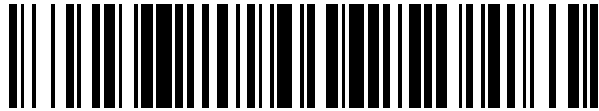


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 434**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/US2014/030370**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14762249 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2970920**

54 Título: **Procedimiento de fabricación escalable para producir vectores lentivirales recombinantes en un sistema de cultivo celular en suspensión libre de suero**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361787818 P

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

13.09.2018

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(100.0%)**

**3401 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**QU, GUANG y
WRIGHT, JOHN FRASER**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 681 434 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

Procedimiento de fabricación escalable para producir vectores lentivirales recombinantes en un sistema de cultivo celular en suspensión libre de suero.

5

Campo de la invención

Esta invención se refiere a los campos de la biología molecular y la terapia génica. Más específicamente, la invención proporciona procedimientos mejorados para la producción a gran escala de vectores virales, preferentemente vectores virales lentivirales y adenoasociados, que comprenden transgenes que codifican para productos médicamente beneficiosos para utilización clínica.

10

Introducción

Se han desarrollado vectores basados en lentivirus recombinantes (rLenti) y se han utilizado ampliamente como productos de suministro génico en investigación para varias enfermedades humanas graves. Los vectores lentivirales han demostrado ser muy productivos en cuanto a la transducción debido a su capacidad para infectar tanto células que se replican como células que no se replican, incluyendo células madre.

15

Se han iniciado muchos ensayos clínicos en todo el mundo utilizando vectores lentivirales de pseudotipo de VSVG, basados en VIH-1 y se han observado beneficios clínicos muy prometedores. Sin embargo, un problema significativo en el campo en este momento es la falta de una metodología para producir suficientes cantidades de rLenti que se necesitarán para estudios clínicos avanzados. Los datos de ensayos clínicos e investigación han mostrado que rLentivector es un vehículo de suministro génico prometedor para terapia génica humana, para enfermedades genéticas tales como inmunodeficiencias primarias (Fischer y colaboradores) así como para productos inmunoterápicos para cánceres (June y colaboradores).

20

25

Sin embargo, existe la necesidad crítica en el campo de desarrollar procedimientos de producción y purificación escalables que sean adecuados para la fabricación cGMP de grandes cantidades de vectores rLenti que cumplan con los requisitos de calidad de productos en investigación y capacidad de fabricación para soportar fases posteriores de aplicaciones clínicas. Por ejemplo, para unos programas muy prometedores en fase I para el tratamiento de leucemias, se prevé que se requerirá una capacidad de fabricación al menos 100 veces mayor en relación con los procedimientos disponibles actualmente para los estudios en fase III y el lanzamiento de productos patentados en fase temprana. Por tanto, se necesitan urgentemente procedimientos que aumenten a escala la producción de este vector de terapia génica.

30

35

Sumario

Según la invención, se proporcionan procedimientos para la producción de vectores rLenti de alto título en un cultivo celular en suspensión libre de suero, escalable y la purificación del vector utilizando técnicas de cromatografía en columna convencionales en la industria, escalables. Una formulación de vector rLV que comprende partículas de rLV producidas según los procedimientos puede fabricarse, y opcionalmente incluirse en un portador farmacéuticamente aceptable.

40

En una realización, un procedimiento para la purificación de vectores virales incluye: a) recolectar vectores virales recombinantes que comprenden un transgén a partir de cultivo en suspensión libre de suero; clarificar la cosecha de la etapa a) por medio de filtración; c) recoger el filtrado de la etapa b) y opcionalmente exponer dicho filtrado a digestión con nucleasas para eliminar impurezas de ADN/ARN; someter el filtrado de la etapa c) a cromatografía en columna de intercambio aniónico modulada por PEG, aislando de ese modo dichos vectores virales; purificar adicionalmente los vectores virales obtenidos de la etapa d) por medio de filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón; someter el filtrado de la etapa e) a cromatografía en columna de exclusión molecular para purificar adicionalmente dichos vectores virales; someter los vectores de la etapa f) a filtración de flujo tangencial, y obtener de ese modo el título de vectores final; filtrar una disolución de vectores obtenida de la etapa g) a través de un filtro de diámetro de poro de 0,20 a 0,5 μm ; y recoger dichos vectores virales purificados.

45

50

55

En otra realización, un procedimiento para la purificación de vectores virales incluye: a) recolectar vectores virales recombinantes que comprenden un transgén a partir de cultivo en suspensión libre de suero; b) clarificar la cosecha de la etapa a) por medio de filtración; c) someter la suspensión clarificada de la etapa b) a filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón; d) recolectar el filtrado de la etapa c) y opcionalmente exponer dicho filtrado a digestión con nucleasas para eliminar impurezas de ADN/ARN; e) someter el filtrado de la etapa d) a cromatografía en columna de intercambio aniónico modulada por PEG, aislando de ese modo dichos vectores virales; f) someter los vectores virales obtenidos de la etapa e) a cromatografía en columna de exclusión molecular para purificar adicionalmente dichos vectores virales; g) someter los vectores de la etapa f) a filtración de flujo tangencial, y obtener de ese modo el título de vectores final; h) filtrar una disolución de vectores obtenida de la etapa g) a través de un filtro de diámetro de poro de 0,20

60

65

a 0,5 μm ; y i) recoger dichos vectores virales purificados.

En una realización adicional, un procedimiento para la purificación de vectores virales incluye: a) recoger vectores virales recombinantes que comprenden un transgén a partir de cultivo en suspensión libre de suero; b) clarificar la cosecha de la etapa a) por medio de filtración; c) someter la suspensión clarificada de la etapa b) a filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón; d) recolectar el filtrado de la etapa c) y opcionalmente exponer dicho filtrado a digestión con nucleasas para eliminar impurezas de ADN/ARN; e) someter el filtrado de la etapa d) a cromatografía en columna de intercambio aniónico modulada por PEG, aislando de ese modo dichos vectores virales; f) purificar adicionalmente los vectores virales obtenidos de la etapa e) por medio de filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón; g) someter el filtrado de la etapa f) a cromatografía en columna de exclusión molecular para purificar adicionalmente dichos vectores virales; h) someter los vectores de la etapa g) a filtración de flujo tangencial, y obtener de ese modo el título de vectores final; filtrar una disolución de vectores obtenida de la etapa h) a través de un filtro de diámetro de poro de 0,20 a 0,5 μm ; y j) recoger dichos vectores virales purificados.

Los procedimientos de la invención pueden aplicarse a vectores lentivirales (rLV). En realizaciones particulares, un vector rLV comprende un vector lentiviral recombinante (rLV) que es un VIH-1, VIH-2, pseudotipo de VIH-1/VIH-2, VIH-1/VIS, VIF, virus de la encefalitis y artritis caprina (VEAC), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia bovina, VIH y sus pseudotipos, o un vector de lentivirus de pseudotipo de virus de la estomatitis vesicular G (pseudotipo de VSVG).

Los vectores virales según la invención incluyen transgenes. En realizaciones particulares, un 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. En realizaciones particulares adicionales, un transgén codifica para un producto génico (proteína o polipéptido).

En aspectos particulares, un producto génico (proteína o polipéptido) es 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 ($\text{TGF}\alpha$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), $\text{TGF}\beta$, activinas, inhibinas, proteína morfogenética 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 de líneas celulares gliales (GDNF), neurturina, agrina, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, Sonic hedgehog o tirosina hidroxilasa. En aspectos particulares adicionales, un producto génico (proteína o polipéptido) es trombopoyetina (TPO), interleucinas (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, 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, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), CCR5 y moléculas de CMH de clase I y clase II.

En aspectos particulares adicionales, un producto génico (proteína o polipéptido) es 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, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor V, factor VIII, factor IX, cistationina beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, 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 de 65 kDa específica de epitelio pigmentario de la retina (RPE65), proteína H, proteína T, una secuencia de regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) o una secuencia de ADNc de distrofina. Todavía en aspectos particulares adicionales, un producto génico (proteína o polipéptido) es factor VIII o factor IX.

Todavía en aspectos particulares adicionales, un transgén codifica para un antígeno asociado a tumor (TAA). Aún en aspectos particulares adicionales, un transgén codifica para un producto génico de cualquiera de CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44v7/8, CEA, EGF-RIII (variante 3 de receptor de factor de crecimiento epidérmico) EGP-2, erb-B2, erb-B2, 3, 4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, Her2/neu, IL-13R-a2, KDR, cadena ligera k, LeY, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, NKG2D, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, TAA seleccionado como diana por AcM IgE, TAG-72 o VEGFR2.

Los vectores virales según la invención pueden producirse por células. En realizaciones particulares, se

producen vectores virales recombinantes por células de mamífero. En aspectos particulares, se producen vectores virales recombinantes por células HEK 293T (ATCC); HEK293F (Life Technologies); HEK293 (ATCC); 293S (ATCC), BHK (ATCC), BHK-21 (ATCC), CHO (ATCC), CHO/dhFr- (ATCC)1 o CHO K1 (ATCC).

5 Las células que producen vectores virales recombinantes según la invención crecen normalmente en suspensión en un medio de crecimiento. El medio de crecimiento para las células incluye medio de crecimiento celular libre de suero. En aspectos particulares, un medio de crecimiento libre de suero es FreeStyle™293 (Gibco^R, Life Technologies), DMEM/F12 (Gibco^R, Life Technologies), SFM4Transfx-293 (HyClone™, ThermoScientific), CDM4HEK293 (HyClone™, ThermoScientific), StemPro-34SFM (Gibco^R, Life Technologies), FreeStyle F17 (Gibco^R, Life Technologies), 293SFM II (Gibco^R, Life Technologies) o CD293 (Gibco^R, Life Technologies), o una combinación de los mismos.

15 Pueden emplearse nucleasas en los procedimientos de la invención. En realizaciones particulares, una nucleasa es una endonucleasa, una exonucleasa, o una combinación de las mismas. En realizaciones particulares adicionales, una nucleasa es una desoxirribonucleasa, una ribonucleasa, o una combinación de las mismas. En realizaciones particulares adicionales, una nucleasa es una Benzonase o una ADNasa.

20 Los procedimientos de la invención también incluyen etapas adicionales de unión, lavado y/o elución en relación con cromatografía en columna. Tales etapas de unión, lavado y/o elución pueden realizarse una o múltiples veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces). En diversas realizaciones, un procedimiento incluye ajustar el filtrado de una etapa previa para que sea una disolución de unión (para la unión del virus a la resina o medios de la columna); y/o poner en contacto el filtrado con la columna de intercambio aniónico uniendo de ese modo los vectores virales a la columna de intercambio aniónico, y/o lavar los vectores virales unidos para eliminar impurezas con una disolución de lavado, incluyendo la disolución opcionalmente PEG o PEG y una sal; y/o eluir los vectores virales de la columna de intercambio aniónico con una disolución de elución.

25 En aspectos particulares, una disolución de unión incluye PEG en una cantidad de desde aproximadamente el 0% hasta el 10% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 0% hasta el 5% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 0% hasta el 2% en peso/volumen. En aspectos particulares adicionales, una disolución de unión incluye PEG que presenta un peso molecular de desde aproximadamente 2.000 kDa hasta aproximadamente 40.000 kDa.

35 En aspectos particulares, una disolución de lavado incluye PEG en una cantidad de desde aproximadamente el 1% hasta el 10% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 1% hasta el 5% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 1% hasta el 2% en peso/volumen. En aspectos particulares adicionales, una disolución de lavado incluye PEG que presenta un peso molecular de desde aproximadamente 2.000 kDa hasta aproximadamente 40.000 kDa.

40 En aspectos particulares, una disolución de elución incluye PEG en una cantidad de desde aproximadamente el 0% hasta el 20% en peso/volumen. En aspectos particulares adicionales, una disolución de elución incluye PEG que presenta un peso molecular de desde aproximadamente 2.000 kDa hasta aproximadamente 40.000 kDa.

45 En los procedimientos de la invención, las disoluciones de unión, lavado y/o elución pueden incluir opcionalmente una o más sales. En realizaciones particulares, la disolución de unión, lavado y/o elución incluye una o más sales en una cantidad de desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 1.000 mM (1 M). Las sales no limitativas incluyen cloruro de sodio y/o cloruro de potasio.

50 La filtración es a través de un filtro que presenta un diámetro de poro de 0,20 a 0,5 μm . En aspectos particulares, la filtración es a través de un filtro de diámetro de poro de 0,20 μm , un filtro de diámetro de poro de 0,22 μm o un filtro de diámetro de poro de 0,45 μm .

