

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 915**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2011 PCT/US2011/022371**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11094198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2011 E 11737508 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2529020**

54 Título: **Plataforma de fabricación escalable para la purificación de vectores virales y vectores virales purificados de este modo para su utilización en terapia génica**

30 Prioridad:

28.01.2010 US 299184 P

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

11.09.2018

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(100.0%)
3401 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**WRIGHT, JOHN, FRASER;
QU, GUANG;
HAUCK, BERND y
HIGH, KATHERINE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 680 915 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

Plataforma de fabricación escalable para la purificación de vectores virales y vectores virales purificados de este modo para su utilización en terapia génica.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de buenas prácticas de fabricación y purificación de vectores virales. Más específicamente, las composiciones y los procedimientos facilitan la preparación de VAA recombinante altamente purificado para su utilización en protocolos de terapia génica.

Antecedentes de la invención

Se citan varias publicaciones y documentos de patente en toda la memoria con el fin de describir el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

El suministro de genes es un procedimiento prometedor para el tratamiento de enfermedades adquiridas y hereditarias. Se han descritos varios sistemas basados en virus para fines de transferencia génica, incluyendo sistemas basados en virus adenoasociados (VAA). El VAA es un parvovirus de ADN dependiente de virus auxiliar que pertenece al género *Dependovirus*. El VAA requiere coinfección con un virus auxiliar no relacionado, por ejemplo, adenovirus, virus del herpes o vaccinia, con el fin de que se produzca una infección productiva. En ausencia de un virus auxiliar, VAA establece un estado latente insertando su genoma en un cromosoma de la célula huésped. La posterior infección por un virus auxiliar rescata el genoma viral integrado, que entonces puede replicarse para producir una progenie viral infecciosa.

El VAA presenta una amplia gama de huéspedes y puede replicarse en células de cualquier especie en presencia de un virus auxiliar adecuado. Por ejemplo, el VAA humano se replicará en células caninas coinfectadas con un adenovirus canino. El VAA no se ha asociado con ninguna enfermedad humana o animal y no parece alterar las propiedades biológicas de la célula huésped tras la integración. Para una revisión de VAA, véase, por ejemplo, Berns y Bohenzky (1987) *Advances in Virus Research* (Academic Press, Inc.) 32:243-307.

Se ha descrito la construcción de viriones de VAA recombinante (VAAR) infecciosos. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.ºs 5.173.414 y 5.139.941; números de publicación internacional WO 92/01070 (publicado el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicado el 4 de marzo de 1993); Lebkowski *et al.* (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent *et al.* (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; y Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801.

Los vectores de VAA pueden diseñarse por ingeniería genética para que porten una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés (por ejemplo, un gen seleccionado que codifica para una proteína terapéutica, una molécula de ácido nucleico antisentido, una ribozima, un miARN o similar) deleccionando, en su totalidad o en parte, la porción interna del genoma de VAA e insertando la secuencia de ADN de interés entre las ITR. Las ITR siguen siendo funcionales en tales vectores, lo que permite la replicación y el empaquetamiento de los VAAR que contienen la secuencia de nucleótidos heteróloga de interés. La secuencia de nucleótidos heteróloga también está unida normalmente a una secuencia promotora que puede dirigir la expresión génica en las células diana del paciente en determinadas condiciones. También pueden incluirse señales de terminación, tales como sitios de poliadenilación, en el vector.

Aunque eliminar por completo la inmunogenicidad de un vector viral no es un objetivo realista, minimizar la inmunogenicidad de vectores de VAA preparados para terapia génica humana es muy deseable. Es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones y procedimientos que logran este objetivo.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para purificar partículas de vector de VAA genuinas que comprenden un transgén que codifica para una proteína terapéutica o fragmento de la misma a partir de una preparación de VAA que comprende partículas de vector de VAA, cápsides vacías e impurezas de la célula huésped, proporcionando de ese modo un producto de VAA sustancialmente libre de cápsides vacías de VAA, que comprende recolectar células transducidas con VAA; concentrar las células por medio de filtración de flujo tangencial; y lisar las células por microfluidización para formar un lisado. El lisado se filtra entonces y se clarifica. Tras la clarificación, las partículas de VAA se purifican mediante cromatografía en columna de intercambio iónico y se concentran opcionalmente además mediante filtración de flujo tangencial. El eluato así generado se estratifica sobre un gradiente isopícnico y se somete a ultracentrifugación, la capa que contiene las partículas virales se recolecta y se somete a intercambio de tampón mediante filtración de flujo tangencial. Las partículas de VAA purificadas se formulan entonces con tensioactivo y la formulación resultante se filtra para eliminar cualquier impureza restante produciendo de ese modo un producto de VAA altamente purificado, en el

que dichas partículas de vector de VAA genuinas están presentes en dicho producto de VAA en una cantidad de por lo menos el 90%.

5 Los productos de VAA tal como se describe en la presente memoria pueden comprender partículas de VAA a una concentración de 10^{15} partículas por ml, más preferentemente las partículas están presentes a una concentración de 10^{16} partículas por ml y lo más preferentemente, las partículas están presentes a una concentración de 10^{17} partículas por ml.

10 Los vectores de VAA así purificados pueden ser de una variedad de serotipos, incluyendo sin limitación, VAA1, VAA2, VAA5, VAA6, VAA8 y VAA9.

También se describe en la presente memoria una formulación de vector de VAA que comprende partículas de VAA purificadas utilizando el procedimiento descrito anteriormente en un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Las partículas de VAA purificadas comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica para un producto génico deseable. Tales productos incluyen sin limitación, ARNip, moléculas antisentido, miARN, ribozimas y similares. Otros productos incluyen ácidos nucleicos que codifican para hormonas, receptores de crecimiento, ligandos y proteínas útiles para la corrección de errores congénitos del metabolismo. El vector puede codificar para una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en RPE65, factor VIII y factor IX.

20

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. Ilustración de los tipos de partículas de VAA producidas durante la generación de VAA recombinante, incluyendo un esquema de la purificación lograda (un mezcla de vector genuino e impurezas relacionadas con el vector) utilizando procedimientos de purificación escalables convencionales en la industria actuales, y la purificación lograda (eliminación sustancial de impurezas relacionadas con el vector) utilizando el procedimiento de purificación escalable que incorpora una etapa de ultracentrifugación en gradiente que se vuelve "escalable" por la secuencia de etapas de purificación utilizada.

30 Figura 2. Diagrama de flujo que muestra las etapas del procedimiento de purificación de vectores de la invención.

35 Figura 3. Análisis de vectores de VAA purificados mediante el procedimiento de purificación escalable convencional en la industria representativo (gen1-Chr) mediante ultracentrifugación en gradiente. Se muestran las cantidades relativas y heterogeneidad de partículas de VAA en un vector aparentemente "puro", y la eficacia de la ultracentrifugación en gradiente en la separación de vector de VAA genuino de impurezas relacionadas con el vector. "gen1-Chr" es representativo de procedimientos de purificación escalables "convencionales en la industria" actuales.

40 Descripción detallada de la invención

La invención actual proporciona una plataforma de purificación de vectores de VAA que incluye dos características únicas que la distinguen de procedimientos de purificación de vectores de VAA escalables "convencionales en la industria" actuales: 1) un procedimiento de plataforma modular que puede utilizarse para la purificación de diferentes serotipos de VAA/variantes de cápside que proporciona una alta pureza de vector, incluyendo eliminación eficaz de impurezas relacionadas con el vector; y 2) una secuencia única de etapas de procedimiento (incluyendo una secuencia "central" crítica de cromatografía en columna seguida por filtración de flujo tangencial, seguida por ultracentrifugación en gradiente) que confiere una escalabilidad inesperada a la importante etapa de ultracentrifugación.

50

La optimización de procedimientos de generación y purificación de vectores de VAA garantiza que el producto de vector pueda suministrar eficazmente su carga genética a células diana, y minimiza la posibilidad de activación de respuestas inmunitarias perjudiciales. Dados que las impurezas relacionadas con el vector no son propias pero sí inmunostimuladoras con respecto a un futuro receptor humano, deben minimizarse o eliminarse durante la purificación de productos parenterales humanos. Las impurezas relacionadas con el vector se producen normalmente en cantidades mucho mayores que vectores genuinos durante la generación de vectores en cultivo celular, y son difíciles de separar de vectores durante la purificación porque son de estructura similar. En cosechas de células en bruto tras una generación de vectores, las impurezas relacionadas con el vector representan generalmente >50%, normalmente ~ 80%, y pueden representar >80% de las partículas totales de VAA que se biosintetizan. Esto se ha observado utilizando cada uno de los sistemas de cultivo celular desarrollados hasta la fecha para generar vectores de VAA. El desarrollo de procedimientos de fabricación para purificar VAA recombinante como producto para tratar una enfermedad humana debe lograr los siguientes objetivos: 1) pureza, potencia y seguridad de vector constantes; 2) estabilidad del procedimiento de fabricación; y 3) coste aceptable de fabricación. Los procedimientos de purificación de vectores de VAA escalables "convencionales en la industria" actuales no logran adecuadamente la eliminación de impurezas relacionadas con el vector, que es importante para cumplir el primer objetivo enumerado anteriormente (pureza, potencia y

65

seguridad de vector constantes). Además, no poder eliminar adecuadamente impurezas relacionadas con el vector utilizando procedimientos de purificación escalables convencionales en la industria actuales se ha producido porque: 1) el desarrollo de procedimientos de purificación de productos virales tales como VAA recombinante para aplicaciones distintas de vacunas (en las que se busca normalmente una respuesta inmunitaria en vez de evitarse) es relativamente joven; 2) muchos grupos implicados en el desarrollo de procedimientos de purificación escalables para vectores de VAA no han sido conscientes de los altos niveles de impurezas relacionadas con el vector y/o han sumido que tales impurezas no contribuirán a un aumento clínicamente significativo de la inmunogenicidad del vector; y 3) supone un desafío técnico desarrollar procedimientos de purificación escalables para separar vectores genuinos de impurezas relacionadas con el vector debido a que estas partículas de VAA se parecen estrechamente entre sí con respecto a las características fisicoquímicas (por ejemplo, tamaño de partícula, y topología molecular de superficie de partícula y distribución de carga electrostática) que se aprovechan normalmente para lograr la purificación de moléculas biológicas en etapas de procedimiento escalable.

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la práctica de la presente invención.

Por "vector" quiere decirse cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que puede replicarse cuando se asocia con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias génicas entre células. Por tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

Por un "vector de VAA" quiere decirse un vector derivado de un serotipo de virus adenoasociado, incluyendo sin limitación, VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7 y VAA-8. Los vectores de VAA pueden presentar uno o más de los genes de tipo natural de VAA delecionados en su totalidad o en parte, preferentemente los genes rep y/o cap, pero conservan secuencias de ITR flanqueantes funcionales. Las secuencias de ITR funcionales son necesarias para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de VAA. Por tanto, un vector de VAA se define en la presente memoria que incluye por lo menos las secuencias requeridas en cis para la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, ITR funcionales) del virus. No es necesario que las ITR sean las secuencias de nucleótidos de tipo natural, y pueden alterarse, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, siempre que las secuencias proporcionen rescate, replicación y empaquetamiento funcionales. Además por un "vector de VAA" quiere decirse la cubierta o cápside de proteína, que proporciona un vehículo eficaz para la administración de ácido nucleico de vector al núcleo de células diana.

