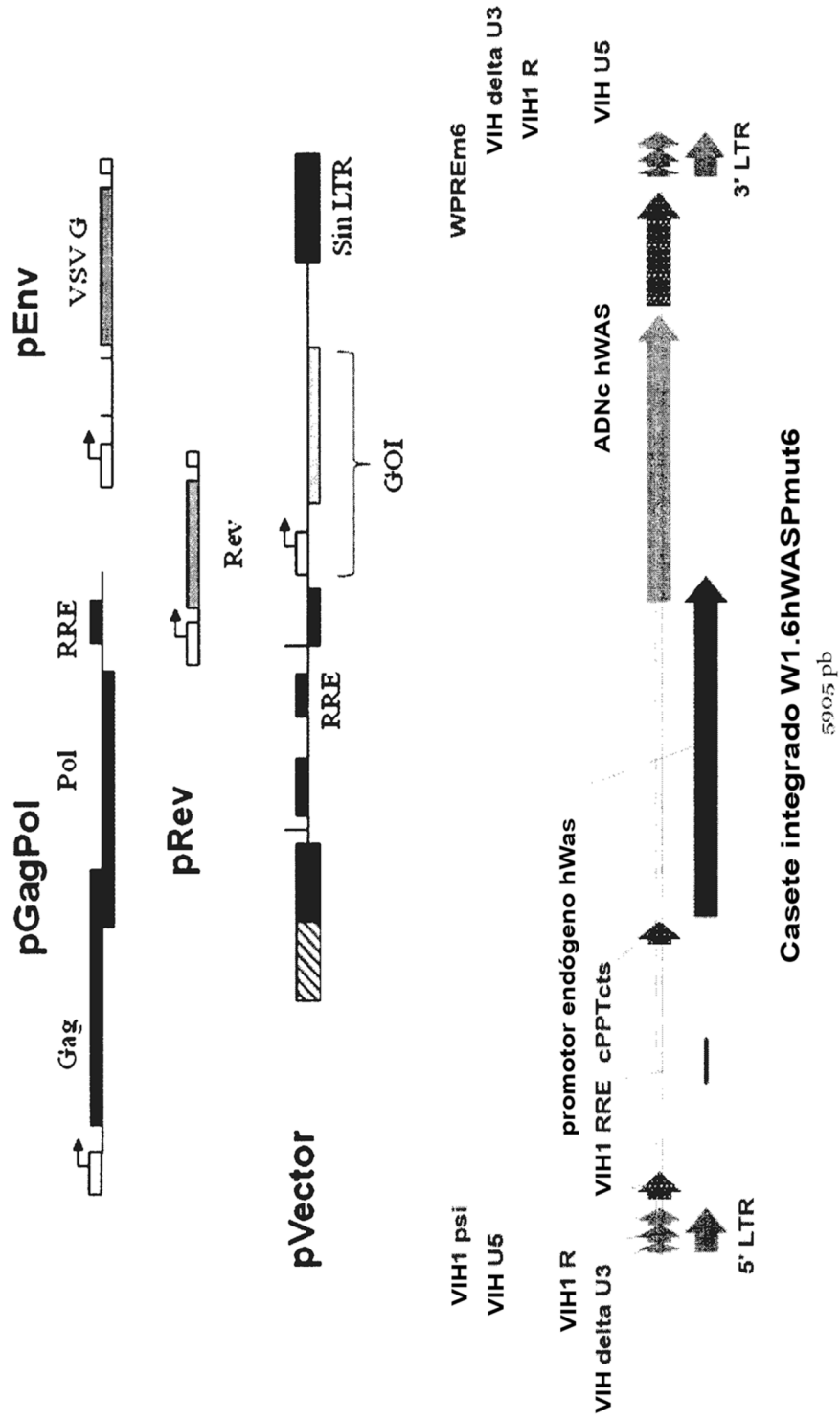


Figura 1

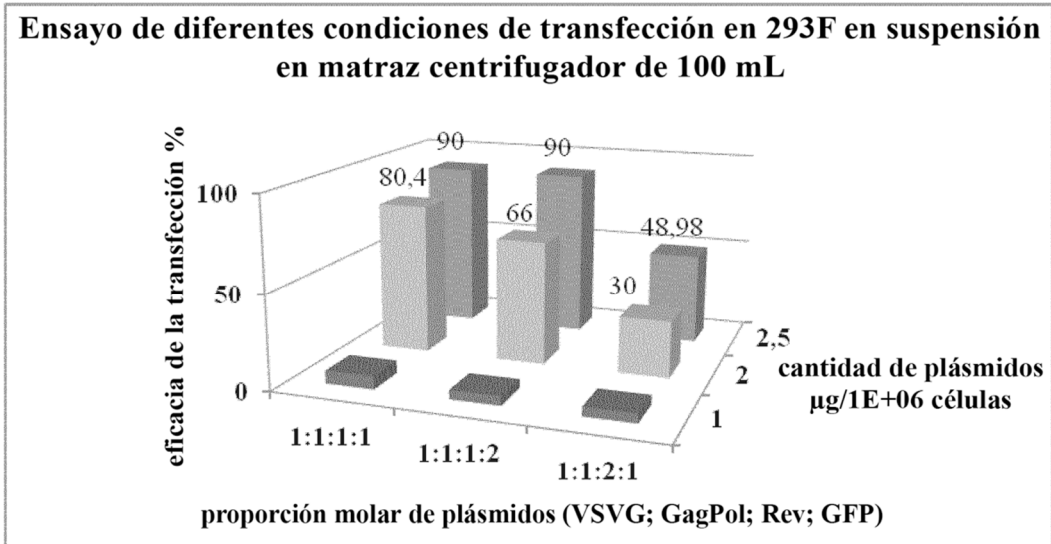