55 Tal como se da a conocer en la presente memoria, los procedimientos de la invención pueden producir altos títulos de vectores virales purificados, por ejemplo, desde 1×10^5 unidades infecciosas (UI)/ml de vector viral, hasta aproximadamente 1×10^9 unidades infecciosas (UI)/ml de vector viral. En realizaciones particulares, se produce vector viral a aproximadamente 5×10^5 unidades infecciosas (UI)/ml, se produce vector viral a aproximadamente 6×10^6 unidades infecciosas (UI)/ml o se produce vector viral a aproximadamente 3×10^8 unidades infecciosas (UI)/ml.

60 Descripción de los dibujos

Figuras 1A a 1D. Diagramas de flujo de procedimientos a modo de ejemplo para la purificación de vectores lentivirales de la invención.

65 Figura 2. Caracterización del crecimiento de células HEK 293T adaptadas en cultivo en suspensión libre de suero. A: Imagen de microscopio óptico que representa la población celular adaptada en medios libres de suero CD293, no se observó agregación celular. B. Optimización de las condiciones de cultivo celular

utilizando frascos centrifugadores. En la condición del 8% de CO₂ y 130 rotaciones por minuto, las células pueden cultivarse durante cuatro días y a aproximadamente 3E+06 células por ml. C. La velocidad de crecimiento celular concuerda con un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 horas.

5 Figura 3. Imágenes de microscopio de fluorescencia que representan la expresión de eGFP en células HEK 293 T transfectadas con PEI en cultivo en suspensión libre de suero. Los paneles A, B, C y D son células en diferentes medios de cultivo libres de suero. Las células positivas para eGFP se detectan sólo en el panel D.

10 Figura 4. Imágenes de microscopio de fluorescencia que representan la expresión de eGFP en células HEK 293 T transfectadas con PEI en cultivo en suspensión libre de suero. El panel A se transfectó con PEI de 25.000 kDa; B se transfectó con PEI MAX (40.000 kDa); el panel C se transfectó con PEI pro. PEI Max dio como resultado la mayor eficacia de transfección.

15 Figura 5. Imágenes de microscopio de fluorescencia que representan la eficacia de transfección de PEI de HEK 293 T en cultivo en suspensión libre de suero (A) y la transducción con vectores lentivirales de células HEK 293. El panel A se transfectó utilizando una condición optimizada con PEI MAX (40.000 kDa); el panel B muestra la transducción con Lentivector (50 ul de sobrenadante recolectado utilizado).

20 Figura 6. Análisis de la recuperación de Lentivector a partir de cromatografía en columna de DEAE y cromatografía en columna de DEAE modulada por PEG. El panel superior ilustra la expresión de eGFP de muestras a partir de fracciones de cromatografía en columna. A: La cromatografía no contiene modulación por PEG; B, C y D contienen una etapa de lavado adicional utilizando PEG al 4% (4K); PEG al 4% (6K) y PEG al 8% (4K). Se utilizaron 100 ul de cada fracción para transducir células HEK293, se detectaron células positivas para eGFP utilizando microscopio de fluorescencia y FACS (panel inferior). Casi el 100% de los
25 Lentivector se detectaron en las fracciones de elución.

Figura 7. Análisis de la elución de Lentivector utilizando absorción de UV a 280 nm. Se cargaron 30 ml de cosecha de Lentivector clarificados sobre una columna de DEAE Sepharose FF de 16 ml. Se purificaron los Lentivector con modulación por PEG (panel B, C, D) o sin modulación por PEG (A). Se integró el pico de elución de vectores utilizando absorción de UV a 280 nm, se redujo el área de pico desde 5 veces hasta casi 20 veces. Es interesante observar que la razón de absorción de UV de UV280/UV260 cambió desde UV280 dominante (panel A) hasta UV260 dominante (panel B, C y D), indicando una pureza de vectores mejorada.

35 Figura 8. Análisis de SDS-PAGE de la pureza del Lentivector eluido de la cromatografía en columna. Se cargaron 10 µl de cada muestra sobre un gel de NuePage Bis-Tris al 4-12% y se tiñó con plata tras la electroforesis. La elución A es la muestra de elución de Lentivector a partir de cromatografía en columna sin modulación por PEG; las eluciones B, C y D son las fracciones de elución a partir de cromatografía en columna modulada por PEG utilizando PEG 4K al 4%; PEG 6K al 4% y PEG 4K al 8%, respectivamente. Mientras que las recuperaciones de Lentivector son altamente comparables para todas de estas muestras eluidas, las impurezas proteicas se reducen significativamente en las fracciones moduladas por PEG.

40 Figura 9. Análisis de FACS de la productividad de rLentivector. Se produjeron Lentivector recombinantes que expresaban eGFP utilizando un procedimiento de transfección optimizado en cultivo celular en suspensión libre de suero a partir de placas de 12 pocillos (1,5 ml de cultivo celular) o frasco centrifugador (40 ml de cultivo celular). Se determinaron los rendimientos de vector utilizando análisis de FACS. Se observó una productividad de vectores de hasta 6E+06 unidades de transducción (UT) por mililitro a partir tanto de placas de 12 pocillos como de cultivo celular con centrifugación.

50 Descripción detallada

Normalmente, se producen vectores de lentivirus recombinantes utilizando procedimientos de transfección en investigación. Hay varios procedimientos que se conocen en la materia para generar viriones de rLV: por ejemplo, transfección utilizando secuencias auxiliares de rLV y vector (véase por ejemplo, Merten *et al* 2011). Sin embargo, cuando se fabrican vectores rLenti para aplicación clínica, particularmente para fases tardías de
55 aplicaciones clínicas, es altamente preferible fabricar los vectores utilizando un sistema de producción en suspensión libre de suero que pueda aumentarse a escala para garantizar la capacidad de fabricación adecuada y para garantizar un perfil de seguridad superior del vector fabricado.

60 Se da a conocer en la presente memoria un procedimiento de producción basado en transfección para producir un alto título de vectores lentivirales en un sistema de cultivo celular libre de suero escalable. Células de una fuente comercial, disponibles como adaptadas a crecimiento adherente, se adaptaron satisfactoriamente a medios de cultivo celular libres de suero. Se evaluaron más de cinco medios de cultivo celular diferentes que se afirmaba que soportaban cultivo celular en suspensión libre de suero, pero sólo se identificó un medio que soportaba un crecimiento celular sano, sin agregación tras la adaptación con una velocidad de crecimiento
65 rápida. Las células adaptadas se han cultivado en la condición de cultivo en suspensión libre de suero durante varios meses y se ha desarrollado un banco de células de investigación.

Los lentivirus son virus con envuelta, y son significativamente diferentes en cuanto a la estructura y el ciclo de vida del virus de otros virus utilizados para el suministro de ácido nucleico al interior de células, tales como virus adenoasociados (VAA). Los lentivirus se componen de 2 copias de ARN, una cápside nuclear (NC), una cápside (CA), una matriz asociada a la membrana (MA), proteínas de la envuelta tales como glicoproteínas de superficie y proteínas transmembrana y enzimas tales como integrasa (IN), proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) y proteínas accesorias (por ejemplo, Nef, Vif, Vpu, Vpr). Los lentivirus infectan células mediante la unión de una glicoproteína de superficie del virus a un receptor sobre la célula. Las membranas de la envuelta del virus y la célula se fusionan entonces permitiendo que el virus entre en la célula. Tras la entrada, tiene lugar el desprendimiento del recubrimiento del ARN viral y la transcripción inversa, lo que conduce a la formación de un complejo de pre-integración, que contiene ADN bicatenario, RT, IN, Vpr (o Vpx en VIH-2) NC, y algunas copias de la MA (Suzuki y Craigie 2007, Depienne *et al.*, 2000, Bukrinsky *et al.*, 1993 y Miller *et al.*, 1997). Una vez que el provirus entra en la envuelta nuclear, el ADN viral se integra dentro del genoma celular. A las funciones celulares normales de transcripción y traducción les sigue el ensamblaje de proteínas virales estructurales con ARN viral y la gemación viral posterior.

Los lentivirus son deseables para el suministro de ácido nucleico dentro de las células en parte porque pueden infectar a células que no se dividen entrando de manera activa en el núcleo a través de la envuelta nuclear. En cambio, otros retrovirus requieren división celular para la infección debido al hecho de que no pueden entrar en la envuelta nuclear de una célula que no se divide.

Los "lentivirus" incluyen miembros del grupo de lentivirus bovino, el grupo de lentivirus equino, el grupo de lentivirus felino, el grupo de lentivirus ovino-caprino y el grupo de lentivirus de primate. Los ejemplos de lentivirus adecuados para los procedimientos y la utilización de la invención incluyen, pero no se limitan a, VIH y sus pseudotipos tales como VIH-1, VIH-2, pseudotipo de VIH-1/VIH-2, IIIV-1/VIS, FIV, virus de la encefalitis y artritis caprina (VEAC), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia bovina y lentivirus de pseudotipo de virus de la estomatitis vesicular G (pseudotipo de VSVG).

El desarrollo de vectores lentivirales para terapia génica se ha revisado en Klimatcheva *et al.*, 1999, *Frontiers in Bioscience* 4: 481-496. El diseño y la utilización de vectores lentivirales adecuados para terapia génica se describe, por ejemplo, en la patente US n.º 6.207.455, concedida el 27 de marzo de 2001, y la patente US n.º 6.165.782, concedida el 26 de diciembre de 2000. Se dan a conocer sistemas adicionales en Merten *et al.* (2011).

Los términos "poliproteína gag", "poliproteína pol" y "poliproteína env" se refieren a las múltiples proteínas codificadas por los genes gag, pol y env retrovirales que se expresan normalmente como una única "poliproteína" precursora. Por ejemplo, gag de VIH codifica para, entre otras proteínas, p17, p24, p9 y p6. Pol de VIH codifica para, entre otras proteínas, proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN). Env de VIH codifica para, entre otras proteínas, Vpu, gp120 y gp41. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "poliproteína" debe incluir toda o cualquier parte de las poliproteínas gag, pol y env.

Los términos "Vpx" y "Vpr" se refieren respectivamente a las proteínas Vpx y Vpr lentivirales descritas, por ejemplo, en el documento WO 96/07741. Estos términos también se refieren a fragmentos, mutantes, homólogos y variantes de Vpr y Vpx que conservan la capacidad para asociarse con p6.

El término "proteína de fusión" se refiere a una molécula que comprende dos o más proteínas unidas entre sí. Normalmente, la proteína de fusión es una secuencia de aminoácidos que comprende dos o más secuencias proteicas.

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recombinante", como modificador de secuencias tales como vector así como modificador de un virus, significa que las composiciones se han manipulado (es decir, modificado por ingeniería genética) de un modo que generalmente no se produce en la naturaleza.

Un "vector lentiviral recombinante" o "rLV" es un elemento genético que comprende un genoma de ácido nucleico bicatenario, lineal de lentivirus. El genoma de ácido nucleico bicatenario, lineal de lentivirus se ha alterado genéticamente, por ejemplo, mediante la adición o inserción de un constructo de ácido nucleico heterólogo.

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. Un virus recombinante no incluye virus infeccioso tal como existen en la naturaleza.

Un “virión de LV” quiere decir una partícula de virus completa, tal como una partícula de virus LV de tipo natural (wt) asociada con una envuelta de rLV. Por “virión de rLV” quiere decirse una partícula de virus completa, tal como una partícula de virus rLV que comprende un genoma de ácido nucleico de LV bicatenario, lineal y una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés asociada con una envuelta de rLV. Los ejemplos de rLV adecuados para los procedimientos y las utilidades de la invención incluyen, pero no se limitan a, VIH y sus pseudotipos tales como VIH-1, VIH-2, pseudotipo de VIH-1/VIH-2, VIH-1/VIS, FIV, virus de la encefalitis y artritis caprina (VEAC), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia bovina y lentivirus de pseudotipo de virus de la estomatitis vesicular G (pseudotipo de VSVG).

Los términos “virión de rLV recombinante”, “partícula de vector de rLV” y “partículas completas” se definen en la presente memoria como un virus infeccioso, de replicación defectuosa que incluye una envuelta de membrana de rLV, y un transgén que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés. Se proporciona una revisión que describe características moleculares de rLV en Dropulic (2011). Tal como se expone en la presente memoria, un “virión de rLV recombinante” no incluye LV infeccioso tal como existen en la naturaleza.

El término “célula huésped” indica, 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 rLV, un plásmido de vector de rLV, 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 que el antecesor original, debido a mutación natural, accidental o deliberada.

Un vector de función accesoria se refiere generalmente a un ácido nucleico que incluye una secuencia que proporciona una función accesoria o auxiliar. Un vector de función accesoria puede transfectarse dentro de una célula huésped, y el vector puede proporcionar o codificar para proteína(s) que funciona(n) soportando la producción de viriones de vector de rLV en/por la célula huésped. Un vector de función accesoria puede estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, episoma o integrado en el genoma de la célula huésped.