"Funciones auxiliares de VAA" se refieren a secuencias codificantes derivadas de VAA que pueden expresarse para proporcionar productos génicos de VAA que, a su vez, funcionan en trans para replicación de VAA productiva. Por tanto, las funciones auxiliares de VAA incluyen ambos marcos de lectura abiertos de VAA principales (ORF), rep y cap. Los productos de expresión Rep han demostrado poseer muchas funciones, incluyendo, entre otras: reconocimiento, unión y mellado del origen de VAA de la replicación de ADN; actividad ADN helicasa; y modulación de la transcripción de promotores de VAA (u otros heterólogos). Los productos de expresión Cap suministran funciones de empaquetamiento necesarias. Se utilizan funciones auxiliares de VAA en la presente memoria para complementar funciones de VAA en trans que faltan de vectores de VAA.

El término "constructo auxiliar de VAA" se refiere generalmente a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones de VAA delecionadas de un vector de VAA que va a utilizarse para producir un vector de transducción para el suministro de una secuencia de nucleótidos de interés. Los constructos auxiliares de VAA se utilizan comúnmente para proporcionar una expresión transitoria de los genes rep y/o cap de VAA para complementar funciones de VAA ausentes que son necesarias para la replicación de VAA; sin embargo, los constructos auxiliares carecen de ITR de VAA y no pueden ni replicarse ni empaquetarse por sí mismos. Los constructos auxiliares de VAA pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varios constructos auxiliares de VAA, tales como los plásmidos comúnmente utilizados pAAV/Ad y pIM29+45 que codifican para tanto los productos de expresión Rep como Cap. Véanse, por ejemplo, Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; y McCarty *et al.* (1991) *J. Virol.* 65:2936-2945. Se han descrito varios otros vectores que codifican para productos de expresión tanto Rep como/o Cap. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.ºs 5.139.941 y 6.376.237.

El término "impurezas relacionadas con el vector" se refiere a todos los tipos de partículas de VAA distintas de partículas de VAA recombinantes genuinas. Las impurezas relacionadas con el vector incluyen cápsides de VAA vacías (también denominadas "vacías", o "partículas vacías", y partículas de VAA que contienen secuencias de polinucleótido distintas del genoma de vector previsto (también denominados "impurezas de ácido nucleico de encapsidadas en VAA" o "impurezas de ADN encapsidadas en VAA").

El término "funciones accesorias" se refiere a funciones virales y/o celulares no derivadas de VAA de las que VAA depende para su replicación. Por tanto, el término refleja proteínas y ARN que se requieren en la replicación de VAA, incluyendo aquellos restos implicados en la activación de la transcripción génica de VAA, corte y empalme de ARNm de VAA específico de fase, replicación de ADN de VAA, síntesis de los productos de expresión Cap y ensamblaje de cápsides de VAA. Pueden derivarse funciones accesorias basadas en virus de

cualquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, virus del herpes (distintos de virus del herpes simple tipo-1) y virus vaccinia.”

El término “vector de función accesoria” se refiere generalmente a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones accesorias. Un vector de función accesoria puede transfectarse dentro de una célula huésped adecuada, en la que el vector puede entonces soportar la producción de viriones de VAA en la célula huésped. Se excluyen expresamente del término partículas virales infecciosas tal como existen en la naturaleza, tales como partículas de adenovirus, virus del herpes o virus vaccinia. Por tanto, los vectores de función accesoria pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón o cósmido. En particular, se ha demostrado que el complemento completo de genes de adenovirus no se requiere para funciones auxiliares accesorias. Por ejemplo, se ha demostrado que mutantes de adenovirus que no pueden realizar replicación de ADN y síntesis génica tardía son permisivos para la replicación de VAA. Ito *et al.*, (1970) J. Gen. Virol. 9:243; Ishibashi *et al.*, (1971) Virology 45:317. De manera similar, se ha demostrado que mutantes dentro de las regiones E2B y E3 soportan la replicación de VAA, lo que indica que las regiones E2B y E3 no están implicadas probablemente en la proporción de funciones accesorias. Carter *et al.*, (1983) Virology 126:505. Sin embargo, los adenovirus defectuosos en la región E1, o que presentan una región E4 delecionada, no puede soportar la replicación de VAA. Por tanto, las regiones E1A y E4 se requieren probablemente para la replicación de VAA, o bien directamente o bien indirectamente. Laughlin *et al.*, (1982) J. Virol. 41:868; Janik *et al.*, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1925; Carter *et al.*, (1983) Virology 126:505. Otros mutantes de Ad caracterizados incluyen: E1B (Laughlin *et al.*, (1982), citado anteriormente; Janik *et al.*, (1981), citado anteriormente; Ostrove *et al.*, (1980) Virology 104:502); E2A (Handa *et al.*, (1975) J. Gen. Virol. 29:239; Strauss *et al.*, (1976) J. Virol. 17:140; Myers *et al.*, (1980) J. Virol. 35:665; Jay *et al.*, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2927; Myers *et al.*, (1981) J. Biol. Chem. 256:567); E2B (Carter, Adeno-Associated Virus Helper Functions, en I CRC Handbook of Parvoviruses (P. Tijssen ed., 1990)); E3 (Carter *et al.*, (1983), citado anteriormente); y E4 (Carter *et al.*, (1983), citado anteriormente; Carter (1995)). Aunque los estudios de las funciones accesorias proporcionadas por adenovirus que presentan mutaciones en la región codificante E1B han producido resultados conflictivos, Samulski *et al.*, (1988) J. Virol. 62:206-210, notificaron recientemente que se requiere E1B55k para la producción de viriones de VAA, mientras que no se requiere E1B19k. Además, la publicación internacional WO 97/17458 y Matshushita *et al.*, (1998) Gene Therapy 5:938-945, describen vectores de función accesoria que codifican para diversos genes de Ad. Los vectores de función accesoria particularmente preferidos comprenden una región codificante de ARN VA de adenovirus, una región codificante de ORF6 E4 de adenovirus, una región codificante E2A de adenovirus de 72 kD, una región codificante E1A de adenovirus y una región E1B de adenovirus que carece de una región codificante E1B55k intacta. Tales vectores se describen en la publicación internacional n.º WO 01/83797.

Por “virus recombinante” quiere decirse un virus que se ha alterado genéticamente, por ejemplo, mediante la adición o inserción de un constructo de ácido nucleico heterólogo en la partícula.

Por “virión de VAA” quiere decirse una partícula de virus completo, tal como una partícula de virus VAA de tipo natural (wt) (que comprende un genoma de ácido nucleico de VAA lineal, monocatenario asociado con una cubierta de proteína de cápside de VAA). En este aspecto, las moléculas de ácido nucleico de VAA monocatenario de cualquier sentido complementario, por ejemplo, hebras “sentido” o “antisentido”, pueden empaquetarse en cualquier virión de VAA y ambas hebras son igualmente infecciosas.”

Los términos “virión de VAA recombinante”, “virión de VAAr”, “partícula de vector de VAA”, “cápsides completas” y “partículas completas” se definen en la presente memoria como un virus infeccioso de replicación defectuosa que incluye una cubierta de proteína de VAA, que encapsida una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés que está flanqueada en ambos lados por ITR de VAA. Se produce un virión de VAAr en una célula huésped adecuada que ha presentado secuencias que especifican un vector de VAA, funciones auxiliares de VAA y funciones accesorias introducidos en la misma. De esta manera, se hace que la célula huésped pueda codificar para polipéptidos de VAA que se requieren para el empaquetamiento del vector de VAA (que contiene una secuencia de nucleótidos recombinante de interés) en partículas de virión recombinante infecciosas para posterior suministro de genes.

Los términos “cápside vacía” y “partícula vacía”, se refieren a un virión de VAA que incluye una cubierta de proteína de VAA pero que carece en su totalidad o en parte del constructo de polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos heteróloga de interés flanqueada en ambos lados por ITR de VAA. Por consiguiente, la cápside vacía no funciona para transferir el gen de interés a la célula huésped.

El término “célula huésped” denota, por ejemplo, microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero, que pueden utilizarse, o se han utilizado, como receptores de un constructo auxiliar de VAA, un plásmido de vector de VAA, un vector de función accesoria u otro ADN de transferencia. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Por tanto, una “célula huésped” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere generalmente a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente idéntica completamente en morfología o en complemento de ADN genómico o total al progenitor original, debido a

mutación natural, accidental o deliberada.

El término “transfección” se utiliza para referirse a la captación de ADN foráneo por una célula, y se ha “transfectado” una célula cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. La materia se conocen generalmente varias técnicas de transfección. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.* (1973) *Virology*, 52: 456, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis *et al.* (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu *et al.* (1981) *Gene* 13:197. Tales técnicas pueden utilizarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “línea celular” se refiere a una población de células que puede crecer y dividirse de manera continua o prolongada *in vitro*. A menudo, las líneas celulares son poblaciones clonadas derivadas de una única célula progenitora. Se sabe además la materia que pueden producirse cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de tales poblaciones clonadas. Por tanto, las células derivadas de la línea celular a la que se hace referencia pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular a la que se hace referencia incluye tales variantes.

Un reserva o preparación de viriones de VAAr que comprende partículas de vector de VAA (genomas empaquetados) está “sustancialmente libre de” cápsides vacías de VAA cuando por lo menos aproximadamente el 50%-99% o más de los viriones presentes en la reserva son viriones de VAAr con genomas empaquetados (es decir, partículas de vector de VAA). Preferentemente, las partículas de vector de VAA comprenden por lo menos de aproximadamente el 75% al 85%, más preferentemente el 90% aproximadamente de los viriones presentes en la reserva, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente el 95%, o incluso el 99% o más en peso de los viriones presentes en la reserva, o cualquier número entero entre estos intervalos. Por tanto, una reserva está sustancialmente libre de cápsides vacías de VAA cuando desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 1% o menos, preferentemente de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 15% o menos, más preferentemente el 10% aproximadamente o menos, incluso más preferentemente de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 1% o menos de la reserva resultante comprende cápsides vacías.

Una reserva o preparación de viriones de VAAr que comprende partículas de vector de VAA (genomas empaquetados) está “sustancialmente libre de” impurezas de ácido nucleico encapsidadas en VAA” cuando por lo menos aproximadamente el 90-99% o más de los viriones presentes en la reserva son viriones de VAAr con genomas genuinos empaquetados (es decir, partículas de vector de VAA). Preferentemente, las partículas de vector de VAA comprenden de por lo menos aproximadamente el 95% al 98%, más preferentemente el 99% aproximadamente de los viriones presentes en la reserva, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente >99% o más en peso de los viriones presentes en la reserva, o cualquier número entero entre estos intervalos. Por tanto, una reserva está sustancialmente libre de Impurezas de ácido nucleico encapsidadas en VAA cuando desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 1% o menos, preferentemente el 2% aproximadamente o menos, más preferentemente el 1% aproximadamente o menos, incluso más preferentemente el 0,5% aproximadamente o menos de la reserva resultante comprende impurezas de ácido nucleico encapsidadas en VAA.