Figura 2

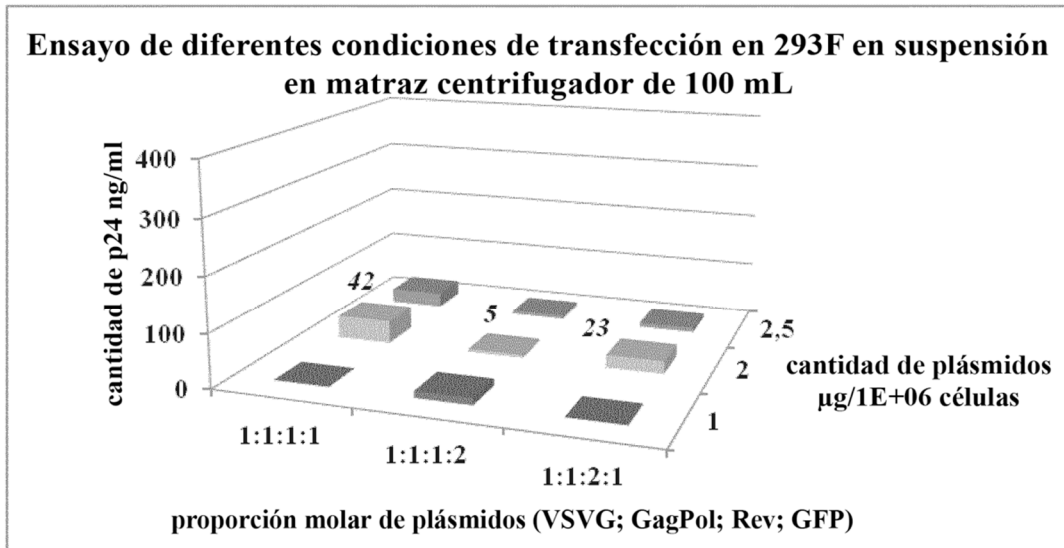


Figura 3

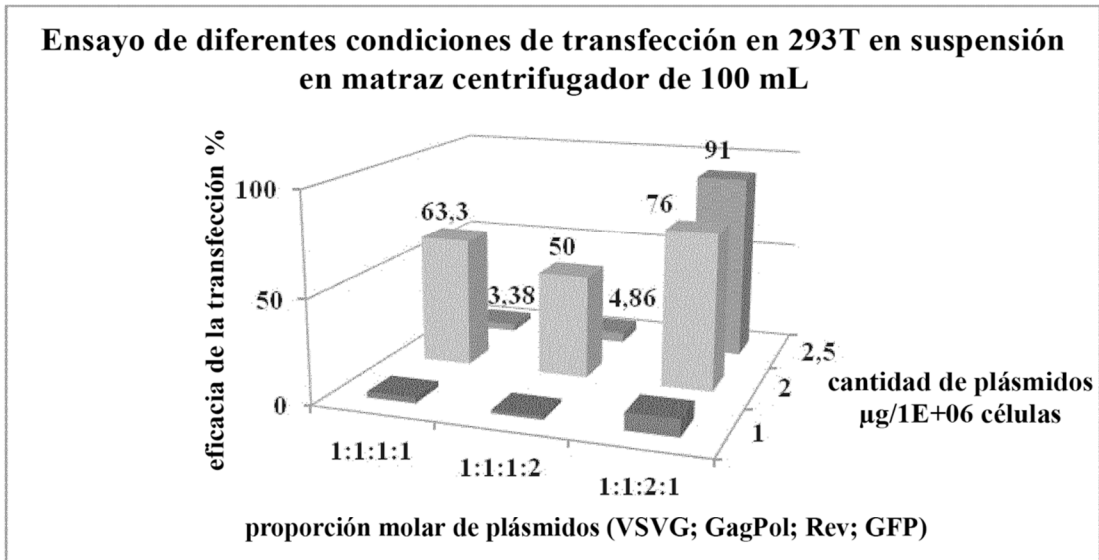