El término “transfección” se utiliza para referirse a la captación de ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) por una célula, y una célula se ha “transfectado” cuando se ha introducido ácido nucleico exógeno (por ejemplo, ADN) dentro de la membrana celular. En la materia se conocen en general 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 dentro de células huésped adecuadas.

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

Las células y líneas celulares apropiadas para crecimiento libre de suero en suspensión según los procedimientos de la invención incluyen células de mamífero. Las células no limitativas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, células HEK 293T (ATCC); HEK293F (Life Technologies); HEK293 (ATCC); 293S (ATCC), BHK (ATCC), BHK-21 (ATCC), CHO (ATCC), CHO/dhFr- (ATCC)1 y CHO K1 (ATCC).

Están disponibles comercialmente medios de crecimiento celular libres de suero para su utilización según la invención o pueden prepararse. Los medios de crecimiento libres de suero a modo de ejemplo no limitativos incluyen, por ejemplo, medios FreeStyle™293 (Gibco[®], Life Technologies), DMEM/F12 (Gibco[®], Life Technologies), SFM4Transfx-293 (HyClone™, ThermoScientific), CDM4HEK293 (HyClone™, ThermoScientific), StemPro-34SFM (Gibco[®], Life Technologies), FreeStyle F17 (Gibco[®], Life Technologies), 293SFM II (Gibco[®], Life Technologies), y CD293 (Gibco[®], Life Technologies).

En los procedimientos de la invención, puede utilizarse una etapa del tratamiento o procedimiento para reducir o disminuir la cantidad de una impureza de ácido nucleico. En realizaciones particulares, se utiliza una nucleasa para reducir o disminuir la cantidad de una impureza de ácido nucleico en la cosecha o una preparación de vectores virales recombinantes. En realizaciones particulares, una nucleasa es una endonucleasa, tal como Benzonase, una exonucleasa, o una combinación de las mismas. En realizaciones particulares, una nucleasa es una desoxirribonucleasa, una ribonucleasa, o una combinación de las mismas. En realizaciones particulares, una nucleasa es una ADNasa.

En los procedimientos de la invención, se realizan una o más etapas de cromatografía en columna. Diversos sustratos son adecuados como resina o medio (fase estacionaria) para la cromatografía en columna. Tal resina o medio (fase estacionaria) incluye medios o resinas de afinidad o basados en carga (intercambio iónico).

5 La cromatografía en columna de intercambio iónico puede ser cromatografía en columna de intercambio aniónico (fuerte o débil), o cromatografía en columna de intercambio catiónico (fuerte o débil). Una columna de intercambio iónico puede ser un medio o resina a base de polietilenimina cuaternizada; o un medio o resina a base de amina cuaternaria. Una columna de intercambio iónico puede ser una resina a base de polietilenimina; una resina a base de dietilaminoetilo (DEAE); o una resina a base de dietilaminopropilo.

10 Una columna de afinidad puede ser un medio o resina a base de sulfopropilo, o un medio o resina a base de carboximetilo. Una columna de afinidad puede ser un medio o resina de cromatografía multifuncional; un medio o resina de afinidad a quelato de metal; un medio o resina a base de heparina o un medio o resina de afinidad específica de grupo.

15 Los medios o las resinas adicionales adecuados para cromatografía en columna incluyen un medio o resina a base de hidroxiapatita ((Ca₅(PO₄)₃OH)₂); un medio o resina de intercambio catiónico débil multimodal; medios o resinas a base de N-bencil-n-metiletanolamina; o un medio o resina a base de octilamina.

20 En los procedimientos de la invención, se utilizan disoluciones, tales como disoluciones de unión, lavado y elución. Los términos se utilizan por conveniencia para referirse al fin de la disolución dentro del contexto de cromatografía.

25 Tales disoluciones pueden incluir opcionalmente componentes tales como polietilenglicol (PEG). Tales disoluciones también pueden incluir opcionalmente componentes tales como sales. Además, tales disoluciones pueden incluir opcionalmente componentes tales como agentes tamponantes (tamponadas con tris o fosfato). Además, tales disoluciones pueden incluir componentes tales como agentes quelantes, por ejemplo, EDTA.

30 En realizaciones particulares, la cantidad de PEG en una disolución de unión es de desde aproximadamente el 0% hasta el 10% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 0% hasta el 5% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 0% hasta el 2% en peso/volumen. En realizaciones particulares, la cantidad de PEG en una disolución de lavado es de desde aproximadamente el 1% hasta el 10% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 1% hasta el 5% en peso/volumen, o desde aproximadamente el 1% hasta el 2% en peso/volumen. En realizaciones particulares, la cantidad de PEG en una disolución de elución es de desde aproximadamente el 0% hasta el 20% en peso/volumen.

35 En realizaciones particulares, el PEG en una disolución de unión, lavado o elución presenta un peso molecular de desde aproximadamente 2.000 kDa hasta aproximadamente 40.000 kDa. En otras realizaciones particulares, el PEG en una disolución de unión, lavado o elución presenta un peso molecular de desde aproximadamente 2.000 kDa hasta aproximadamente 10.000 kDa

40 En realizaciones particulares, una sal comprende o consiste en cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) o cloruro de calcio. En realizaciones particulares, la cantidad de una sal en una disolución de unión, lavado o elución es de desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 1 M. En realizaciones más particulares, la cantidad de una sal en una disolución de unión es de desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 200 mM (tal como aproximadamente 100 mM). En realizaciones más particulares, la cantidad de una sal en una disolución de lavado es de desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 200 mM (tal como 100 mM). En realizaciones más particulares, la cantidad de una sal en una disolución de elución es de desde aproximadamente 200 mM hasta aproximadamente 1 M (tal como 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM) o desde aproximadamente 500-1.000 mM, o 600-800 mM.

45 En los procedimientos de la invención, se emplean filtros con tamaños de poro que oscilan entre 0,20 a 0,5 um (micrómetros). Tamaños de poro a modo de ejemplo adicionales oscilan entre aproximadamente 0,20 um (micrómetros) y aproximadamente 0,22 um (micrómetros), o más particularmente de manera aproximada 0,22 um (micrómetros). Tamaños de poro a modo de ejemplo adicionales oscilan entre aproximadamente 0,22 um (micrómetros) y aproximadamente 0,30 um (micrómetros), o entre aproximadamente 0,30 um (micrómetros) y aproximadamente 0,45 um (micrómetros) de diámetro de poro, o más particularmente de manera aproximada 0,45 um (micrómetros).

50 Los procedimientos de la invención proporcionan un aumento en los títulos de rLV durante la producción a gran escala al tiempo que se reducen, disminuyen o se eliminan, impurezas relacionadas con vectores rLV (por ejemplo impurezas de ácido nucleico asociadas con rLV) contenidas dentro de reservas purificadas de viriones de rLV, con pérdida mínima de viriones o partículas de vector rLV contenidas en las mismas. Las impurezas incluyen proteína, ácido nucleico (ADN, ARN), residuos y otro material distinto de viriones o partículas de vector rLV que pueden estar presentes. Los procedimientos de la invención sirven para aumentar la cantidad de viriones/partículas de vector rLV al tiempo que disminuyen o se eliminan las impurezas.

En realizaciones particulares, un procedimiento de la invención da como resultado un vector viral producido a aproximadamente 5×10^5 unidades infecciosas (UI)/ml, o más. En realizaciones particulares, un procedimiento de la invención da como resultado un vector viral producido a aproximadamente 6×10^6 unidades infecciosas (UI)/ml, o más. En realizaciones particulares, un procedimiento de la invención da como resultado un vector viral producido a aproximadamente 3×10^8 unidades infecciosas (UI)/ml.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aproximadamente” o “de manera aproximada” cuando se utiliza en referencia a una medida de cantidad o unidad se refiere a un intervalo de desviación estadística aceptable para los valores numéricos representados. Normalmente, el intervalo es de desde aproximadamente +/- 10%, o +/-5% del valor numérico representado.

Tal como se da a conocer en la presente memoria, un vector recombinante (viral) puede incluir un ácido nucleico, tal como un transgén. 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 tal 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-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster metílico del 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 del 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 del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) para dar un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante 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 estar ubicada en 3' con respecto a la secuencia codificante.

El término “secuencias de control” de ADN se refiere conjuntamente 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 conjuntamente la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No siempre es necesario que todas de estas secuencias de control estén 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 ordinario para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia de regulador de ADN, en la que la secuencia de regulador se deriva de un gen que puede unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas arriba (sentido de 3'). Los promotores de la transcripción pueden incluir “promotores inducibles” (en donde la expresión de una secuencia de polinucleótido operativamente unida al promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), “promotores reprimibles” (en donde la expresión de una secuencia de polinucleótido operativamente unida al promotor se induce por 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 codificantes pueden afectar a la expresión de la secuencia codificante. No es necesario que las secuencias de control sean 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 aunque transcritas entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede considerarse todavía “operativamente unida” a la secuencia codificante.

Para el fin de describir la posición relativa de secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular a lo largo de la presente solicitud, tal como cuando se describe que una secuencia de nucleótidos particular está situada “aguas arriba”, “aguas abajo”, “en 3'” o “en 5'” en relación con otra secuencia, debe entenderse que esta es la posición de las secuencias en la hebra “sentido” o “codificante” de una molécula de ADN a la que está haciéndose referencia como convencional en la materia.

El término “heterólogo” tal como se refiere a secuencias de ácido nucleico tales como secuencias codificantes y secuencias de control, indica secuencias que no están normalmente unidas entre sí, y/o no están asociadas normalmente con una célula particular. Por tanto, una región “heteróloga” de un vector o constructo de ácido

nucleico 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 propia secuencia codificante 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 presente normalmente en la célula se consideraría heteróloga para los fines de esta invención. La variación alélica o acontecimientos de mutación que se producen de manera natural no dan lugar a ADN heterólogo, tal como se utiliza en la presente memoria.

Una "molécula terapéutica" en una realización es un péptido o una proteína que puede aliviar o reducir síntomas que resultan de una ausencia o un defecto en una proteína en una célula o un sujeto. Alternativamente, una proteína o un péptido "terapéutico" codificado por un transgén es uno que confiere un beneficio a un sujeto, por ejemplo, para corregir un defecto genético, para corregir una deficiencia génica (de expresión o funcional) o un efecto anticancerígeno. Por consiguiente, un transgén que comprende el ácido nucleico heterólogo puede codificar para varios productos útiles. Estos pueden incluir ARNip, moléculas antisentido y miARN por ejemplo.

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 α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGFI e IGF-II), uno cualquiera de la superfamilia de factor de crecimiento transformante β , incluyendo TGF β , activinas, inhibinas, o cualquiera de las proteínas morfogenéticas 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 de líneas celulares gliales (GDNF), neurturina, agrina, uno cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, Sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa.

Otros productos transgénicos 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. También son útiles en la invención productos génicos producidos por el sistema inmunitario. Estos incluyen, sin limitaciones, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD y 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 (por ejemplo Kalos *et al* 2011; Porter *et al* 2011), receptores acoplados a proteínas G (GPCR) tales como CCR5, moléculas de CMH de clase I y clase II, así como inmunoglobulinas modificadas por ingeniería genética y moléculas del CMH. Los productos génicos útiles incluyen también proteínas reguladoras tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína de cofactor de membrana (MCP), factor acelerante de la descomposición (DAF), CR1, CF2 y CD59.

Otros productos génicos útiles incluyen los que pueden corregir errores congénitos del metabolismo. Tales transgenes pueden codificar para, por ejemplo, carbamoyl sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factores de coagulación sanguínea tales como factor V, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII o proteína C, cistationina beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metilmalonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, betaglucosidasa, 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.

Los productos génicos útiles adicionales incluyen los que pueden actuar en una actividad o función defectuosa, deficiente o que falta, por ejemplo, un anticuerpo, proteína de 65 kDa específica de epitelio pigmentario de la retina (RPE65), eritropoyetina, receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metal (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en la enfermedad de almacenamiento lisosomal (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosomal, cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, una hormona, un factor de crecimiento (por ejemplo, factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento

derivado de células gliales, factor de crecimiento transformante α y β , etc.), una citocina (por ejemplo, interferón α , interferón β , interferón γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, linfotóxica, etc.), un producto génico suicida (por ejemplo, timidina cinasa del virus del herpes simple, citosina desaminasa, toxina diftérica, citocromo P450, desoxicitidina cinasa, factor de necrosis tumoral, etc.), una proteína de resistencia a fármacos (por ejemplo, que proporciona resistencia a un fármaco utilizado en terapia contra el cáncer), una proteína supresora de tumores (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis coli adenomatosa (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, una proteína o péptido tolerogénico o inmunogénico Tregitopes, o hCDR1, insulina, glucocinasa, guanilato ciclasa 2D (LCA-GUCY2D), proteína acompañante de Rab 1 (coroideremia), LCA 5 (LCA-lebercilina), ornitina cetoácido aminotransferasa (atrofia girata), retinosquisina 1 (retinosquisis ligada al cromosoma X), USH1C (síndrome de Usher 1C), GTPasa de retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (XLRP), MERTK (formas de AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (sordera por conexina 26), ACHM 2, 3 y 4 (acromatopsia), PKD-1 o PKD-2 (enfermedad renal poliquística), TPP1, CLN2, deficiencias génicas causantes de enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, sulfatasas, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP, NPC1, VPC2, proteínas activadoras de esfingolípidos, etc.), una o más nucleasas de dedos de zinc para edición del genoma, o secuencias donadoras utilizadas como moldes de reparación para edición del genoma.