Una secuencia de “ácido nucleico” se refiere a una secuencia de ADN o ARN. El término refleja secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN tales como, pero sin limitarse a 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido buracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

Una “secuencia codificante” o una secuencia que “codifica para” un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) para dar un polipéptido *in vivo* cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' terminal (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' terminal (carboxilo). Una secuencia de terminación de la transcripción puede situarse en 3' con respecto a la secuencia codificante.

El término “secuencias de control” de ADN se refiere en conjunto a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en el sentido de 5', orígenes de replicación, sitios de entrada interna al ribosoma (“IRES”), potenciadores, y similares, que proporcionan en conjunto replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todas

estas secuencias de control han de estar siempre presentes, siempre que la secuencia codificante seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada.

El término "promotor" se utiliza en la presente memoria en su sentido habitual para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en el que la secuencia reguladora se deriva de un gen que puede unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (sentido de 3'). Los promotores de la transcripción pueden incluir "promotores inducibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótido operativamente unida al promotor se induce mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), "promotores reprimibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótido unida operativamente al promotor se induce mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y "promotores constitutivos".

"Operativamente unido" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Por tanto, las secuencias de control operativamente unidas a una secuencia codificante pueden efectuar la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de control no han de ser contiguas con la secuencia codificante, siempre que funcionen dirigiendo la expresión de la misma. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero sí transcritas entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede aún considerarse "operativamente unida" a la secuencia codificante.

Con el fin de describir la posición relativa de secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular en toda la presente solicitud, tal como cuando una secuencia de nucleótidos particular se describe como situada "aguas arriba", "aguas abajo", "en 3'", o "en 5'" en relación a otra secuencia, debe entenderse que es la posición de las secuencias en la hebra "sentido" o "codificante" de una molécula de ADN a la que se hace referencia como convencional la materia.

El término "heterólogo" como tal se refiere a secuencias de ácido nucleico tales como secuencia codificantes y secuencias de control, denota secuencias que no están normalmente unidas juntas, y/o no están normalmente asociadas con una célula particular. Por tanto, una región "heteróloga" de un constructo de ácido nucleico o un vector es un segmento de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de un constructo de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias no encontradas en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es un constructo en el que la secuencia codificante en sí no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que presentan codones diferentes del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con un constructo que no está normalmente presente en la célula se consideraría heterólogo para los fines de esta invención. La variación alélica o acontecimientos mutacionales que se producen de manera natural no dan lugar a ADN heterólogo, tal como se utiliza en la presente memoria.

El transgén que comprende el ácido nucleico heterólogo puede codificar para varios productos útiles. Estos pueden incluir ARNip, moléculas antisentido y miARN, por ejemplo. Alternativamente, los transgenes pueden codificar para hormonas y factores de crecimiento y diferenciación incluyendo, sin limitación, insulina, glucagón, hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de la hormona del crecimiento (GRF), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α ($TGF\alpha$), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), uno cualquiera de la superfamilia de factor de crecimiento transformante β , incluyendo $TGF\beta$, activinas, inhibinas, o cualquiera de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) BMP 1-15, uno cualquiera de la familia de heregulina/neuregulina/ARIA/factor de diferenciación neu (NDF) de factores de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado líneas celulares gliales (GDNF), neurturina, agrina, uno cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrinas-1 y netrinas-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, Sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa.

Otros productos de transgenes útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario incluyendo, sin limitación, citocinas y linfocinas tales como trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL) IL-1 a IL-17, proteína quimiotáctica de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores de necrosis tumoral α y β , interferones α , β y γ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles en la invención. Estos incluyen, sin limitaciones, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, receptores de células T, receptores de células T quiméricos, receptores de células T de cadena sencilla, moléculas de CMH de clase I y clase II, así como inmunoglobulinas y moléculas de CMH modificadas por ingeniería genética. Los productos génicos útiles también

incluyen proteínas reguladoras tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína de cofactor de membrana (MCP), factor acelerante de la descomposición (DAF), CR1, CF2 y CD59.

5 Otros productos génicos útiles incluyen aquellos que pueden corregir errores congénitos del metabolismo. Tales transgenes pueden codificar para, por ejemplo, carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor V, factor VIII, factor IX, cistationina beta-sintasa, cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metilmalonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa cinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia de regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y una secuencia de ADNc de distrofina.

15 Por "aislado" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos, quiere decirse que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Por tanto, una "molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un polipéptido particular" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican para el polipéptido objeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases adicionales o restos que no afectan perjudicialmente a las características básicas de la composición.

20 La presente invención implica reducir el número de, o eliminar, impurezas relacionadas con el vector de VAA (por ejemplo, cápsides vacías e impurezas de ácido nucleico encapsidadas en VAA) contenidas dentro de reservas purificadas de viriones de VAA, con pérdida mínima de partículas de vector de VAA contenidas en las mismas. Los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse independientemente del procedimiento en el que se generan viriones de VAAr.

25 Hay varios procedimientos que se conocen bien la materia para generar viriones de VAAr: por ejemplo, transfección utilizando vector y secuencias auxiliares de VAA junto con coinfección con uno de los virus auxiliares de VAA (por ejemplo, adenovirus, virus del herpes o virus vaccinia) o transfección con un vector de VAA recombinante, un vector auxiliar de VAA y un vector de función accesoria. Para descripciones detalladas de procedimientos para generar viriones de VAAr, véanse las patentes U.S. n.^{os} 6.001.650 y 6.004.797.

Purificación de viriones de VAAr

35 Tras la replicación de VAA recombinante (es decir, generación de vectores en sistemas de cultivo celular), los viriones de VAAr pueden purificarse de la célula huésped utilizando una variedad de procedimientos de purificación convencionales, tales como cromatografía en columna, gradientes de CsCl, y similares. Por ejemplo, puede utilizarse una pluralidad de etapas de purificación en columna, tal como purificación sobre una columna de intercambio aniónico, una columna de afinidad y/o una columna de intercambio catiónico. Véase, por ejemplo, la publicación internacional n.^o WO 02/12455. Además, si se emplea infección para expresar las funciones accesorias, puede inactivarse un virus auxiliar residual, utilizando procedimientos conocidos. Por ejemplo, puede inactivarse un adenovirus calentando hasta temperaturas de aproximadamente 60°C durante, por ejemplo, 20 minutos o más. Este tratamiento inactiva eficazmente sólo el virus auxiliar puesto que VAA es extremadamente termoestable mientras que el adenovirus auxiliar es termolábil.

45 Pueden utilizarse vectores de VAA recombinante que contienen cualquier número de los genes indicadores para determinar títulos infecciosos. Por ejemplo, puede utilizarse alcalina fosfatasa, beta-galactosidasa (LacZ), proteína fluorescente verde o luciferasa. Tras recolectar la célula huésped transfectada, se forma un lisado rompiendo las células huésped transfectadas utilizando técnicas adecuadas para producción a gran escala, tales como microfluidización. El lisado se filtra entonces (por ejemplo, a través de un filtro de 0,45 µm), y se purificó utilizando procedimientos cromatográficos en columna tal como se describe en la presente memoria. También se han notificado otras técnicas para determinar el título infeccioso de cualquier vector de VAA. Véase, por ejemplo, Zhen *et al.*, "An Infectious Titer Assay for Adeno-associated Virus (VAA) Vectors with Sensitivity Sufficient to Detect Single Infectious Events." Hum. Gene Ther. (2004) 15:709-715. El lisado celular clarificado se somete a una o más etapas de procedimiento de purificación para purificar partículas de VAA (incluyendo vectores genuinos e impurezas relacionadas con el vector) utilizando técnicas de cromatografía en columna. En procedimientos preferidos, las partículas de VAA se purifican utilizando una o más etapas secuenciales que implican cromatografía de intercambio catiónico y/o aniónico. En un procedimiento particularmente preferido de la invención, se obtienen preparaciones de VAAr lisando células transfectadas para obtener un lisado celular en bruto mediante procedimientos fácilmente escalables. El lisado celular en bruto puede entonces clarificarse para eliminar residuos celulares mediante técnicas bien conocidas la materia, tales como filtración, centrifugación y similares, para dar un lisado celular clarificado. El lisado celular en bruto o lisado celular clarificado, que contiene ambas partículas de VAA (vectores de VAA genuinos, cápsides vacías de VAA e impurezas relacionadas con el vector de VAA) y una gama de impurezas no relacionadas con el vector de VAA, por ejemplo, componentes celulares solubles de la célula huésped infectada. Estos pueden incluir proteínas, lípidos y/o ácidos nucleicos no deseables, y componentes del medio de cultivo celular (por ejemplo, suero bovino). El lisado se aplica a una primera columna de intercambio catiónico. La primera columna de intercambio catiónico funciona separando

adicionalmente las partículas de VAA de componentes celulares y otros presentes en la preparación de lisado celular. Se conocen procedimientos para realizar la purificación inicial del lisado celular. Un procedimiento representativo se describe en la patente U.S. n.º 6.593.123.

5 La utilización de cromatografía en columna puede lograr una purificación eficaz de partículas de VAA de la mayoría de las demás impurezas presentes en la cosecha en bruto tras la generación de vectores de VAA recombinantes en cultivo celular. Por ejemplo, pueden utilizarse una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico en secuencia para separar progresivamente partículas de VAA de impurezas. Pueden utilizarse resinas de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, y otros tipos de resinas de cromatografía, en diversas combinaciones, siendo óptimas combinaciones variables según el serotipo de VAA específico de interés. Pueden utilizarse las siguientes resinas de cromatografía en una única etapa de cromatografía para la purificación de los siguientes serotipos de VAA recombinante:

Resina	Información de pedidos	Referencia	Serotipo de VAA
Poros 50HS	Applied Biosystems, PN 1-3359-07	http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm/support/documents/generaldocuments/cms041648.pdf	VAA2 VAA6
Poros 50HQ	Applied Biosystems, PN 1-2559-07	http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm/support/documents/generaldocuments/cms041639.pdf	VAA1 VAA8
Poros 50PI	Applied Biosystems, PN 1-2459-07	http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm/support/documents/generaldocuments/cms041639.pdf	VAA5
CHT, hidroxapatita cerámica	BioRad PN 1570041	http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/psd/literature/LIT611E.PDF	VAA9

15 En algún caso, pueden ser útiles dos o más etapas de cromatografía secuenciales para lograr una pureza de partículas de VAA mayor y garantizar la eliminación de contaminantes virales accidentales, un requisito para la fabricación de VAA recombinante para su utilización en sujetos humanos para tratar enfermedades. Las etapas de cromatografía secuenciales pueden utilizar diferentes resinas realizadas secuencialmente en órdenes variables, optimizadas para diferentes serotipos de VAA recombinante. Por ejemplo, una purificación de partículas de vector lograda mediante dos etapas de cromatografía secuenciales puede emplear el siguiente formato:

Primera etapa	Anión	Anión	Catión	Catión
Segunda etapa	Anión	Catión	Catión	Catión

25 Los intercambiadores catiónicos adecuados para tanto la primera columna de intercambio catiónico como la segunda columna de intercambio catiónico, si se utilizan, incluyen una amplia variedad de materiales conocidos la materia. Se prefieren particularmente intercambiadores catiónicos fuertes que pueden unirse a viriones de VAAr a lo largo de un amplio intervalo de pH. Por ejemplo, las matrices de intercambio catiónico carboximetiladas y sulfonatadas son particularmente útiles para su utilización en la presente memoria. Los materiales de matriz útiles incluyen pero no se limitan a, matrices de celulosa, tales como matrices fibrosas, microgranulares y en perlas; agarosa, dextrano, poliacrilato, polivinilo, poliestireno, matrices de sílice y poliéter; y materiales compuestos. Se prefieren particularmente en la presente memoria matrices que contienen el ligando funcional R-SO₃⁻, preferentemente resinas de sulfopropilo o sulfoetilo. Las matrices representativas incluyen pero no se limitan a POROS HS, POROS SP, POROS S (todas intercambiadores catiónicos fuertes disponibles de Applied Biosystems, Foster City, Calif.), POROS CM (intercambiador catiónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, Calif.), TOSOHAAS TOYOPEARL SP550C y MERCK FRACTOGEL EMD SO₃-650(m), así como SOURCE 15S, SOURCE 30S, SEPHAROSE SP FF, SEPHAROSE SP XL (todas disponibles de Amersham Bioscience, Piscataway, N.J.).

40 Para todos los protocolos de cromatografía en columna facilitados a continuación, pueden prepararse columnas utilizando protocolos convencionales conocidos la materia con las disoluciones tampón adecuadas. Entonces se carga la muestra. Para la primera columna de intercambio catiónico utilizada, las condiciones son tales que todas las partículas de VAA se unen a la resina de la columna y se eluyen posteriormente juntas, pero se separan de otros componentes y residuos celulares presentes en el lisado celular. Por ejemplo, se eluyen partículas de VAA utilizando un tampón de concentración iónica apropiada. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de sodio 10-50 mM, preferentemente 15-40, tal como sal que contiene fosfato de sodio 15,20, 25, 30, 35, 40, etc. mM, tal como NaCl o KCl, a una concentración de, por ejemplo, 100-700 mM, tal como 200-400 mM, por ejemplo, 200, 300, 325, 350, 370, 380, 400, etc., o cualquier concentración dentro de estos intervalos. El pH del tampón puede ser desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 9,5, tal como 4-8, por ejemplo, pH 4, 4,5, 5, 5,5, 6, etc., o cualquier pH dentro de estos intervalos. Las fracciones se recogen y luego pueden ejecutarse o bien en una columna de intercambio aniónico y/o bien en una segunda columna de intercambio catiónico en condiciones de separación.

Si se utiliza una segunda columna de intercambio catiónico para purificar adicionalmente partículas de VAA en una etapa posterior, pueden utilizarse dos tampones de elución, un tampón bajo en sal y un tampón alto en sal. En particular, se separan impurezas adicionales de partículas de VAA utilizando un tampón apropiado a un pH de desde aproximadamente pH 6 hasta pH 12, preferentemente de pH 7 a pH 10, e incluso más preferentemente de pH 7,5 a pH 9,5, tal como pH 7,5, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, o cualquier pH entre los intervalos indicados. Los tampones apropiados se conocen bien la materia e incluyen, sin limitación, tampones con los siguientes iones de tampón: ácido acético; ácido malónico; MES; fosfato; HEPES, BICINE, y similares. Para eluir la muestra, la concentración iónica del tampón de partida se aumenta utilizando una sal, tal como NaCl, KCl, sulfato de amoníaco o cualquier otra sal que contiene sulfato, formiato, acetato, citrato y/o fosfato. En una forma de realización de la invención, la columna se trata en primer lugar con una concentración baja en sal, por ejemplo, 10-200 mM de acetato de amonio, tal como 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65-100 mM, o cualquier concentración dentro de estos intervalos. Este tratamiento da como resultado elución de partículas de vector de VAA de la resina de la columna. Posteriormente, la columna se trata con una concentración en sal mayor con el fin de eluir cápsidas vacías de VAA. Un ejemplo para su utilización como segundo tampón es acetato de amonio con una concentración de 100-800 mM, preferentemente 500-700 mM, tal como 500, 550, 600, 650, 700, 800 mM, o cualquier concentración dentro de estos intervalos indicados. Utilizando estas condiciones, las partículas de vector de VAA eluyen en las fracciones tempranas y las partículas vacías posteriormente.

Tal como se explicó anteriormente, en un procedimiento alternativo de la invención, la preparación de la primera columna de intercambio catiónico se aplica a una columna de intercambio aniónico o bien en lugar de o bien además de la segunda columna de intercambio catiónico. Si una columna de intercambio aniónico se utiliza además de la segunda columna de intercambio catiónico, puede utilizarse o bien antes o bien después de la segunda columna de intercambio catiónico. Además, puede utilizarse una segunda columna de intercambio aniónico después de la primera columna de intercambio aniónico. Se conocen varios intercambiadores aniónicos adecuados para su utilización con la presente invención e incluyen sin limitación, MACRO PREP Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de BioRad, Hercules, Calif.); UNOSPHERE Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de BioRad, Hercules, Calif.); POROS 50HQ (intercambiador aniónico fuerte disponible de Applied Biosystems, Foster City, Calif.); POROS 50D (intercambiador aniónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, Calif.); POROS 50PI (intercambiador aniónico débil disponible de Applied Biosystems, Foster City, Calif.); SOURCE 30Q (intercambiador aniónico fuerte disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.); DEAE SEPHAROSE (intercambiador aniónico débil disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.); Q SEPHAROSE (intercambiador aniónico fuerte disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.).

La columna de intercambio aniónico se equilibra en primer lugar utilizando tampones convencionales y según las especificaciones del fabricante. Por ejemplo, la columna puede equilibrarse con, por ejemplo, un tampón fosfato de sodio de 5 a 50 mM, preferentemente 7-20 mM, tal como 10 mM. Entonces se carga la muestra y se utilizan dos tampones de elución, un tampón bajo en sal y un tampón alto en sal. Las fracciones se recogen tras cada uno de los lavados bajos en sal y altos en sal y se detecta proteína en las fracciones utilizando técnicas convencionales, tales como monitorización de la absorción UV a 260 y 280 nm. Utilizando un intercambiador aniónico, los picos de proteína del eluato de sal inferior contienen cápsidas vacías de VAA y las fracciones de sal superior contienen partículas de vector de VAA.

En particular, en la columna de intercambio aniónico, pueden purificarse además partículas de VAA utilizando un tampón apropiado a un pH de desde aproximadamente pH 5 hasta pH 12, preferentemente de pH 6 a pH 10, e incluso más preferentemente de pH 7 a pH 9,5, tal como pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 - 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5 - 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, o cualquier pH entre los intervalos indicados. Los tampones apropiados para su utilización con las columnas de intercambio aniónico se conocen bien la materia y son generalmente de naturaleza catiónica o zwitteriónica. Tales tampones incluyen, sin limitación, tampones con los siguientes iones de tampón: N-metilpiperazina; piperazina; Bis-Tris; Bis-Tris propano; trietanolamina; Tris; N-metildietanolamina; 1,3-diaminopropano; etanolamina; ácido acético, y similares. Para eluir la muestra, la concentración iónica del tampón de partida se aumenta utilizando una sal, tal como NaCl, KCl, sulfato, formiato o acetato, a un pH apropiado.

En una forma de realización de la invención, la columna de intercambio aniónico se trata en primer lugar con una concentración baja en sal, por ejemplo, 10-100 mM de NaCl, tal como 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 - 100 mM, o cualquier concentración dentro de estos intervalos. Tras el tratamiento inicial, la columna se trata entonces con una concentración en sal mayor con el fin de eluir impurezas, tal como una concentración de NaCl mayor, o con otro tampón con una mayor concentración iónica. Un ejemplo para su utilización como segundo tampón es un tampón acetato de sodio o un tampón a base de Tris con una concentración de 100-300 mM, preferentemente de 125-200 mM, tal como 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 mM, o cualquier concentración dentro de estos intervalos establecidos. Después de que se eluyan las impurezas adicionales de la columna, las partículas de VAA pueden recuperarse utilizando una concentración de sal mayor. Un ejemplo para su utilización como tampón de elución es tampón Tris 10 mM que contiene acetato de sodio a una concentración en el intervalo de 100-500 mM, preferentemente 130-300 mM, tal como 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400,

450, 500 mM, o cualquier concentración dentro de estos intervalos indicados.

La utilización de resinas de cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, la naturaleza de las resinas utilizadas (es decir, intercambiadores iónicos fuertes o débiles) y las condiciones de la concentración de sal, tampón utilizado y pH, variarán según la variante de cápside de VAA (es decir, serotipo o pseudotipo de cápside de VAA). Aunque las variantes de cápside de VAA conocidas comparten características tales como tamaño y forma, difieren en pequeños detalles de topología molecular y distribución de carga superficial. Por tanto, aunque todas las variantes de cápside se espera que sean susceptibles a purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, y pueden determinarse procedimientos relevantes de manera sistemática utilizando resina de cromatografía y experimentos de selección de tampón, se requerirán diferentes condiciones para cada variante de cápside de VAA para lograr una purificación de partículas de VAA eficaz. Tales condiciones son fácilmente evidentes para el experto en la materia.