Figura 4

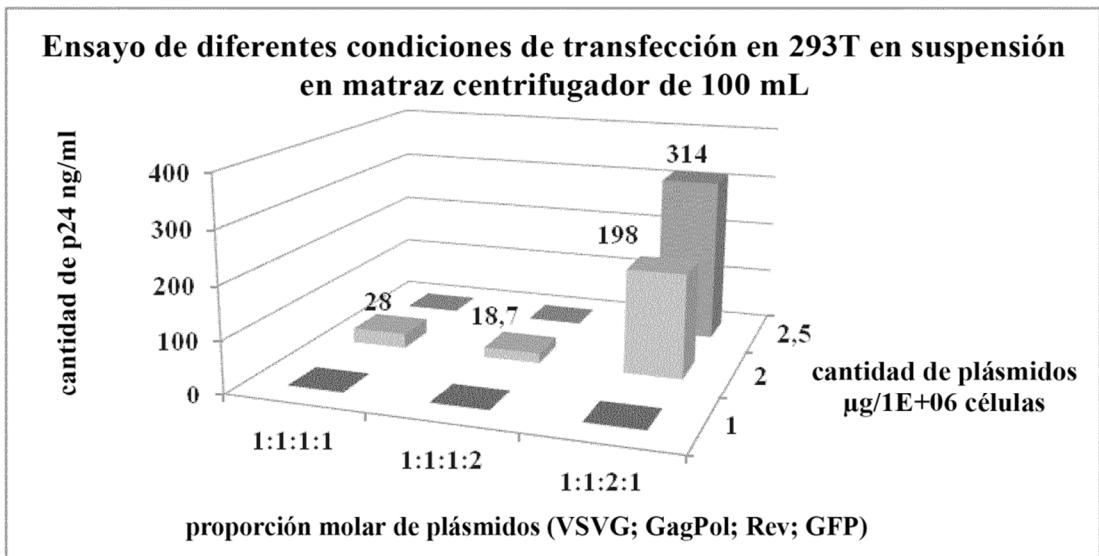


Figura 5

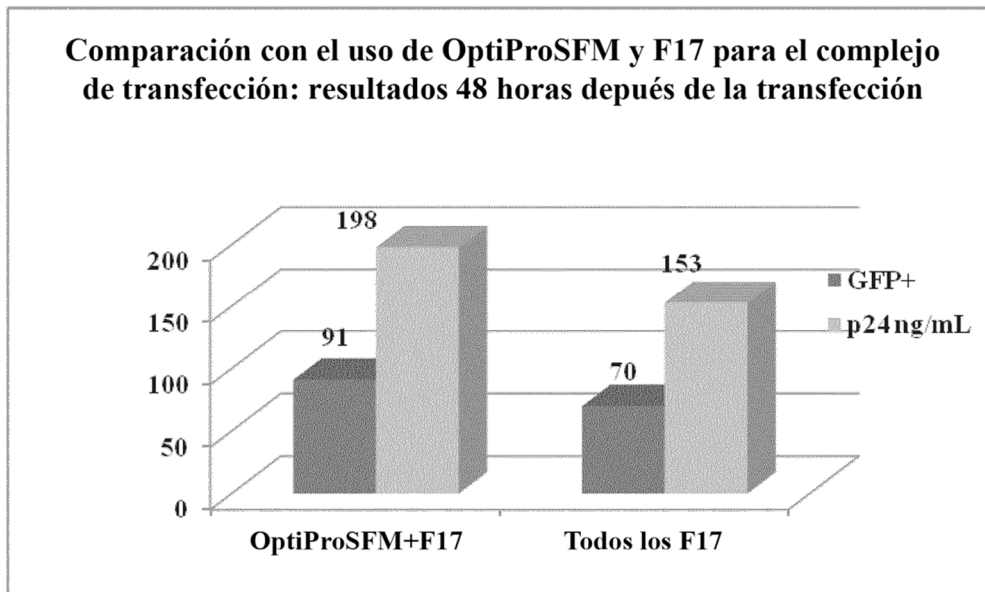