Los transgenes también pueden codificar para un antígeno asociado a tumores (TAA). Los TAA no limitativos incluyen: antígeno específico de testículos asociado a tumor (por ejemplo, MAGE, BAGE y GAGE), antígeno de diferenciación de melanocitos (por ejemplo, tirosinasa, Melan-A/MART-1), CDK4, MUM-1, beta-catenina, gp100/pmel 17, TRP-1, TRP-2, un MITF, MITF-A y MITF-M (King, *et al.* (1999). *Am J Pathol* 155:731). Los ejemplos no limitativos adicionales de TAA expresados por tumores incluyen GP75 de melanoma, anexina I, anexina II, proteína de unión a adenosina desaminasa (ADA), PGP 9.5 (Rode, *et al.* (1985). *Histopathology* 9:147), antígeno asociado colorrectal (CRC)--C017-1A/GA733, Ab2 BR3E4, C117-1A/GA733, Hsp70 (Chen, *et al.* (2002). *Immunol Lett* 84:81), Hsp90, Hsp96, Hsp105, Hsp110, HSPPC-96 (Caudill, M. M. y Z. Li (2001). *Expert Opin Biol Ther* 1:539), proteína de estrés gp96 (Heike *et al.* (2000). *Int J Can* 86:489), péptidos celulares asociados a gp96, G250, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), mamaglobina (Tanaka, *et al.* (2003). *Surgery* 133:74), tiroglobulina, STn (Morse, M. A. (2000). *Curr Opin Mol Ther* 2:453), antígeno carcinoembrionario (CEA), epítipo CAP-1 de antígeno carcinoembrionario (CEA), epítipo CAP-2 de antígeno carcinoembrionario (CEA), etv6, am11, antígeno específico de próstata (PSA), epítipos de PSA PSA-1, PSA-2, PSA-3 (Correale, *et al.* (1998). *J Immunol* 161:3186), Ad5-PSA, proteína relacionada con hormona paratiroidea (PTH-rP), EGFR (Plunkett, *et al.* (2001). *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:467), PLU1 (Plunkett, *et al.* (2001). *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:467), receptor de laminina inmaduro de antígeno oncofetal (OFA-iLR), MN/CA IX (CA9) (Shimizu *et al.*, (2003). *Oncol. Rep.* Septiembre-octubre; 10:1307), HP59, citocromo oxidasa 1, sp100, msa (Devine, *et al.* (1991). *Cancer Res* 51:5826), proteína activante de GTPasa Ran, una proteína Rab-GAP (activante de GTPasa Ran), PARIS-1 (Zhou, *et al.* (2002). *Biochem Biophys Res Commun* 290:830), receptor de células T/cadena de CD3-zeta, cTAGE-1, SCP-1, antígeno de glicolípidos-GM2, GD2 o GD3, GM3 (Bada, *et al.* (2002). *Hum Exp Toxicol* 21:263), fucosil-GM1, antígenos de glicoproteínas (mucina)-Tn, sialil-Tn (Lundin, *et al.* (1999). *Oncology* 57:70), TF y mucina-1 (Mukherjee, *et al.* (2003). *J Immunother* 26:47), CA125 (MUC-16) (Reinartz, *et al.* (2003). *Cancer Res* 63:3234), un antígeno de la familia MAGE, GAGE-1,2, BAGE, RAGE, LAGE-1 (Eichmuller, *et al.* (2003). *Int J Cancer* 104:482) (Chen, *et al.* (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6919), GnT-V (Murata, *et al.* (2001). *Dis Colon Rectum* 44:A2-A4), MUM1 (Kawakami, *et al.* (1996). *Keio J Med* 45:100), EP CAM/KSA (Ullenhag, *et al.* (2003). *Clin Cancer Res* 9:2447), CDK4, un antígeno de la familia MUC, HER2/neu, ErbB2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, NeuGcGM3 (Carr, *et al.* (2003). *J Clin Oncol* 21:1015), antígeno relacionado con Fos (Luo, *et al.* (2003). *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8850), ciclofilina B (Tamura, *et al.* (2001). *Jpn J Cancer Res* 92:762), RCAS1, S2 (Koga, *et al.* (2003). *Tissue Antigens* 61:136), L10a (Koga, *et al.* (2003), citado anteriormente), L10a, péptido de telomerasa rt (Wang, *et al.* (2001). *Oncogene* 20:7699), cdc27, fodrina, p120ctn, PRAME, GA733/EoCam (Ross, *et al.* (1986). *Biochem Biophys Res Commun* 135:297), NY-BR-1, NY-BR-2 NY-BR-3, NY-BR-4 NY-BR-5, NY-BR-6 NY-BR-7 (Jager, *et al.* (2001). *Cancer Res* 61:2055), NY-ESO-1, L19H1, MAZ (Daheron, *et al.* (1998). *Leukemia* 12:326), PINCH (Greiner, *et al.* (2000). *Exp Hematol* 28:1413), PRAME (Ikeda, *et al.* (1997). *Immunity* 6:199), Prplp/Zerlp, WT1 (Oka, *et al.* (2002). *Curr Cancer Drug Targets* 2:45), proteína de poliposis coli adenomatosa (APC), PHF3, LAGE-1, SART3 (Miyagi, *et al.* (2001). *Clin Cancer Res* 7:3950), SCP-1 (Jager, *et al.* (2002). *Cancer Immun* 2:5), SSX-1, SSX-2, SSX4, TAG-72 (Buchsbaum, *et al.* (1999). *Clin Cancer Res* 5 (supl. 10): 3048s-3055s), TRAG-3 (Chen, *et al.* (2002). *Lung Cancer* 38:101), MBTAA (Basu, *et al.* (2003). *Int J Cancer* 105:377), un antígeno tumoral Smad, Imp-1, HPV-16 E7, c-erbB-2, antígeno nuclear codificado por VEB (EBNA)-1, timidina cinasa de herpes simple (HSVtk), isoforma sometida a corte y empalme de manera alternativa de XAGE-1 (L552S; Wang, (2001). *Oncogene* 20:7699), mutación de cambio del marco de lectura de TGF beta RII (Saeterdal, *et al.* (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255), mutación de cambio del marco de lectura de BAX (Saeterdal, *et al.* (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255).

Los transgenes pueden codificar adicionalmente para un producto génico, tal como CAIX, CD19, CD20, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44v7/8, CEA, EGF-RIII (variante 3 del receptor de factor de crecimiento epidérmico) EGP-2, erb-B2, erb-B2, 3, 4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, Her2/neu, IL-13R-a2, KDR, cadena ligera k, LeY, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, NKG2D, antígeno oncofetal (h5T4),

PSCA, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), fosfatasa ácida prostática (PAP), factor de transcripción Ets derivado del epitelio de la próstata (PDEF), TAA seleccionado como diana por AcM IgE, TAG-72 y VEGF-R2.

- 5 Alternativamente, los transgenes pueden incluir ARNip, moléculas antisentido y miARN por ejemplo. Los vectores lentivirales clínicamente útiles pueden expresar también un gen antisentido dirigido contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Levine *et al* 2006) y otros patógenos humanos importantes. Estas y otras aplicaciones útiles de rLV y vectores relacionados se han revisado y citado recientemente por Naldini (2011).
- 10 Los genes antisentido que pueden incluirse en un vector rLV pueden inhibir la expresión de: gen de la huntingtina (HTT), un gen asociado con atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (por ejemplo, atrofina 1, ATN1); receptor de andrógenos en el cromosoma X en atrofia muscular espinobulbar, ataxina humana 1, 2, 3 y 7, canal de calcio dependiente de voltaje Ca_v2.1 P/Q codificado por (CACNA1A), proteína de unión a TATA, cadena opuesta de ataxina 8, también conocida como ATXN8OS, isoforma beta de subunidad B reguladora de 55 kDa de serina/treonina-proteína fosfatasa 2A en ataxia espinocerebelosa (tipo 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17), FMR1 (retraso mental 1 asociado a cromosoma X frágil) en síndrome del cromosoma X frágil, FMR1 (retraso mental 1 asociado a cromosoma X frágil) en síndrome de ataxia/temblor asociado a cromosoma X frágil, FMR1 (retraso mental 2 asociado a cromosoma X frágil) o miembro 2 de la familia AF4/FMR2 en retraso mental por XE frágil; miotonina-proteína cinasa (MT-PK) en distrofia miotónica; frataxina en ataxia de Friedreich; un mutante del gen de superóxido dismutasa 1 (SOD1) en esclerosis lateral amiotrófica; un gen implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y/o la enfermedad de Alzheimer; apolipoproteína B (APOB) y proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), hipercolesterolemia; Tat de VIH, transactivador del gen de transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana, en infección por VIH; TAR de VIH, TAR de VIH, gen del elemento de respuesta del transactivador del virus de la inmunodeficiencia humana, en infección por VIH; receptor de quimiocina C-C (CCR5) en infección por VIH; proteína de la nucleocápside del virus del sarcoma de Rous (VSR) en infección por VSR, microARN específico del hígado (miR-122) en infección por virus de la hepatitis C; p53, lesión renal aguda o trasplante de riñón por función de injerto retardada o insuficiencia renal aguda por lesión de riñón; proteína cinasa N3 (PKN3) en tumores malignos sólidos metastásicos o recurrentes avanzados; LMP2, LMP2 también conocida como subunidad de proteosoma beta-tipo 9 (PSMB 9), melanoma metastásico; LMP7, también conocida como subunidad del proteosoma beta-tipo 8 (PSMB 8), melanoma metastásico; MECL1 también conocida como subunidad del proteosoma beta tipo 10 (PSMB 10), melanoma metastásico; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tumores sólidos; proteína de huso de cinesina en tumores sólidos, supresor de apoptosis en linfoma/LLC de células B (BCL-2) en leucemia mielógena crónica; ribonucleótido reductasa M2 (RRM2) en tumores sólidos; furina en tumores sólidos; cinasa de tipo polo 1 (PLK1) en tumores de hígado, diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) en infección por hepatitis C, beta-catenina en poliposis adenomatosa familiar; receptor adrenérgico beta2, glaucoma; RTP801/Redd1 también conocida como proteína 4 de transcrito inducible por daño en el ADN, en edema macular diabético (DME) o degeneración macular relacionada con la edad; receptor I del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1) en degeneración macular relacionada con la edad o neovascularización coroidea, caspasa 2 en neuropatía óptica isquémica no arterítica; proteína mutante queratina 6A N17K en paquioniquia congénita; secuencias génicas/de genoma del virus influenza A en infección por influenza; secuencias génicas/de genoma de coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS) en infección de SARS; secuencias génicas/de genoma del virus respiratorio sincitial en infección por virus respiratorio sincitial; secuencias génicas/de genoma de filovirus del Ébola en infección por Ébola; secuencias génicas/de genoma del virus de la hepatitis B y C en infección de hepatitis B y C; secuencias génicas/de genoma del virus del herpes simple (VHS) en infección por VHS, secuencias génicas/de genoma del virus Coxsackie B3 en infección por virus Coxsackie B3; silenciamiento de un alelo patógeno de un gen (silenciamiento específico de alelo) como torsina A (TOR1A) en distonía primaria, específico de alelo de HLA y de toda la clase I en trasplante; gen de rodopsina mutante (RHO) en retinitis pigmentosa heredada autosómica dominante (adRP); o el ácido nucleico inhibidor que se une a un transcrito de cualquiera de los genes o secuencias anteriores.

Por "aislado" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos, quiere decir que la molécula indicada está presente con 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 sujeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de manera perjudicial a las características básicas de la composición.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o las pruebas de la presente invención, en la presente memoria se describen procedimientos y materiales adecuados.