Las etapas de cromatografía en columna son muy adecuadas para purificar eficazmente especies moleculares que comparten una forma molecular común y similar distribución de carga fuera de otras especies (por ejemplo impurezas) que presentan diferentes formas moleculares y distribuciones de carga. En el caso de vectores de VAA recombinantes, que se producen en un sistema de cultivo celular de producción, una característica conocida de la cosecha biosintética en bruto es que están presentes en el mismo numerosos tipos de partículas de VAA. Estas partículas diversas incluyen vector de VAA genuino (es decir, una cápside de vector que contiene el fragmento de ADN previsto en el interior); cápsides vacías (es decir, una cápside de vector sin nada dentro), y otras impurezas relacionadas con el vector (por ejemplo, cápsides de vector con otros fragmentos (no deseados) de ADN en el interior. Además de estas partículas de VAA diversas (es decir, vectores genuinos e impurezas relacionadas con el vector), otros tipos de impurezas (por ejemplo, proteínas, lípidos y/o ácido nucleico de la célula huésped y/o componentes del medio de cultivo celular) están presentes en abundancia. La cromatografía en columna es especialmente muy adecuada para purificar partículas de VAA de las impurezas no deseadas. La ultracentrifugación en gradiente, aunque es difícil de realizar con grandes volúmenes de material, es adecuada para separar la mayoría de impurezas relacionadas con el vector de VAA de vectores de VAA genuinos, basándose en diferencias en las densidades de estas partículas respectivas. La ultracentrifugación en gradiente se ha considerado hasta la fecha generalmente no escalable, y por tanto, hasta ahora, no una etapa del procedimiento de fabricación apropiada para su utilización en procedimientos de fabricación a gran escala. Esta no escalabilidad percibida de la etapa de ultracentrifugación en gradiente etapa se debe en parte al requisito en la técnica de procesar volúmenes relativamente grandes de material para recuperar cantidades relativamente pequeñas de VAA recombinante. Sin embargo, las partículas de VAA que ya se han purificado mediante una o más etapas de cromatografía en columna tal como se describió anteriormente, pueden concentrarse eficazmente mediante filtración de flujo tangencial, por ejemplo, utilizando una membrana de fibra hueca con un tamaño de poro nominal correspondiente a un punto corte de peso molecular de 100 kDa, hasta una alta concentración de modo que pueden prepararse grandes cantidades de vector en una única tanda de ultracentrifugación convencional, que puede tratar aproximadamente 400 ml de disolución que contiene partículas de vector purificadas. Por ejemplo, las partículas de VAA purificadas por cromatografía que contienen el 10% de vectores de VAA genuinos (y, por tanto, el 90% de las impurezas relacionadas con el vector tales como cápsides vacías) pueden concentrarse hasta 10^{14} partículas por ml (que contienen 10^{13} partículas de vector de VAA por ml y 9×10^{13} partículas por ml de impurezas relacionadas con el vector), pueden procesarse en una única tanda de ultracentrifugación, por ejemplo, ~ 400 ml por lote utilizando un rotor Ti50 de Beckman, lo que da como resultado aproximadamente 4×10^{15} partículas de vector de VAA genuinos (10^{13} vg/ml \times 400 ml = 4×10^{15} vg). Este rendimiento de vector de VAA es suficiente para proporcionar muchas dosis para muchas aplicaciones clínicas, logrando una separación eficaz de las partículas de vector de VAA de la mayoría de las impurezas relacionadas con el vector de VAA. Para aplicaciones clínicas que requieren dosis superiores de vector, las partículas de VAA purificadas que contienen el 10% de vectores de VAA genuinos pueden concentrarse hasta 10^{15} partículas por ml mediante filtración de flujo tangencial (TFF), y pueden entonces procesarse en una única tanda de ultracentrifugación para dar como resultado aproximadamente 4×10^{16} genomas de vector (vectores de VAA genuinos). Para otras aplicaciones clínicas que requieren incluso mayores dosis de vector, las partículas de VAA purificadas que contienen el 10% de vectores de VAA genuinos pueden concentrarse hasta 10^{16} partículas por ml mediante TFF, y pueden entonces procesarse en una única tanda de ultracentrifugación para dar como resultado aproximadamente 4×10^{17} genomas de vector (vectores de VAA genuinos). Una concentración de partículas de VAA purificadas hasta 10^{16} partículas por ml es factible. Esto se corresponde con una concentración de masa de aproximadamente 100 miligramos por mililitro, una concentración que puede lograrse para otras moléculas biológicas purificadas tales como anticuerpos monoclonales. Tales altas concentraciones requieren una atención apropiada a la formulación para evitar problemas de estabilidad no deseados tales como agregación (Wright *et al*, 2005). La combinación nueva de purificación de partículas de VAA a partir de lisados de células huésped clarificados mediante cromatografía en columna, concentración (si fuera necesario) de partículas de VAA purificadas mediante etapas de fabricación escalables conocidas tales como filtración de flujo tangencial, combinadas con ultracentrifugación en gradiente isopícnico proporciona grandes cantidades de vector de VAA recombinante altamente purificado. La utilización de ultracentrifugación en gradiente proporciona mayor flexibilidad (por ejemplo, aplicabilidad a vectores derivados de diversos serotipos de VAA) y pureza (por ejemplo, eliminación eficaz de impurezas relacionadas con el vector), consideraciones críticas para la eficacia de coste y eficacia a largo plazo en aplicaciones clínicas humanas. La combinación de cromatografía en columna y filtración

de flujo tangencial eficaces, ambas fácilmente escalables, etapas de procedimientos de fabricación convencionales en la industria farmacéutica, hace que la posterior etapa de ultracentrifugación en gradiente de densidad sea escalable. La combinación nueva de estas etapas, realizadas tal como se señaló anteriormente, proporciona una plataforma de purificación generalmente aplicable a todas las variantes de cápside de VAA que es flexible, escalable y, críticamente, proporciona una pureza suficientemente alta (es decir, ausencia de impurezas generales así como impurezas relacionadas con el vector) para potenciar significativamente la eficacia de transferencia génica y minimizar la probabilidad de respuestas inmunitarias del huésped que limitan la eficacia tras la administración a sujetos humanos para terapia génica.

Se conocen la materia procedimientos para someter a ensayo cápsides vacías y partículas de vector de VAA con genomas empaquetados. Véanse, por ejemplo, Grimm *et al.*, Gene therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer *et al.*, Molec. Ther. (2003) 7:122-128. Para someter a prueba la cápside desnaturalizada, los procedimientos incluyen someter la reserva de VAA tratada a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, que consiste en cualquier gel que pueda separar las tres proteínas de la cápside, por ejemplo, un gel en gradiente que contiene Tris-acetato al 3-8% en el tampón, luego ejecutar el gel hasta que el material de la muestra se separa y someter a inmunotransferencia el gel sobre membranas de nailon o nitrocelulosa, preferentemente nailon. Se utilizan entonces anticuerpos anti-cápside de VAA como anticuerpos primarios que se unen a proteínas de la cápside desnaturalizadas, preferentemente un anticuerpo monoclonal anti-cápside de VAA, lo más preferentemente el anticuerpo monoclonal anti-VAA-2 B1 (Wobus *et al.*, J. Virol. (2000) 74:9281-9293). Se utiliza entonces un anticuerpo secundario, uno que se une al anticuerpo primario y contiene un medio para detectar la unión con el anticuerpo primario, más preferentemente un anticuerpo anti-IgG que contiene una molécula de detección covalentemente unida al mismo, lo más preferentemente un anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón covalentemente unido a peroxidasa del rábano. Se utiliza un procedimiento para detectar la unión para determinar semicuantitativamente la unión entre los anticuerpos primario y secundario, preferentemente un procedimiento de detección que pueda detectar emisiones de isótopos radiactivos, radiación electromagnética o cambios colorimétricos, lo más preferentemente un kit de detección de quimioluminiscencia.

Para someter a prueba el título infeccioso, los procedimientos incluyen la siembra de aproximadamente 100.000 células huésped, preferentemente de origen humano, lo más preferentemente células HeLa, en placas tratadas para cultivo tisular, preferentemente placas tratadas para cultivo tisular de 24 pocillos, y se incubaron durante aproximadamente 24 horas tras lo cual se añade adenovirus, preferentemente el serotipo de adenovirus-2, y reserva de VAAr tratada a las células huésped. Se permite que las células huésped, adenovirus y reserva de VAAr se incuben durante 24 horas, tras lo cual se fijan las células huésped, preferentemente con formaldehído y glutaraldehído, y se tiñen con un agente apropiado que detectará el transgén de VAAr expresado; por ejemplo, con VAAr-LacZ, se contempla X-gal como agente de tinción. Otros agentes para los otros genes indicadores se conocen bien la materia. También se conocen la materia procedimientos más generales para determinar los títulos de infectividad de vectores que contienen cualquier transgén. Véase, por ejemplo, Zhen *et al.*, (2004) "An Infectious Titer Assay for Adenoassociated Virus (VAA) Vectors with Sensitivity Sufficient to Detect Single Infectious Events." Hum. Gene Ther. (2004) 15:709-715.

Los vectores basados en virus ofrecen un gran beneficio para la transferencia de genes terapéuticos porque confieren un alto grado de eficacia para la inserción de genes en células diana en relación con procedimientos no virales. Sin embargo, un riesgo inherente cuando se utilizan vectores basados en virus es el potencial de inmunotoxicidad. Se sabe que todos los antígenos virales provocan respuestas inmunitarias de diferentes tipos y de intensidad variable. Por ejemplo, en seres humanos que se exponen a ellos, tales antígenos y células asociadas con estos antígenos se convierten en la diana de funciones efectoras inmunitarias tales como anticuerpos y linfocitos T citotóxicos. Entre los virus conocidos, VAA es uno de los menos inmunogénicos, con el menor potencial de inmunotoxicidad significativa, proporcionando un beneficio reconocido en relación con la administración de vectores de transferencia génica. Sin embargo, la proteína de la cápside de VAA representa todavía una fuente de antígeno viral que puede provocar una respuesta inmunitaria no deseada. Es razonable suponer que la intensidad de la inmunotoxicidad provocada por la proteína de la cápside de VAA en un sujeto humano que recibe un vector de VAA será proporcional a la cantidad de proteína de la cápside de VAA administrada. Por tanto, una dosis superior de cápside de VAA puede correlacionarse con un riesgo superior de inmunotoxicidad significativa. Para garantizar la utilización más segura de tales vectores para su administración a sujetos humanos, la cantidad de proteína de la cápside de VAA asociada con una dosis eficaz de genomas de vector debe minimizarse. Los procedimientos de purificación de vectores de VAA que eliminan eficazmente impurezas relacionadas con el vector, especialmente cápsides vacías de VAA que representan normalmente el 50-90%, y pueden representar >90% de las partículas de VAA generadas en la producción de vectores en cultivo celular típico, reducirán significativamente el riesgo de inmunotoxicidad en un receptor humano. Se notificó que un receptor humano que recibió una dosis (administración hepática) de 2×10^{12} vg/kg (peso corporal total) de vectores de VAA recombinantes que estaban sustancialmente libres de impurezas relacionadas con el vector (es decir, vector esencialmente libre de cápsides vacías) experimentó una inmunotoxicidad significativa, moderada, autolimitativa tal como indicaron las enzimas hepáticas elevadas comenzando aproximadamente 3 semanas tras la administración de vectores (Manno *et al.*, 2006, Nature Medicine). La evaluación apoyó la naturaleza de esta inmunotoxicidad modesta y transitoria era la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de cápside de VAA que eliminaban hepatocitos que expresaban péptidos derivados de cápsides de VAA (Manno *et al.*, 2006,

Nature Medicine). Si la misma dosis de genomas de vector (2×10^{12} vg/kg) de VAA recombinante se preparaba utilizando un procedimiento que no eliminaba sustancialmente impurezas relacionadas con el vector (por ejemplo, aproximadamente el 80% de las partículas de VAA en la preparación de vectores eran cápsides vacías), una preparación de este tipo estaría asociada con una inmunotoxicidad grave aumentada tal como indican las enzimas hepáticas notablemente superiores.

El procedimiento de purificación procedimiento descrito en la presente memoria proporciona vectores con un perfil de seguridad mejorado por medio de la eliminación eficaz de impurezas relacionadas con el vector (tales como cápsides vacías) de una manera que es escalable, es decir, la preparación de grandes cantidades de vectores de VAA de una manera rentable es ahora posible.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas formas de realización de la invención. No pretenden limitar la invención de ningún modo.