Figura 6

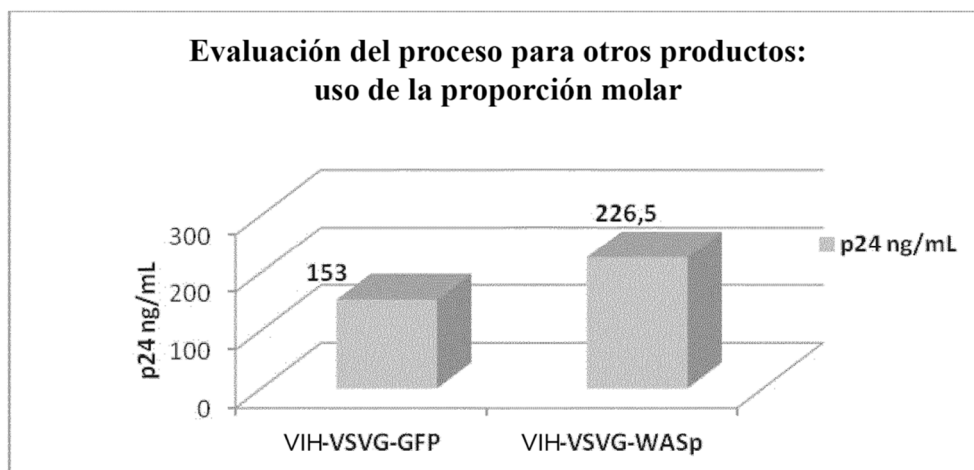


Figura 7

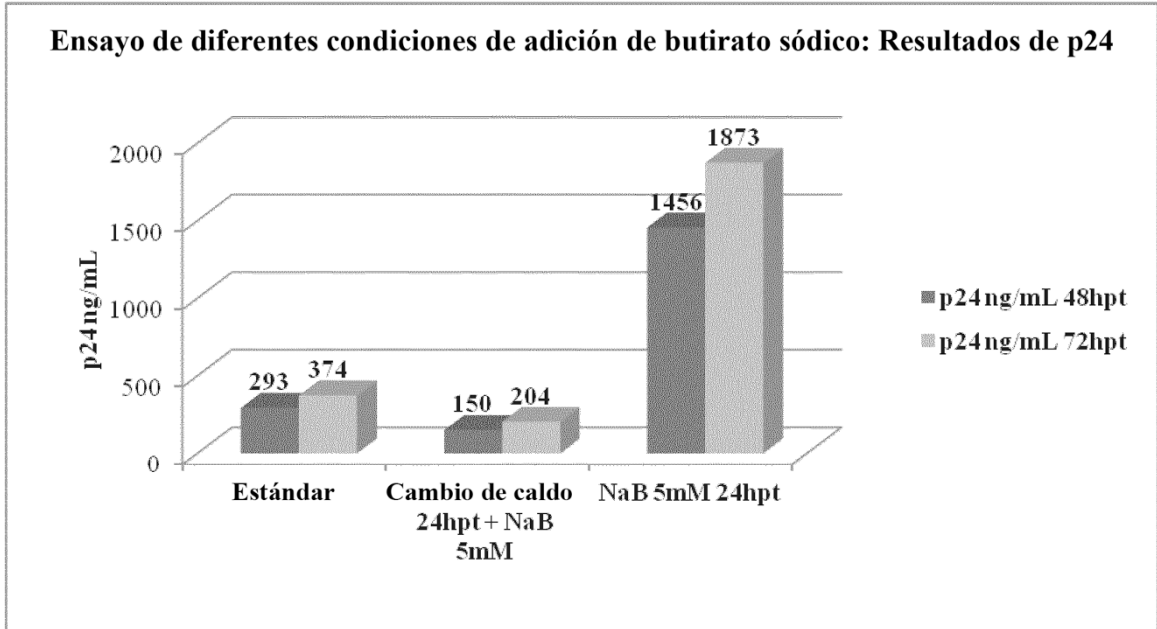