65 Todas las características dadas a conocer en la presente memoria pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica dada a conocer en la memoria descriptiva puede reemplazarse por una

característica alternativa que sirve para un fin igual, equivalente o similar. Por tanto, a menos que se establezca expresamente de otro modo, las características dadas a conocer (por ejemplo, un vector recombinante (por ejemplo, rLV), o partícula de virus recombinante, son un ejemplo de un género de características equivalentes o similares.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares “un/una”, “y” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un polinucleótido” incluye una pluralidad de tales polinucleótidos, la referencia a “un vector” incluye una pluralidad de tales vectores y la referencia a “un virus” o “partícula” incluye una pluralidad de tales viriones/partículas.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros dentro de tales intervalos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de los intervalos a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, para ilustrar, la referencia a una identidad de al menos el 1-10%, incluye el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, así como el 1,1%, el 1,2%, el 1,3%, el 1,4%, el 1,5%, etc., el 2,1%, el 2,2%, el 2,3%, el 2,4%, el 2,5%, etc., y así sucesivamente.

15 La referencia a un número con más (mayor) o menos que, incluye cualquier número mayor o menor que el número de referencia, respectivamente. Por tanto, por ejemplo, una referencia a menos de 40.000, incluye 39.999, 39.998, 39.997, etc. en sentido descendente hasta el número uno (1); y menos de 100, incluye 99, 98, 97, etc. en sentido descendente hasta el número uno (1).

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, todos los valores o intervalos numéricos incluyen fracciones de los valores y número enteros dentro de tales intervalos y fracciones de los números enteros dentro de tales intervalos a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, para ilustrar, la referencia a un intervalo numérico, tal como 2.000-40.000 incluye 2.000; 3.000; 4.000; 5.000, 6.000, etc. así como 2.100; 3.100; 4.100; 5.100; 6.100; etc., y así sucesivamente. La referencia a un intervalo de 20-100 incluye por tanto 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, etc., hasta e incluyendo 100, así como 21,1, 21,2, 21,3, 21,4, 21,5, etc., 22,1, 22,2, 22,3, 22,4, 22,5, etc., y así sucesivamente.

25 La referencia a una serie de intervalos incluye intervalos que combinan los valores de los límites de diferentes intervalos dentro de una serie. Por tanto, para ilustrar la referencia a una serie de intervalos de 20-100 o 100-1.000 (por ejemplo, 20 mM-100 mM; o 100 mM-1 M) incluye 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1.000, etc.

30 La invención se da a conocer generalmente en la presente memoria utilizando expresiones afirmativas para describir las numerosas realizaciones y aspectos. La invención también incluye específicamente realizaciones en las que se excluye contenido particular, en su totalidad o en parte, tal como sustancias o materiales, etapas y condiciones de procedimiento, protocolos o procedimientos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones o aspectos de la invención, se excluyen materiales y/o etapas de procedimiento. Por tanto, aun cuando la invención no se expresa generalmente en la presente memoria en cuanto a lo que la invención no incluye, no obstante se dan a conocer en la presente memoria aspectos que no se excluyen expresamente en la invención.

35 Se han descrito varias realizaciones de la invención. No obstante, un experto en la materia, sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversas utilizaciones y condiciones. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar el alcance de la invención reivindicada.

50 Ejemplos

Ejemplo 1

55 Se producen normalmente vectores de lentivirus mediante procedimientos de transfección utilizando un procedimiento de precipitación con fosfato de calcio en un sistema de cultivo de células adherentes (3, 4). Sin embargo, cuando se fabrican Lentivector para aplicación clínica, particularmente para fases tardías de aplicaciones clínicas, es crítico fabricar los vectores en un sistema de producción en suspensión libre de suero que puede aumentarse a escala para garantizar la cantidad de producción del vector y potenciar el perfil de seguridad del vector fabricado.

60 Para superar las limitaciones existentes de los sistemas de producción de Lentivector disponibles actualmente, se da a conocer en la presente memoria un sistema de cultivo celular en suspensión, libre de suero escalable que produce Lentivector de alto título. La primera etapa en este nuevo sistema de producción escalable es el desarrollo de una línea celular que puede cultivarse en condición libre de suero y produce altos niveles de Lentivector. Se planteó la hipótesis de que adaptar células HEK 293T a cultivo en suspensión libre de suero debe ser viable ya que estas células están usándose ampliamente en la actualidad en la producción de vectores virales. Para conseguir este objetivo, se diseñó un protocolo de adaptación por etapas y se evaluaron de manera

sistémica varios medios de cultivo celular libres de suero disponibles comercialmente y la capacidad de células HEK 293T para crecer de manera robusta en estos medios. Se encontró que un medio (CD293) supera a todos los demás sometidos a prueba en el soporte de crecimiento celular sano, no agregado tras adaptación con una velocidad de crecimiento rápida (figura 2, panel A). La condición de cultivo celular optimizado soporta una alta densidad celular y un crecimiento celular constante (figura 2, paneles B y C). Las células adaptadas se han cultivado en condiciones de cultivo en suspensión libre de suero durante varios meses, y se ha desarrollado un banco de células de investigación.

Se han producido vectores lentivirales mediante precipitación con fosfato de calcio y cotransfección de 2 a 5 plásmidos dentro de células diana. Aunque la última generación del sistema de producción de múltiples plásmidos (sistema de autoactivación) ha mostrado ser versátil en la producción de Lentivector con un riesgo reducido de generación de lentivirus de replicación competente, la coprecipitación con calcio impone una limitación en la fabricación a gran escala. La coprecipitación con fosfato de calcio de ADN, desarrollada hace más de 40 años (5), funciona bien para cultivo celular adherente a escala de investigación. Sin embargo, no proporciona niveles eficaces de transfección en cultivos celulares en suspensión libres de suero y es muy difícil de aumentar a escala.

La polietilenimina (PEI) está disponible comercialmente y se sometió a prueba para detectar la introducción eficaz de ADN de plásmido en las células HEK 293T recién adaptadas (6). Los experimentos iniciales revelaron que los medios seleccionados para cultivo celular libre de suero no soportaban ninguna transfección utilizando PEI como reactivo de transfección, los esfuerzos se dirigieron entonces a identificar un medio libre de suero que soportara la transfección de las células utilizando PEI. Aunque un tipo de medio particular examinado soportaba la transfección (figura 3, panel D), este medio no soportaba el crecimiento en suspensión de las células en cultivo celular a largo plazo (datos no mostrados). Se diseñó y desarrolló por tanto un sistema de dos etapas para producir Lentivector en suspensión libre de suero: en primer lugar, se hacen crecer las células en el medio que soporta un crecimiento robusto y rápido en suspensión en condiciones libres de suero. En segundo lugar, el medio de cultivo celular o bien se reemplaza o bien se mezcla con un segundo tipo de medio que soporta la transfección basada en PEI. En esfuerzos por optimizar la eficacia de transfección de PEI, se evaluaron varias formas diferentes de moléculas de PEI de diferentes proveedores comerciales. Aunque se ha utilizado PEI lineal de peso molecular pequeño, tal como PEI lineal de 25 kDa, en varios casos en la fabricación de productos biológicos (6), se plantea la hipótesis de que PEI ramificada puede presentar mayores eficacias de suministro para transfecciones de plásmidos múltiples, debido a la disponibilidad de múltiples grupos funcionales por molécula. Entre las diferentes moléculas de PEI evaluadas, una PEI ramificada pequeña, PEI MAX (40.000 kDa, Polyscience.com) dio como resultado la eficacia de transfección más alta de las células HEK 293T adaptadas en el medio identificado (figura 4). Optimizando la condición de transfección utilizando PEI MAX, se logró una transfección celular de casi el cien por cien (figura 5, panel A). Los datos semicuantitativos preliminares indicaron que se produjeron vectores lentivirales al nivel de aproximadamente 1×10^6 unidades de transducción por ml en el procedimiento de producción actual. Por lo que conocen los inventores, se cree que las técnicas innovadas en su laboratorio representan el primer procedimiento de producción de Lentivector verdaderamente escalable en un sistema de cultivo celular en suspensión libre de suero.

Se hizo un esfuerzo adicional para mejorar la productividad específica de vector. Se evaluaron parámetros tales como densidad celular en la transfección, cantidad de ADN total utilizada para la transfección, procedimientos para preparar complejo de ADN/PEI, tiempo de recolección del vector. Se cultivaron las células HEK 293 T adaptadas en medio CD293 (complementado con glutamina 4 mM) hasta la densidad de $3E+06/ml$; se intercambió el medio de cultivo celular a SFM4Transfx-293 (complementado con glutamina 4 mM) (HyClone™, ThermoScientific) o bien mediante centrifugación y resuspensión o bien utilizando una técnica de filtración de flujo tangencial, se ajustó la densidad celular a $1,5E+06$ células por ml y se incubaron en un incubador. Para el cultivo celular en frascos centrifugadores, se utilizaron 130 RPM/min y el 8% de CO_2 . Se utilizó un total de 12 ug de ADN para transfectar $1,5E+06$ células y la razón molar de ADN de los cuatro plásmidos era de 1:1:1:1. Se preparó polietilenimina "MAX" (Polysciences.com) utilizando disolución tamponada con Tris a una concentración de 1 mg/ml y se ajustó el pH a 7,15. Se añadió la mezcla de ADN a la disolución de PEI con una razón en masa de 1:1, y se mezcló la disolución suavemente y se incubó adicionalmente de manera breve; se diluyó adicionalmente el cóctel de ADN/PEI mezclado utilizando disolución de Tris 5 mM, pH 7,15; el volumen final de la disolución de ADN/PEI diluida es 1/15 del medio de cultivo celular que va a transfectarse. Entonces se añadió la disolución de ADN/PEI al cultivo celular en suspensión a una razón en volumen de 1/15, entonces se recolectó el medio de cultivo celular a las 48 horas, 72 horas y 96 horas tras la transfección. Entonces se transdujeron células HEK 293 con las recolecciones de cultivo celular recogidas y se analizaron para determinar la expresión de eGFP utilizando FACS. Se observó una producción de vectores superior, se produjeron más de $6E+06$ UT/ml a partir de placas y frascos centrifugadores, una plataforma de cultivo celular más escalable.

Se utilizan ampliamente técnicas de cromatografía en columna en la industria para purificar materiales biológicos a gran escala. Los Lentivector se purifican actualmente o bien mediante técnicas de centrifugación para precipitar los vectores (3) o bien mediante técnicas de cromatografía en columna para aislar las partículas (6). Los procedimientos basados en cromatografía en columna abordan los problemas de escala en la fabricación cuando se utilizan técnicas de centrifugación clásicas, sin embargo, sigue existiendo todavía el reto de aislar Lentivector

de alta pureza. En la cromatografía en columna de intercambiador aniónico típica, se cargó el Lentivector recolectado en la columna, se lavó con una baja concentración de sal (tal como NaCl 100 mM), luego se eluyeron los vectores con tampón de alta concentración de sal (de NaCl 650 mM a NaCl 1 M) (6). Se eluyeron conjuntamente muchas proteínas celulares utilizando este tipo de procedimientos de cromatografía (figura 8, carril 2). Se notificó un procedimiento de cromatografía en columna modulada por PEG para la purificación de vectores virales adenoasociados (7), la pureza del vector de VAAr aislado a partir de la cromatografía modulada por PEG mejoró significativamente. Se planteó la hipótesis de que la cromatografía modulada por PEG debe poder aplicarse también a la separación de Lentivector de proteínas celulares para potenciar la pureza del vector puesto que la separación se basa en el tamaño de las moléculas aun cuando las resinas utilizadas no sean resinas de exclusión molecular.

Se desarrolló un procedimiento de cromatografía en columna modulada por PEG utilizando resinas de DEAE Sepharose Fast Flow. Se recuperaron vectores lentivirales a partir de este procedimiento a más del 95% de unidades de transducción basándose en el análisis de FACS de células que expresan eGFP (figura 5), mientras que las purezas de vector mejoran 20 veces con respecto a las purezas utilizando cromatografía en columna tradicional (figura 6 y 7). Aunque se empleó una resina intercambiadora aniónica débil para desarrollar el protocolo de purificación modulada por PEG para Lentivector, se cree que los principios detrás de este protocolo deben aplicarse a cualquier resina de cromatografía en columna, incluyendo resina de afinidad, intercambiadores aniónicos fuertes y débiles, intercambiadores catiónicos fuertes y débiles y otras resinas, siempre que el vector se una a la resina. Basándose en la cromatografía en columna modulada por PEG innovadora, se diseñó y desarrolló un procedimiento de purificación escalable completo. En la figura 1 se proporciona un diagrama de flujo de los procedimientos descritos en la presente memoria.