15 Ejemplo I

Este procedimiento se ha aumentado a escala para vectores de VAA para seis serotipos de VAA comunes y clínicamente prometedores (VAA1, VAA2, VAA5, VAA6, VAA5 y VAA9). Este procedimiento de purificación parece poder aplicarse a la purificación de vectores basados en la mayoría, si no todos, los serotipos de VAA y variantes de cápside. Para cada serotipo o variante de cápside, los detalles de la cromatografía en columna variarán (es decir, la identidad de la resina de cromatografía y las condiciones particulares de la purificación de partículas de VAA). La tabla a continuación proporciona resinas que se han utilizado satisfactoriamente para lograr la purificación de partículas de VAA en función del serotipo de VAA.

Resina	Información de pedidos	Referencia	Serotipo de VAA
Poros 50HS	Applied Biosystems, PN 1-3359-07	http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm-support/documents/generaldocuments/cms041648.pdf	VAA2 VAA6
Poros 50HQ	Applied Biosystems, PN 1-2559-07	http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm-support/documents/generaldocuments/cms041639.pdf	VAA1 VAA8
Poros 50PI	Applied Biosystems, PN 1-2459-07	http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm-support/documents/generaldocuments/cms041639.pdf	VAA5
CHT, hidroxiapatita cerámica	BioRad PN 1570041	http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/psd/literature/LIT611E.PDF	VAA9

Las condiciones pueden definirse de manera fiable para lograr la captura de partículas de VAA eficaz, la eliminación de la mayoría de las impurezas distintas de vector (es decir, eliminar por lavado impurezas en las condiciones en las que las partículas de VAA permanecen unidas a la resina) y luego elución de partículas de VAA. Tras la recuperación de la(s) etapa(s) de cromatografía, las partículas de VAA purificadas (es decir, vectores de VAA genuinos, cápsides vacías y otras impurezas relacionadas con el vector) pueden concentrarse mediante filtración de flujo tangencial, normalmente hasta una concentración en el intervalo entre 1×10^{12} y 1×10^{16} partículas de VAA por mililitro (correspondiente a de aproximadamente 0,1 a 100 miligramos por mililitro), utilizando tampones de fuerza iónica elevada (Wright *et al* (2005) Mol Therapy) u otras condiciones de tampón según sea necesario para impedir la agregación de partículas. A continuación, se realiza una etapa de ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio a escala de laboratorio, por ejemplo utilizando un rotor Ti50 que contiene 12 tubos conteniendo cada uno ~40 ml. Esta etapa separa eficazmente vectores de VAA genuinos de la mayoría de las impurezas relacionadas con el vector y otras impurezas no relacionadas con el vector. En esta combinación y secuencia de etapas de procedimiento, incluyendo la secuencia central crítica de: 1) cromatografía en columna; 2) concentración mediante filtración de flujo tangencial (utilizada si es necesario para reducir el volumen de eluato de la columna que contiene vector); y 3) ultracentrifugación en gradiente, se logra una purificación de vector escalable, eficaz, ortogonal. Configurada en este orden, se separan de manera rutinaria $> 1 \times 10^{15}$ vectores de VAA altamente purificados de impurezas relacionadas con el vector en una única tanda de ultracentrifugación a escala de laboratorio.

Basándose en una carga de concentración de proteína razonable en cloruro de cesio conjuntamente con la diferencia en densidad entre vectores de VAA genuinos y la mayoría de las impurezas relacionadas con el vector, se predice que pueden separarse eficazmente 4×10^{16} vectores de VAA de impurezas relacionadas con el vector en una única tanda de ultracentrifugación a escala de laboratorio, y por lo menos cantidades 10 veces superiores separadas por tanda utilizando equipo de ultracentrifugación a gran escala. Tal como se utiliza en la presente memoria la fase "vector de VAA genuino" se refiere a vectores que comprenden el transgén de interés que pueden infectar células diana. La frase excluye vectores vacíos, y vectores que carecen de insertos completos o los vectores que contienen ácidos nucleicos de la célula huésped. Por tanto, la etapa de

centrifugación es escalable y no limitativa para la fabricación a escala comercial de muchos productos de vectores de VAA previsibles para tratar enfermedades humanas. Suponiendo la ultracentrifugación a escala de laboratorio (es decir, aproximadamente 400 ml de partículas de VAA purificadas en la columna) y la concentración mediante filtración de flujo tangencial de partículas de VAA purificadas en la columna hasta una concentración de 1×10^{15} partículas de VAA por mililitro (que contienen 1×10^{14} vectores de VAA genuinos por mililitro), podrían prepararse los siguientes números de dosis: 1) suponiendo una dosis de 1×10^{11} vectores de VAA que expresan un transgén para tratar la ceguera administrados al ojo, podrían generarse hasta 400.000 dosis en una única tanda de gradiente; 2) suponiendo una dosis de 1×10^{12} vectores de VAA que expresan un transgén para la enfermedad de Parkinson administrados al SNC, podrían generarse hasta 40.000 dosis en una única tanda de gradiente; 3) suponiendo una dosis de 1×10^{14} vectores de VAA que expresan un transgén para hemofilia, administrados al hígado, podrían generarse hasta 400 dosis en una única tanda en gradiente. Se predice que podrían concentrarse adicionalmente partículas de VAA 10 veces (hasta 10^{16} partículas de VAA por ml, correspondientes a aproximadamente 100 mg/ml, una concentración de material biológico que se logra de manera rutinaria para otras biomoléculas tales como anticuerpos monoclonales) antes de la etapa de ultracentrifugación en gradiente, y que esta concentración alta pero razonablemente alcanzable daría como resultado rendimientos 10 veces superiores de vector genuino a partir de cada tanda de ultracentrifugación convencional (que puede procesar aproximadamente 400 ml por lote), es decir hasta 4×10^{17} genomas de vector. Además, podría esperarse razonablemente que máquinas de ultracentrifugación a mayor escala procesaran volúmenes por lo menos 10 veces más grandes de partículas de VAA concentradas, resultando por lo menos 4×10^{18} genomas de vector (es decir, 4×10^{18} vectores de VAA genuinos, altamente purificados), correspondiendo estos últimos a 40.000 dosis de 1×10^4 genomas de vector por sujeto humano con hemofilia B. Estos cálculos indican que la etapa de ultracentrifugación en cloruro de cesio, cuando se realiza en la plataforma de purificación nueva descrita en la presente memoria, es susceptible fácilmente de aumentarse a escala para cumplir todas las necesidades anticipadas para la fabricación de vectores de VAA. Inesperadamente, por lo menos según la creencia en la industria de bioprocesos convencional actualmente de que la ultracentrifugación en gradiente no es escalable, las etapas de bioprocesamiento nuevas (y de manera importante su orden de realización) indica que la etapa de ultracentrifugación en gradiente no es la etapa limitante en la purificación de vectores de VAA.

Una ventaja del presente procedimiento de purificación en comparación con los procedimientos de purificación de vectores de VAA escalables "convencionales en la industria" utilizados actualmente es su capacidad para lograr una pureza superior por medio de la inclusión de una etapa diseñada para eliminar eficazmente impurezas relacionadas con el producto. Véanse las figuras 1 y 2. La significación clínica de respuestas inmunitarias específicas de cápsides de VAA se ha mostrado en estudios de Manno *et al.* (2006: Nature Med), y la existencia de antígeno de cápside en exceso innecesario abundante (por ejemplo, cápsides vacías de VAA) y ácidos nucleicos encapsidados de VAA potencialmente inmunoestimuladores, es decir impurezas relacionadas con el vector, se describe en la bibliografía científica (Smith *et al.* (2003) Mol Therapy (resumen); Chadeuf *et al.* (2005) Mol Therapy; European Medicines Agency (2005) Report from the CHMP Gene Therapy Expert Group Meeting; Hauck *et al.* (2009) Mol Therapy). En la figura 3 se proporcionan datos de otros grupos que generan y purifican VAA recombinante a gran escala para investigación de traducción y desarrollo de productos clínicos (de Hauck *et al.* (2009) Mol Therapy).

Ejemplo 2

Un vector de VAA (AAV2-hRPE65) purificado utilizando este procedimiento se ha administrado a pacientes y presentaba eficacia a largo plazo en un estudio clínico para amaurosis congénita de Leber (Maguire *et al.* (2008) N Engl J Med). De manera notable, vectores de AAV2-RPE65 similares utilizados por otros grupos purificados mediante un procedimiento de fabricación que no puede eliminar impurezas relacionadas con el vector demostraron evidencias significativamente más débiles de eficacia, aun cuando se administraron a dosis superiores (Bainbridge *et al.* (2008) N Engl J Med, y Hauswirth *et al.* (2008) Human Gene Ther).

La tabla 1 a continuación proporciona un resumen de estos datos.

Tabla 1. Comparación de resultados de los ensayos clínicos RPE65-LCA

	Edad al inicio(años)/género	Mutación de RPE65	Seguimiento (meses)	Anestesia	Dosis de vector	Volumen (ml) administrado	Ubicación de la inyección	Inmunosupresión sistémica	Complicaciones oculares notificadas	Agudeza visual de entrada (ojo de estudio)	Agudeza visual tras el tratamiento	Cambio en la agudeza visual considerado significativo	Visión del paciente en iluminación tenue (autonotificación)
Estudio actual													
P1	24/M	E417Q/E417Q	3	L	$5,96 \times 10^{10}$	0,15	M	No	FT	20/240 ^a	20/317	No	+
P2	23/F	R44Q/R91W	3	L	$5,96 \times 10^{10}$	0,15	ST	No	No	20/195 ^a	20/138	No	+
P3	21/M	Y368H/Y368H	3	L	$5,96 \times 10^{10}$	0,15	T	No	No	20/283 ^a	20/191	No	+
Bainbridge et al. (2008)													
Paciente 1	23/M	Y368H/Y368H	12	G	$1,0 \times 10^{11}$	1,0	M	Si	No	20/286	20/145	No	NC
Paciente 2	17/F	IVS1+5G>A/G40S	12	G	$1,0 \times 10^{11}$	1,0	M	Si	No	20/662	20/662	No	NC
Paciente 3	18/M	E6X/D167Y	6	G	$1,0 \times 10^{11}$	1,0	M	Si	No	20/115	20/115	No	+
Maguire et al. (2008)													
Paciente 1 ^b	26/F	E102K/E102K	4,75	G	$1,5 \times 10^{10}$	0,15	SN	Si	No	<20/2000	20/1050	Si	+
Paciente 2 ^b	26/M	E102K/E102K	2,75	G	$1,5 \times 10^{10}$	0,15	M	Si	MH	<20/2000	20/710	Si	+
Paciente 3	19/F	R234X/R234X	1,25	G	$1,5 \times 10^{10}$	0,15	M	Si	No	20/640	20/290	Si	+

Abreviaturas: LCA, amaurosis congénita de Leber; L, anestesia local; G, anestesia general; M, mácula que incluye la fóvea; ST, retina suprot temporal; SN, retina supronasal; T, retina temporal; MH, orificio macular; FT, adelgazamiento foveal; NC, sin cambios; NM, no medido; +, mejora notificada por el paciente.