Figura 8

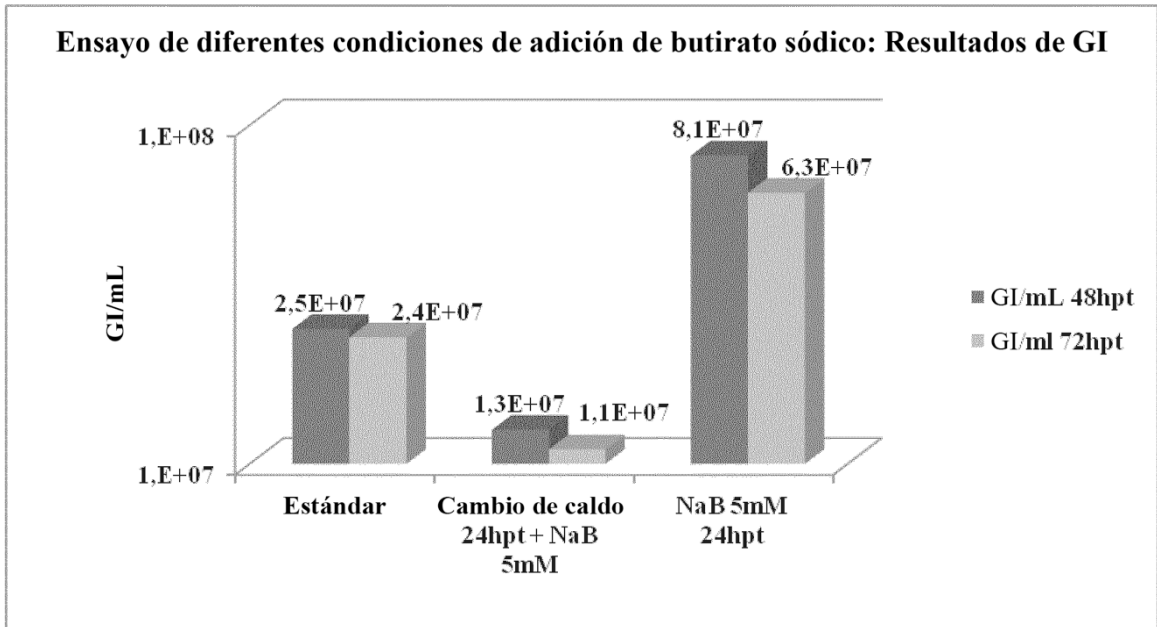


Figura 9