Las técnicas descritas anteriormente son etapas de procedimiento completamente escalables que permitirán la fabricación de cantidades suficientes de vectores rLenti de alta cantidad que se necesitan para soportar las fascinantes aplicaciones clínicas que están surgiendo. De manera sorprendente, los procedimientos y las composiciones de rLV producidas superan la capacidad de fabricación disponible actualmente para vectores lentivirales y satisface los requisitos de calidad de productos en investigación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de vectores lentivirales recombinantes (rLV) a gran escala, que comprende;
- 5
- a) recolectar vectores virales recombinantes que comprenden un transgén a partir de un cultivo en suspensión libre de suero;
 - b) clarificar la cosecha de la etapa a) por medio de filtración;
 - 10 c) recolectar el filtrado de la etapa b) y opcionalmente exponer dicho filtrado a digestión con nucleasas para eliminar impurezas de ADN/ARN;
 - d) someter el filtrado de la etapa c) a cromatografía en columna de intercambio aniónico modulada por PEG, aislando de este modo dichos vectores rLV;
 - 15 e) purificar adicionalmente los vectores rLV obtenidos de la etapa d) por medio de filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón;
 - 20 f) someter el filtrado de la etapa e) a cromatografía en columna de exclusión molecular para purificar adicionalmente dichos vectores rLV;
 - g) someter los vectores rLV de la etapa f) a filtración de flujo tangencial, y obtener de este modo el título de vectores final;
 - 25 h) filtrar la disolución de vectores rLV obtenida de la etapa g) a través de un filtro de diámetro de poro de 0,20 a 0,5 μm ; y
 - i) recoger vectores rLV purificados.
- 30
2. Procedimiento para la purificación de vectores lentivirales recombinantes (rLV) a gran escala, que comprende;
- 35 a) recolectar vectores virales recombinantes que comprenden un transgén a partir de cultivo en suspensión libre de suero;
 - b) clarificar la cosecha de la etapa a) por medio de filtración;
 - 40 c) someter la suspensión clarificada de la etapa b) a filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón;
 - d) recolectar el filtrado de la etapa c) y opcionalmente exponer dicho filtrado a digestión con nucleasas para eliminar impurezas de ADN/ARN;
 - 45 e) someter el filtrado de la etapa d) a cromatografía en columna de intercambio aniónico modulada por PEG, aislando de ese modo dichos vectores rLV;
 - f) someter los vectores rLV obtenidos de la etapa e) a cromatografía en columna de exclusión molecular para purificar adicionalmente dichos vectores rLV;
 - 50 g) someter los vectores rLV de la etapa f) a filtración de flujo tangencial, y obtener de ese modo el título de vectores final;
 - h) filtrar la disolución de vectores rLV obtenida de la etapa g) a través de un filtro de diámetro de poro de 0,20 a 0,5 μm ; y
 - 55 i) recoger vectores rLV purificados.
- 60
3. Procedimiento para la purificación de vectores lentivirales recombinantes (rLV) a gran escala, que comprende;
- a) recolectar vectores virales recombinantes que comprenden un transgén a partir de cultivo en suspensión libre de suero;
 - 65 b) clarificar la cosecha de la etapa a) por medio de filtración;

- c) someter la suspensión clarificada de la etapa b) a filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón;
- 5 d) recolectar el filtrado de la etapa c) y opcionalmente exponer dicho filtrado a digestión con nucleasas para eliminar impurezas de ADN/ARN;
- e) someter el filtrado de la etapa d) a cromatografía en columna de intercambio aniónico modulada por PEG, aislando de este modo dichos vectores rLV;
- 10 f) purificar adicionalmente los vectores rLV obtenidos de la etapa e) por medio de filtración de flujo tangencial para reducir el volumen e intercambiar el tampón;
- 15 g) someter el filtrado de la etapa f) a cromatografía en columna de exclusión molecular para purificar adicionalmente dichos vectores rLV;
- h) someter los vectores rLV de la etapa g) a filtración de flujo tangencial, y obtener de este modo el título de vectores final;
- 20 i) filtrar la disolución de vectores rLV obtenida de la etapa h) a través de un filtro de diámetro de poro de 0,20 a 0,5 mm; y
- j) recoger vectores rLV purificados.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho transgén
- a) codifica para un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste en un ARNip, una molécula antisentido, un miARN, una ribozima y un ARNhp; o
- 30 b) 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 descarboxilasa de cadena ramificada, 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 de 65 kDa específica de epitelio pigmentario de la retina (RPE65), proteína H, proteína T, una secuencia de regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y una secuencia de ADNc de distrofina.
- 35 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho transgén codifica para
- 40 a) 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 (G-CSF), 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 plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), $TGF\beta$, activinas, inhibinas, proteína morfogenética 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 de líneas celulares gliales (GDNF), neurturina, agrina, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, Sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa;
- 55 b) un producto génico seleccionado de entre el grupo que consiste en trombopoyetina (TPO), interleucinas (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, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, receptores de células T, receptores de células T quiméricas, receptores de células T de cadena sencilla, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), CCR5 y moléculas de CMH de clase I y clase II;
- 60 c) un producto génico seleccionado de entre factor VIII y factor IX;
- 65 d) un antígeno asociado a tumor (TAA); o

- 5 e) un producto génico seleccionado de entre el grupo que consiste en CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44v7/8, CEA, EGF-RIII (variante 3 de receptor de factor de crecimiento epidérmico), EGP-2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, Her2/neu, IL-13R-a2, KDR, cadena ligera k, LeY, molécula de adhesión celular L1, MAGEA1, mesotelina, MUC1, NKG2D, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, TAA seleccionado como diana por AcM IgE, TAG-72 o VEGF-R2.
- 10 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos vectores rLV son producidos por
- 15 a) células de mamífero; o
- b) células HEK 293T (ATCC); HEK293F (Life Technologies); HEK293 (ATCC); 293S (ATCC), BHK (ATCC), BHK-21 (ATCC), CHO (ATCC), CHO/dhFr- (ATCC)1 o CHO K1 (ATCC).
- 20 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que
- a) dicho cultivo en suspensión libre de suero comprende un medio de crecimiento celular libre de suero; o
- 25 b) dicho medio de crecimiento libre de suero se selecciona de entre: FreeStyle™293 (Gibco^R, Life Technologies), DMEM/F12 (Gibco^R, Life Technologies), SFM4Transfx-293 (HyClone™, ThermoScientific), CDM4HEK293 (HyClone™, ThermoScientific), StemPro-34SFM (Gibco^R, Life Technologies), FreeStyle F17 (Gibco^R, Life Technologies), 293SFM II (Gibco^R, Life Technologies) y CD293 (Gibco^R, Life Technologies).
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha nucleasa comprende
- a) una endonucleasa, una exonucleasa o una combinación de las mismas;
- b) una desoxirribonucleasa, una ribonucleasa o una combinación de las mismas; o
- 35 c) benzonase o una ADNasa.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha cromatografía en columna de intercambio aniónico comprende una cromatografía en columna de intercambio aniónico débil.
- 40 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha cromatografía en columna de intercambio aniónico modulada por PEG comprende:
- i) ajustar el filtrado de la etapa c) a una disolución de unión, en el que dicha disolución de unión comprende opcionalmente PEG, y poner en contacto dicho filtrado con la columna de intercambio aniónico uniendo de ese modo los vectores virales a la columna de intercambio aniónico,
- 45 ii) lavar los vectores virales unidos para eliminar impurezas con una disolución de lavado que comprende PEG o una disolución que comprende PEG y una sal; y
- iii) eluir los vectores virales de la columna de intercambio aniónico con una disolución de elución.
- 50 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que
- a) dicha disolución de unión comprende PEG en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 0% y el 10% en peso/volumen, o entre aproximadamente el 0% y el 5% en peso/volumen, o entre aproximadamente el 0% y el 2% en peso/volumen;
- 55 b) dicha disolución de unión comprende PEG que presenta un peso molecular comprendida entre aproximadamente 2.000 kDa y aproximadamente 40.000 kDa;
- c) dicha disolución de lavado comprende PEG en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 1% y el 10% en peso/volumen, o entre aproximadamente el 1% y el 5% en peso/volumen, o entre aproximadamente el 1% y el 2% en peso/volumen;
- 60 d) dicha disolución de lavado comprende PEG que presenta un peso molecular comprendido entre aproximadamente 2.000 kDa y aproximadamente 40.000 kDa;
- e) dicha disolución de elución comprende PEG en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 0% y el 20% en peso/volumen; o
- 65 f) dicha disolución de elución comprende PEG que presenta un peso molecular comprendido entre

aproximadamente 2.000 kDa y aproximadamente 40.000 kDa.

12. Procedimiento según las reivindicaciones 10 u 11, en el que

- 5 a) dicha disolución de unión, de lavado o de elución comprende además una sal; o
b) dicha disolución de elución comprende sal en una cantidad comprendida entre aproximadamente 500 mM y aproximadamente 1.000 mM;

10 en el que preferentemente dicha sal comprende cloruro de sodio o cloruro de potasio.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha filtración de la etapa i) es a través de un filtro que presenta un diámetro de poro de 0,20 μm ; un diámetro de poro de 0,22 μm ; o un diámetro de poro de 0,45 μm .

15

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos vectores rLV son producidos a

- a) aproximadamente 5×10^5 unidades infecciosas (UI)/ml;
b) aproximadamente 6×10^6 unidades infecciosas (UI)/ml; o
20 c) aproximadamente 3×10^8 unidades infecciosas (UI)/ml.