^aPromedio de dos medidas iniciales. Errores de refracción: P1 = -0,25 + 1,50 x 090; P2 = -1,50 + 0,50 x 075; P3 = -2,70 + 1,75 x 100.

^bGemelos bivitelinos.

El vector de VAA2, AAV2.hRPE65v2 contiene el ADNc4-6 de RPE65 humana de 1,6 kb con una secuencia Kozak modificada diseñada por ingeniería genética en el sitio de inicio de la traducción. El ADNc está bajo el control de un promotor de β actina de pollo (CBA) híbrido. AAV2-hRPE65 (específicamente, AAV2-hRPE65v2) se fabricó utilizando buenas prácticas de fabricación convencionales (BPFc) en el Children's Hospital of Philadelphia utilizando el procedimiento de purificación de vectores notificado en la presente memoria. En particular, se generó AAV2-RPE65 mediante transfección transitoria de células HEK293. El sobrenadante de cultivo celular y las células recolectadas se concentraron mediante filtración de flujo tangencial utilizando membranas de fibra hueca de punto de corte de peso molecular de 100 kDa. Se sometió la cosecha concentrada a tres tandas de microfluidización para lisar las células y liberar partículas de VAA. Se sometió el lisado celular a filtración (utilizando un cartucho de filtro de 0,2 micrómetros de Sartorius) y se sometió el lisado celular clarificado a cromatografía en columna de intercambio catiónico utilizando la resina Poros 50HS. Específicamente, se aplicó el lisado celular clarificado a la resina en solución salina tamponada neutra a una concentración de sal de aproximadamente NaCl 200 mM, se lavó (es decir, se sometió la resina a disoluciones para eliminar impurezas, pero no partículas de VAA unidas) con una disolución salina tamponada neutra que contenía sarcosilo 5 mM (un tensioactivo) a una concentración de sal de aproximadamente NaCl 100 mM, se lavó adicionalmente con una disolución salina tamponada neutra para eliminar el sarcosilo residual, se incubó con una disolución de sal tamponada neutra que contenía una nucleasa (benzonasa) a una concentración de 100 unidades/ml para digerir y eliminar las impurezas de ácido nucleico, y se lavó adicionalmente con una disolución salina tamponada neutra para eliminar nucleasa residual. Finalmente se eluyeron las partículas de VAA utilizando una disolución salina tamponada neutra a una concentración de sal de aproximadamente NaCl 400 mM, que proporciona una fuerza iónica suficientemente elevada para romper la unión de las partículas de VAA a la resina de cromatografía. Las partículas de VAA purificadas eluidas de la cromatografía columna de intercambio catiónico se complementaron con sal de cloruro de cesio de alta pureza hasta una concentración final correspondiente a una densidad de aproximadamente 1,35 g/ml, se filtraron a través de una membrana de 0,2 micrómetros estéril y luego se sometieron a ultracentrifugación isopícnica a 50.000 rpm utilizando un rotor de ángulo fijo en una ultracentrifuga Beckman a escala de laboratorio. Tras la centrifugación, se recuperaron bandas visibles correspondientes a AAV2-RPE65 de cada tubo de centrifuga utilizando agujas y jeringas estériles. Se agruparon las bandas recogidas correspondientes a AAV2-RPE65 y se sometieron a diafiltración mediante filtración de flujo tangencial utilizando fibras huecas de punto de corte de peso molecular de 100 kDa, dando como resultado la eliminación de cloruro de cesio de la disolución que contenía vectores de AAV2-RPE65. Entonces se formuló el vector en NaCl 180 mM, fosfato de sodio 20 mM y Pluronic F68 al 0,001% (también conocido como Poloxamer 188), pH 7,3. Estos vectores, apropiadamente diluidos, se administraron a sujetos humanos que carecían del gen de RPE65 humana (y, por tanto, que padecían amaurosis congénita de Leber, una forma de ceguera). Los beneficios para los sujetos humanos que recibieron estos vectores los han notificado Maguire *et al* (2008, 2009) y Simonelli *et al* (2009). Otros dos equipos realizaron simultáneamente estudios clínicos con AAV2-RPE65 (es decir, vectores de VAA2 recombinante que contenían el gen para RPE65 humana), y los resultados de sus estudios se han notificado. Estos otros dos equipos purificaron sus vectores de AAV2-RPE65 mediante un procedimiento de purificación que utilizaba cromatografía en columna, pero carecía de la etapa de ultracentrifugación en gradiente. Tal como resumen Hauswirth *et al* (2008), se administró AAV2-RPE65 preparado utilizando el procedimiento notificado en la presente memoria (es decir, el procedimiento de purificación de vectores de VAA de plataforma que incorpora tanto cromatografía en columna como ultracentrifugación en gradiente, las etapas combinadas de una manera para hacer que la ultracentrifugación en gradiente sea escalable), en las dosis bajas a sujetos humanos (de aproximadamente 4 veces a 7 veces menores que las dosis administradas a seres humanos por los otros dos equipos) aunque dieron lugar al mejor resultado. En particular, la mejor mejora significativa en la agudeza visual (3 de 3, véase la tabla 1) la observaron Maguire *et al* (2008). En cambio, Bainbridge *et al* (0 de 3) y Hauswirth *et al* (0 de 3) notificaron ambos la ausencia de mejora significativa en la agudeza visual en cualquiera de los sujetos tratados por ellos. Aunque otros factores pueden contribuir a las diferencias observadas en estos ensayos clínicos, queda claro que el procedimiento de purificación de AAV2-RPE65 utilizado para el ensayo notificado por Maguire *et al* era un factor significativo que explicaba la eficacia superior observada.

El vector utilizado en este estudio se modificó para optimizar el suministro a células diana mediante dos mecanismos: 1) la adición de tensioactivo a la formulación final para impedir la unión del vector al dispositivo de inyección, una consideración importante dada las dosis relativamente bajas de vector suministrado y 2) la eliminación de impurezas relacionadas con el vector que garantiza que cada partícula de vector captada por las células diana presenta el potencial de dar como resultado la expresión de RPE65. Preparaciones de vector convencionales, purificadas sin una etapa para eliminar cápsides vacías, presentan normalmente >80% de cápsides vacías, mientras que la preparación utilizada en estos estudios presenta >95% de cápsides llenas.

Tal como se mencionó anteriormente, los tres pacientes con LCA2 que recibieron AAV2.hRPE65v2 mediante inyección subretiniana mostraron evidencias de mejora en la función retiniana. La mejora en el reflejo de luz pupilar mediante pruebas fisiológicas objetivas estuvo acompañada por valores mejorados en medidas psicofísicas subjetivas. Las pruebas revelaron aumentos en la agudeza visual a las 6 semanas; después de eso, hubo una velocidad de mejora más lenta. La reducción del nistagmo, tal como la reducción que se notificó previamente en estudios con perros, puede explicar la agudeza visual mejorada en el ojo izquierdo (sin inyección) del paciente 2. Las mejoras en los ojos que recibieron inyección excedieron los límites de la

variabilidad de análisis-reanálisis y fueron de una magnitud que se creía que era de importancia fundamental.

5 No hubo acontecimientos adversos locales o sistémicos aparentes provocados por la exposición al vector de VAA. El orificio macular que se desarrolló en el ojo derecho del paciente 2 dos semanas tras la inyección subretiniana no parecía estar relacionado con la administración de AAV2.hRPE65v2, puesto que no se observaron signos de inflamación o toxicidad retiniana aguda. Se plantea la hipótesis de que el orificio macular estaba provocado por la contracción de una membrana preexistente estimulada por el procedimiento quirúrgico, aunque es posible que fuera un resultado directo del propio procedimiento quirúrgico. Aunque no se esperaba que el desarrollo de un orificio macular afectara a la función retiniana en pacientes con una pérdida de visión central similar a la de los pacientes del estudio, pudo afectar de manera crítica a la visión de aquellos con un menor grado de degeneración retiniana.

10 El beneficio clínico para los pacientes se ha mantenido durante los 6 meses desde el tratamiento experimental de LCA2 en el paciente 1. Claramente, el procedimiento de purificación mejorado descrito en la presente memoria, que elimina cápsidas vacías de la formulación que va a administrarse contribuyó a este beneficio clínico.

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para purificar partículas de vector de virus adenoasociados (VAA) genuinas que comprenden un transgén que codifica para una proteína terapéutica o fragmento de la misma a partir de una preparación de VAA que comprende unas partículas de vector de VAA, cápsides vacías e impurezas de la célula huésped, comprendiendo dicho procedimiento:
 - a) recolectar células y sobrenadante celular que comprenden unas partículas de VAA;
 - b) concentrar dichas células y dicho sobrenadante por medio de filtración de flujo tangencial
 - c) lisar dichas células por microfluidización para formar un lisado;
 - d) filtrar, clarificando de ese modo el lisado de la etapa c);
 - e) purificar unas partículas de VAA que comprenden unas partículas de vector de VAA genuinas mediante cromatografía en columna de intercambio iónico para producir un eluato, y entonces opcionalmente concentrar el eluato de la columna mediante filtración de flujo tangencial;
 - f) mezclar dicho eluato con cloruro de cesio y someter dicha mezcla a ultracentrifugación en gradiente para separar vectores de VAA genuinos de impurezas relacionadas con el vector de VAA;
 - g) recoger unas partículas de VAA que comprenden unas partículas de vector de VAA genuinas separadas en la etapa f) y someter las mismas a un intercambio de tampón mediante filtración de flujo tangencial;
 - h) formular dichas partículas de VAA que comprenden unas partículas de vector de VAA genuinas de la etapa g) con tensioactivo para proporcionar una formulación de partículas de VAA;
 - i) filtrar dicha formulación de la etapa h) para eliminar las impurezas restantes, en el que dichas partículas de vector de VAA genuinas están presentes en el filtrado resultante en una cantidad de por lo menos el 90%.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas partículas de vector de VAA genuinas se derivan de un VAA seleccionado de entre el grupo que consiste en VAA1, VAA2, VAA5, VAA6, VAA8 y VAA9.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho transgén codifica para un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste en un ARNip, una molécula antisentido, y un miARN una ribozima y un ARNhp.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho transgén codifica para un producto génico seleccionado de entre el grupo que consiste en insulina, glucagón, hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de la hormona del crecimiento (GRF), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGFA), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), TGF β , activinas, inhibinas, proteína morfogénica ósea (BMP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado líneas celulares gliales (GDNF), neurturina, agrina, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, Sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho transgén codifica para un producto génico seleccionado de entre el grupo que consiste en trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL1 a IL-17), proteína quimiotáctica de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores de necrosis tumoral α y β , interferones α , β y γ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, receptores de células T, receptores de células T quiméricos, receptores de células T de cadena sencilla, moléculas de CMH de clase I y clase II.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho transgén comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína útil para la corrección de errores congénitos del metabolismo seleccionada de entre el grupo que consiste en carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor V, factor VIII, factor IX, cistationina

beta-sintasa, cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metilmalonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa cinasa, glicina descarboxilasa, RPE65, proteína H, proteína T, una secuencia de regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y una secuencia de ADNc de distrofina.