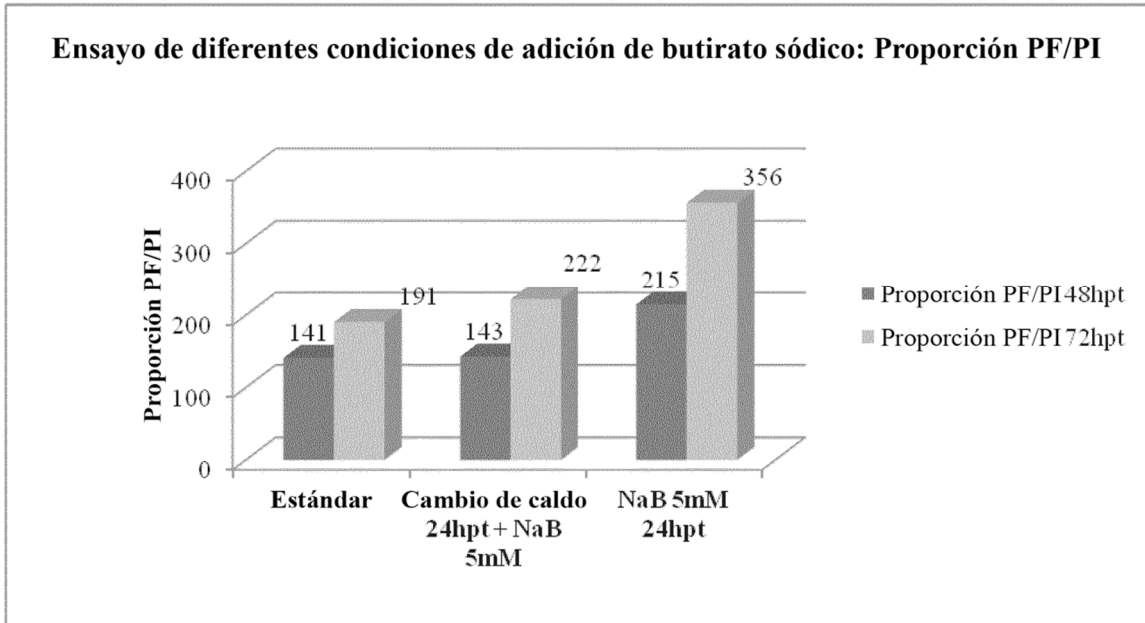


Figura 10

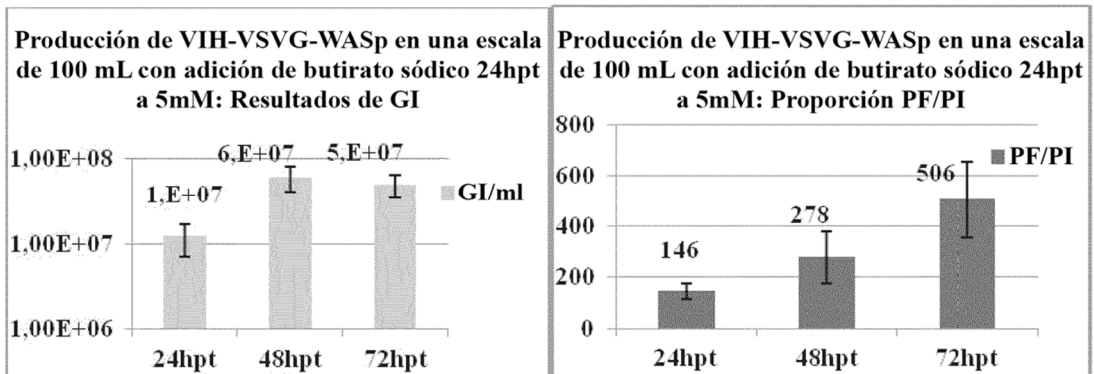


Figura 11