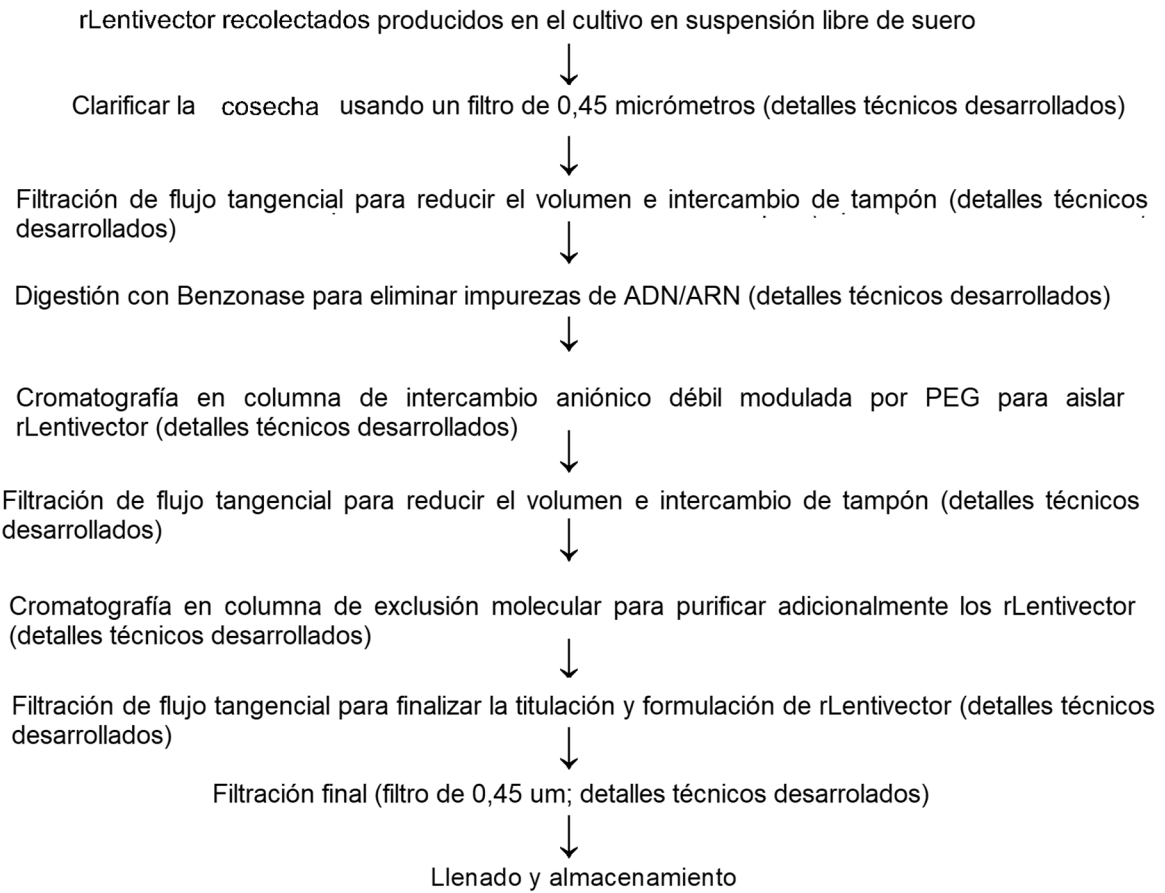


Figura 1A

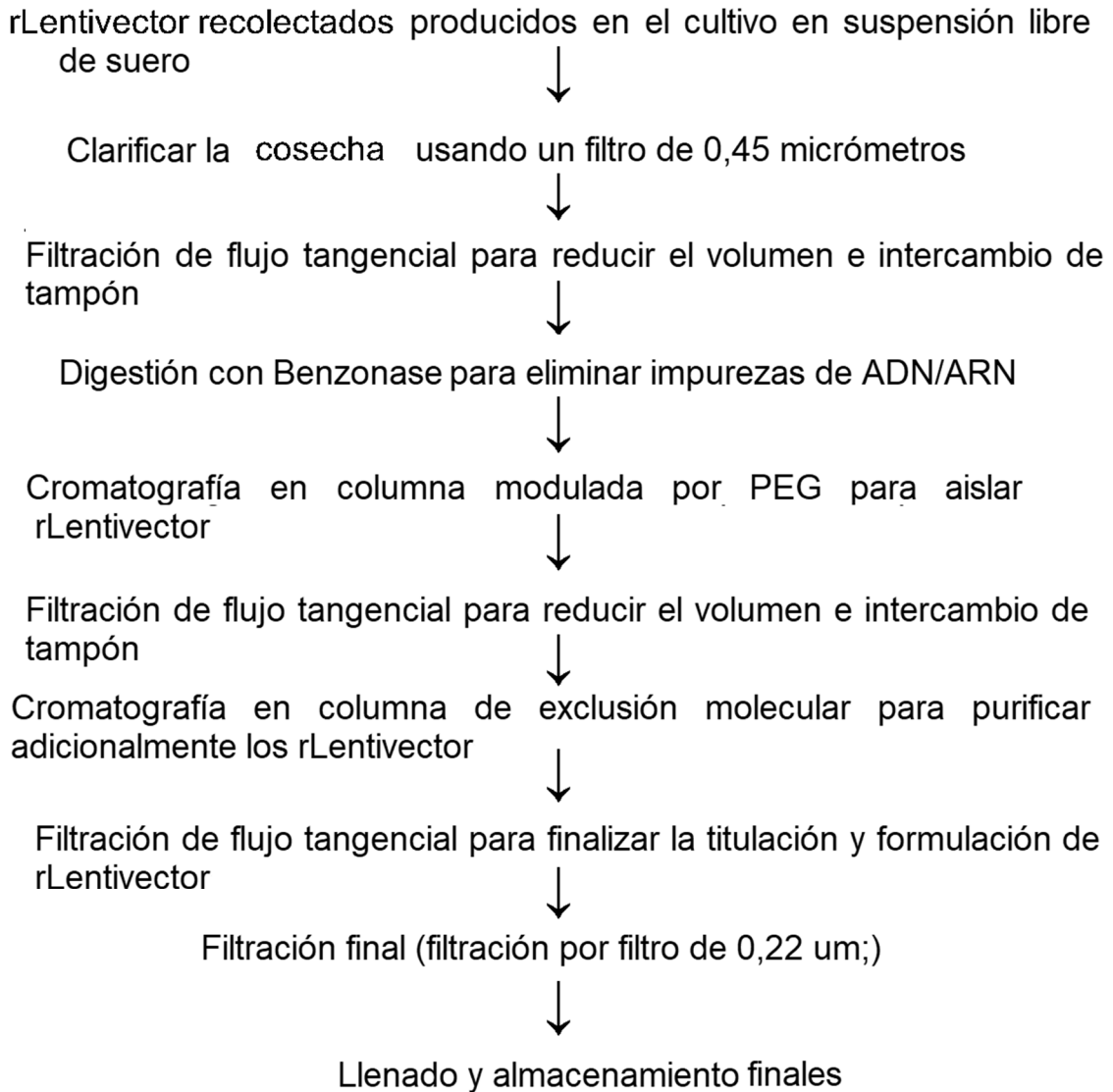


Figura 1B

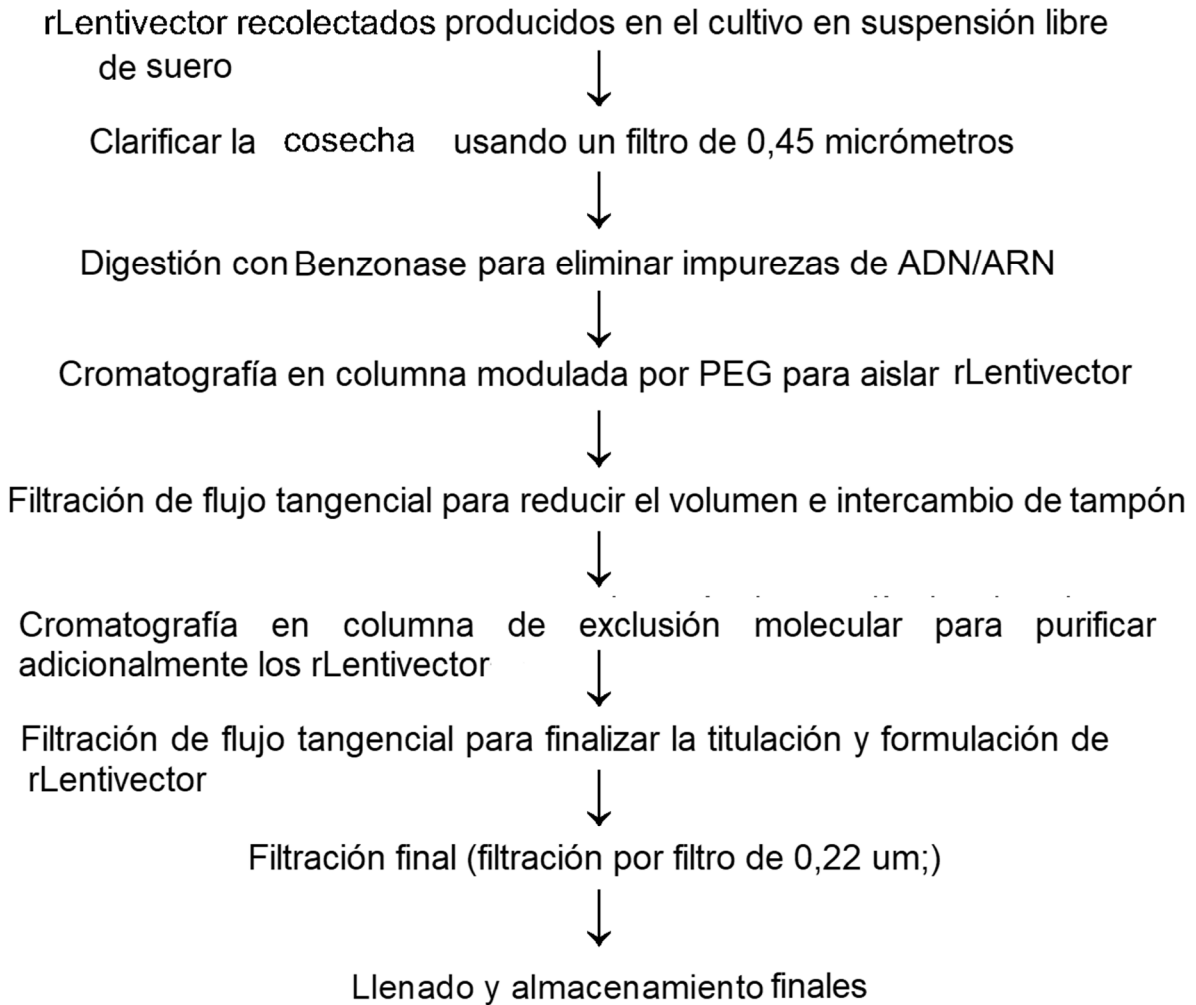


Figura 1C

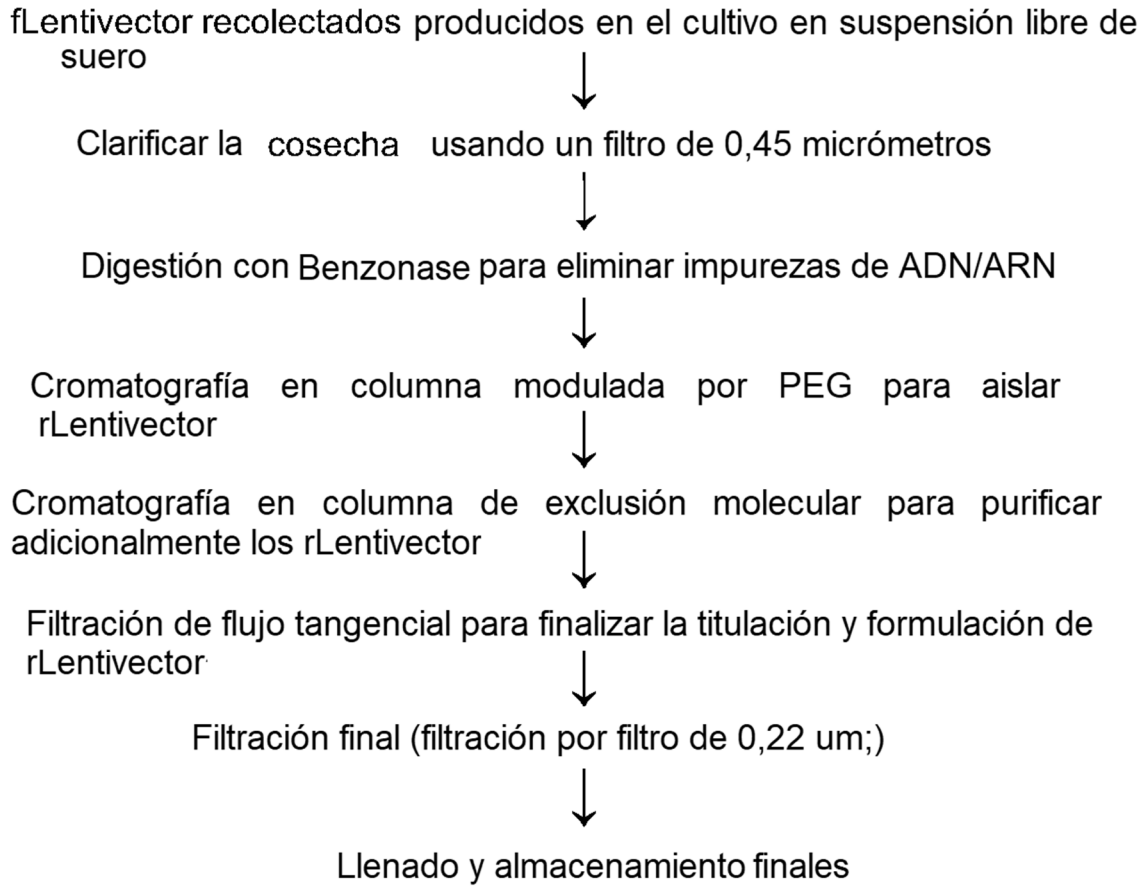


Figura 1D

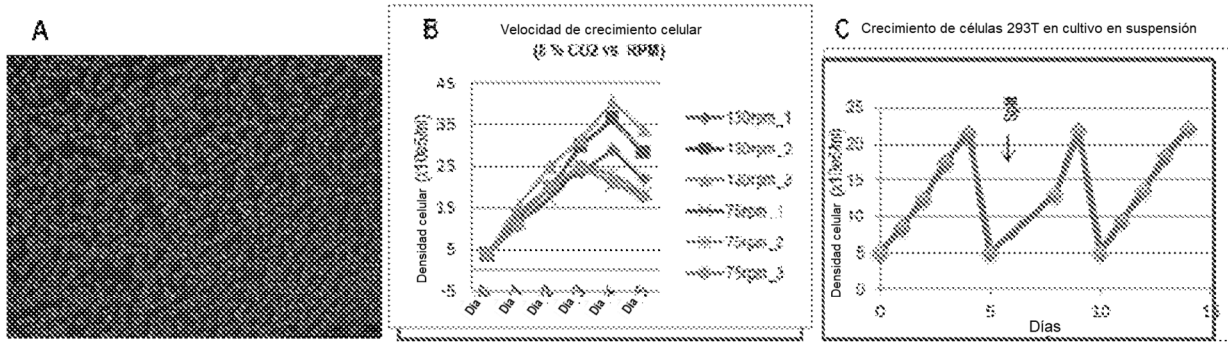


Figura 2

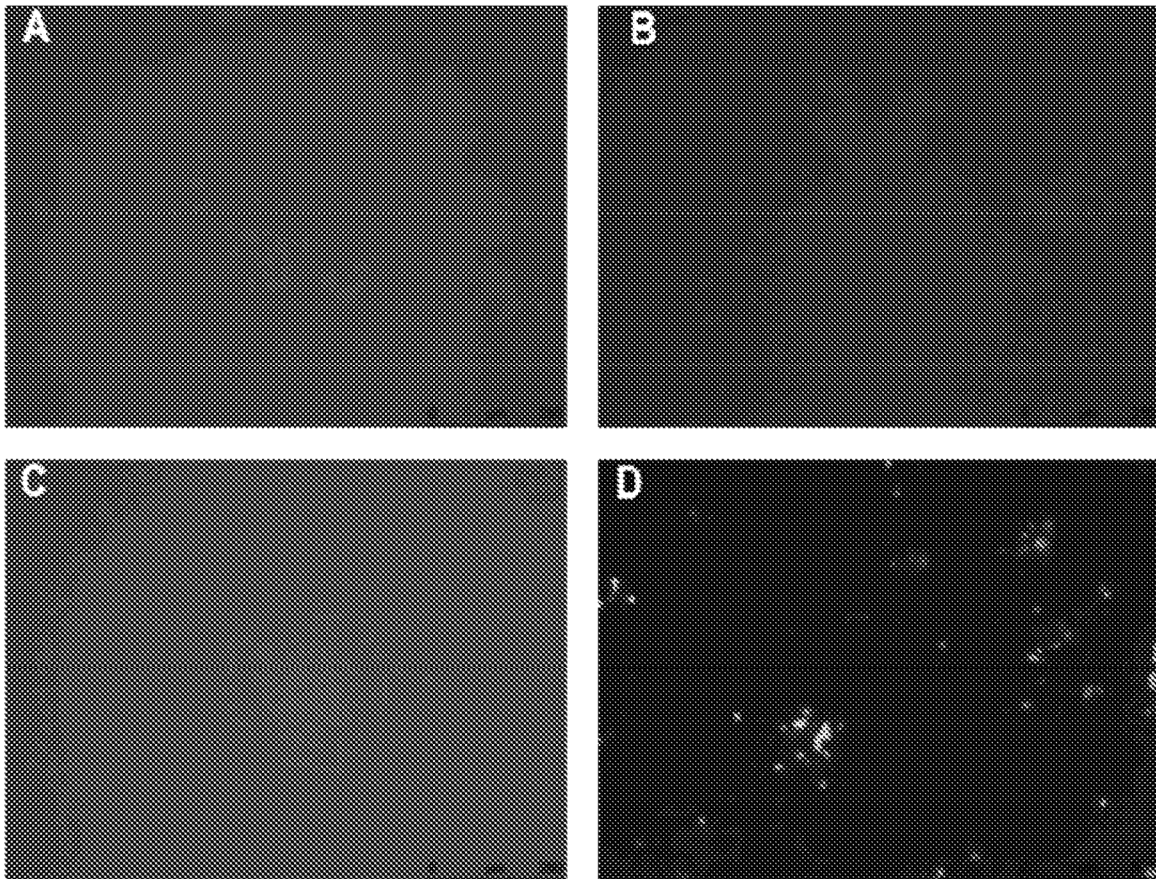


Figura 3

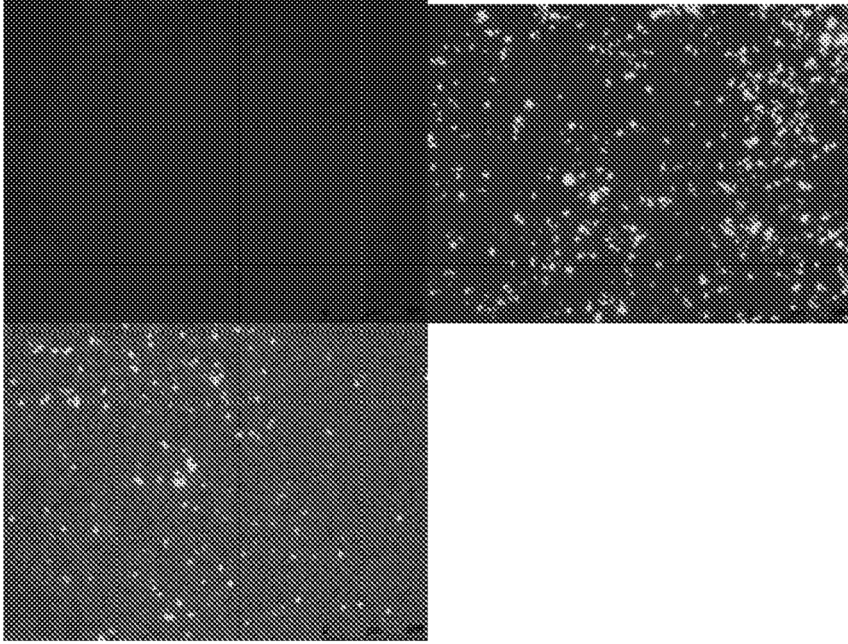