5

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el producto génico es el factor VIII.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que unas cápsides vacías están presentes en dicho filtrado de la etapa i) en una cantidad del 10% o menos.

10

9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que unas partículas de vector de VAA genuinas están presentes en dicho filtrado de la etapa i) en una cantidad de por lo menos el 95%.

15

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que unas cápsides vacías están presentes en dicho filtrado de la etapa i) en una cantidad del 5% o menos.

11. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el producto génico es el factor IX.

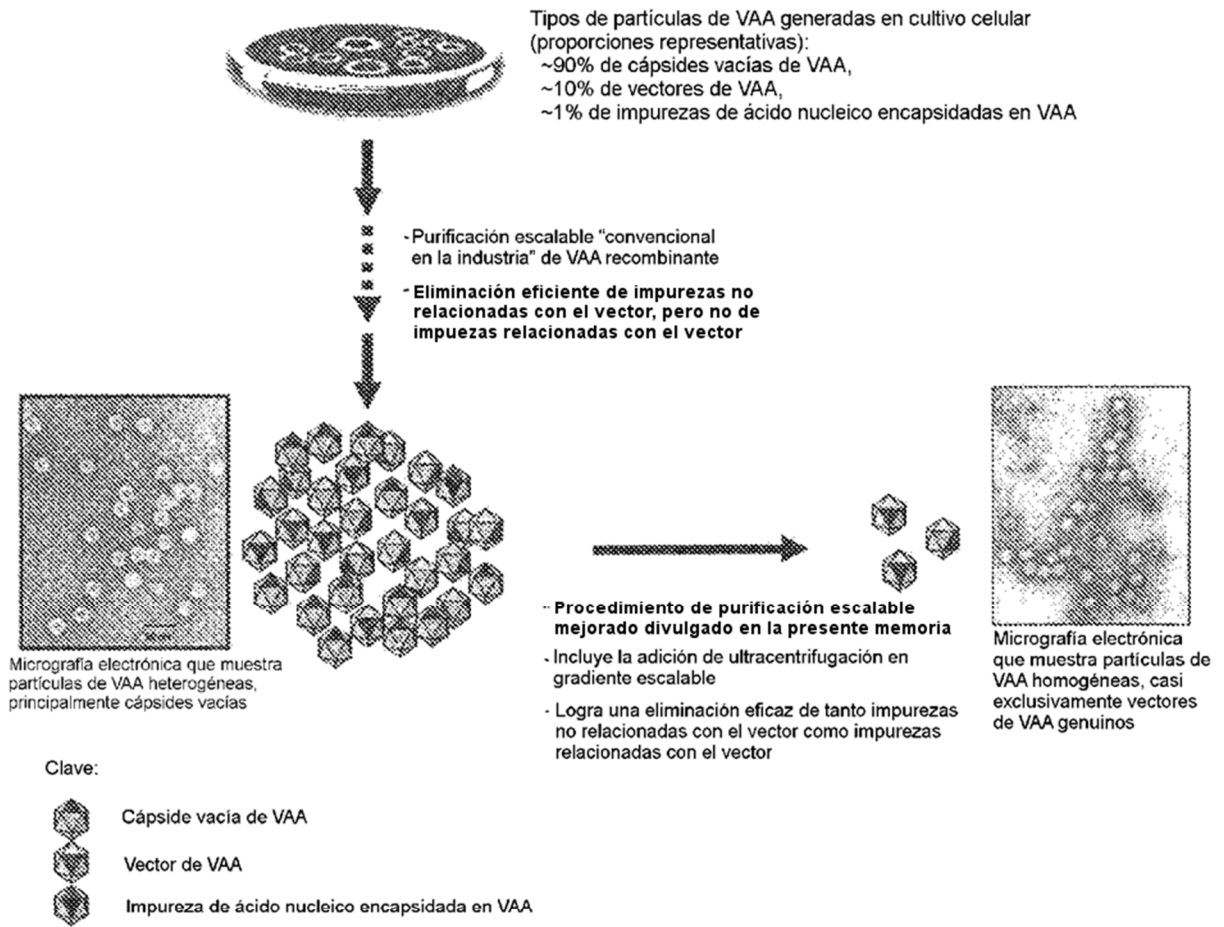


Figura 1

Procedimiento de purificación en columna - ultracentrifugación en gradiente combinadas para VAA recombinante

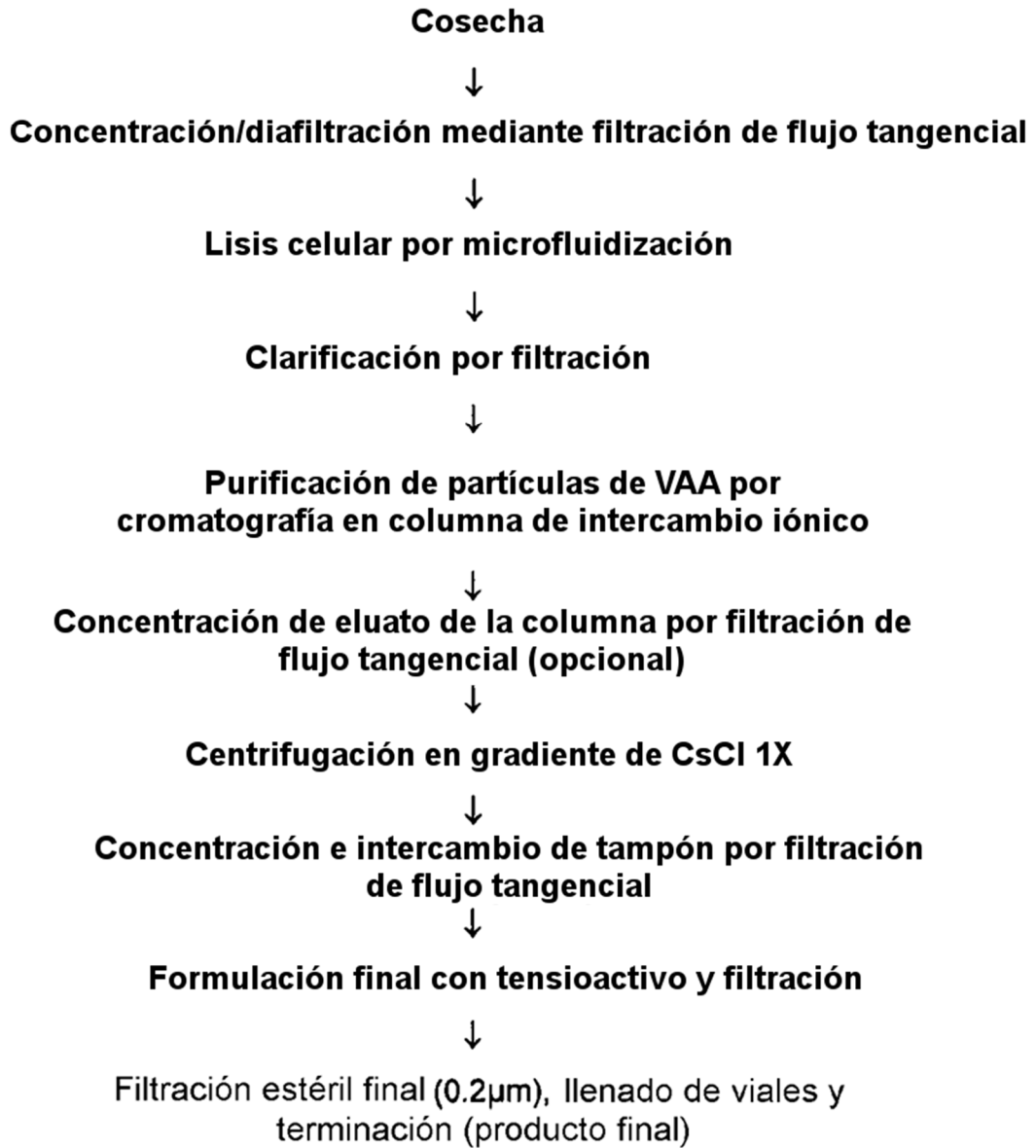


Figura 2

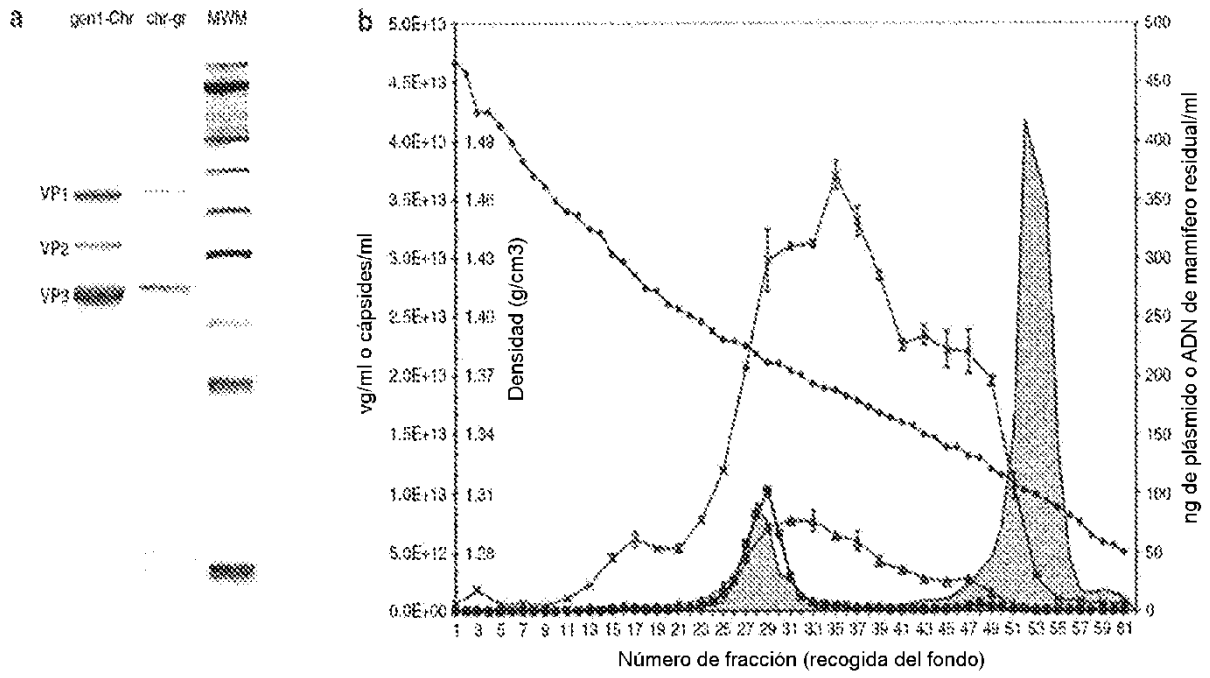


Figura 3