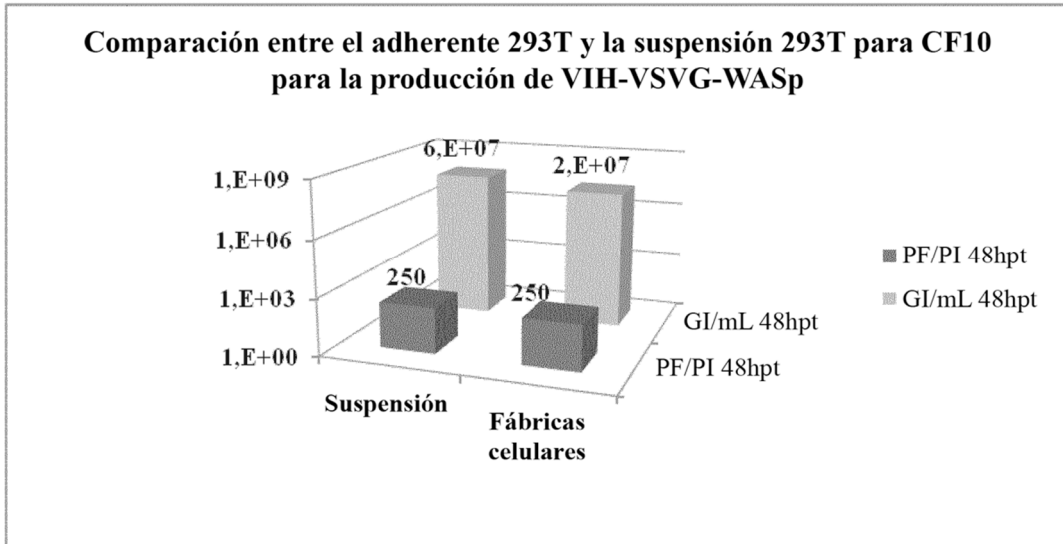


Figura 12

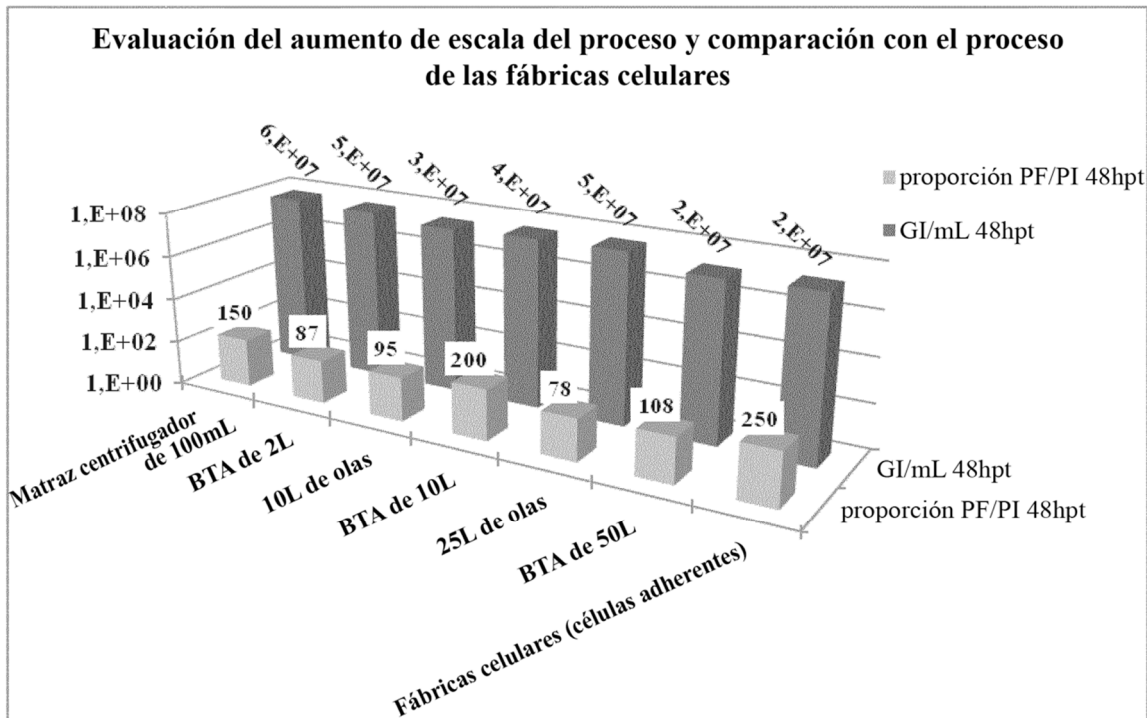


Figura 13