Figura 4

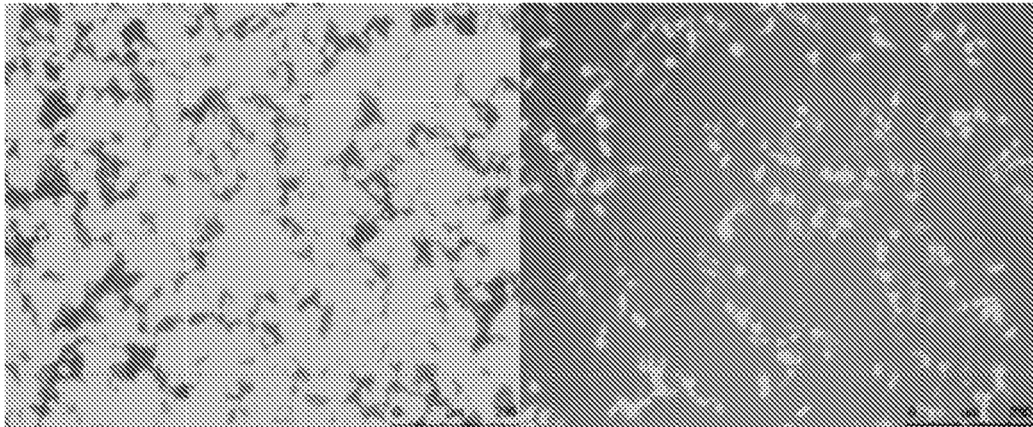


Figura 5

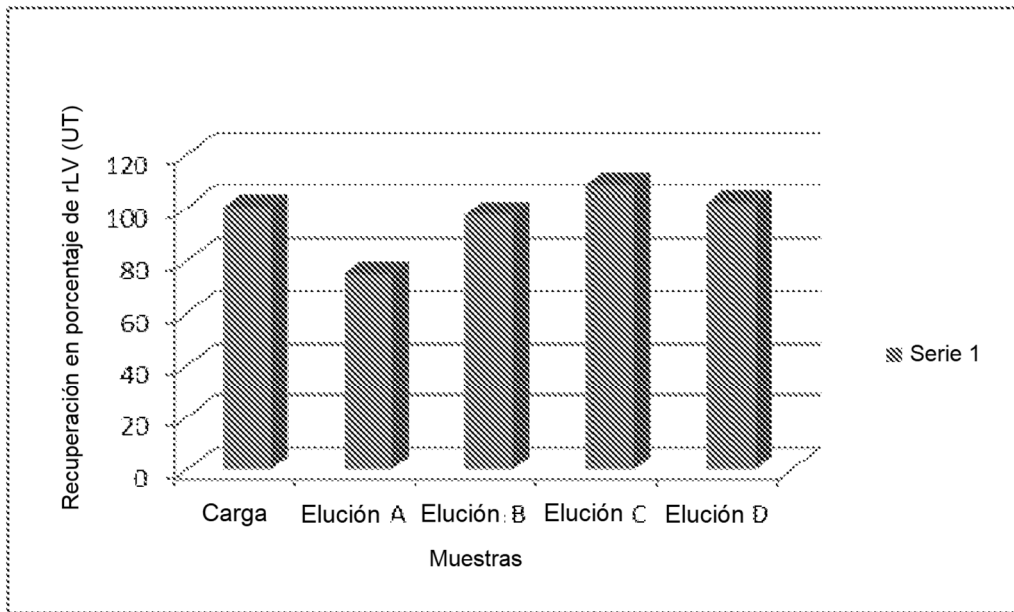
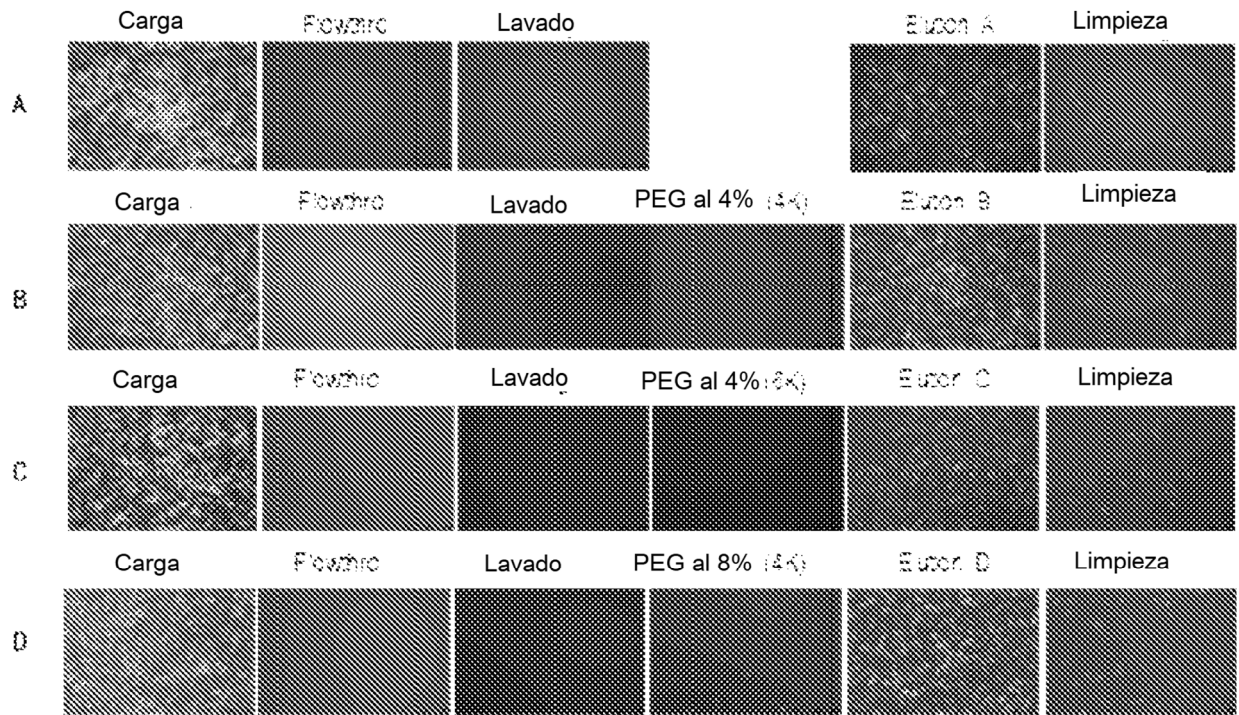
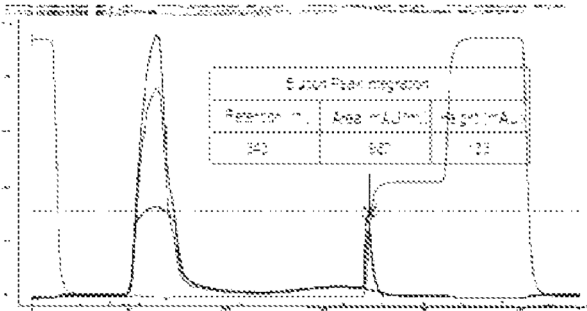
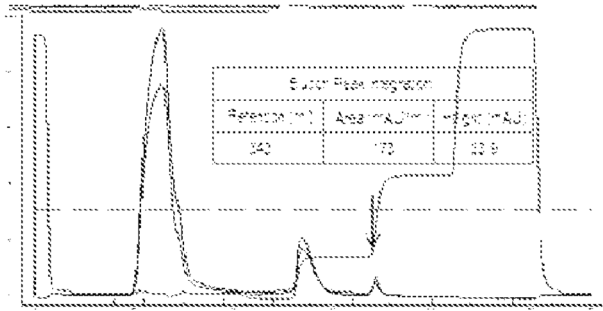


Figura 6

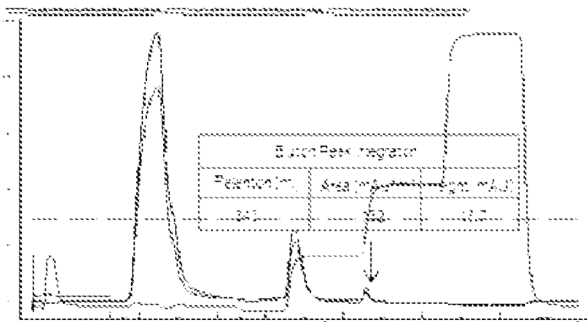
A: Manus PEG



B: PEG al 4% (4KD)



C: PEG al 4% (6KD)



D: PEG al 8% (4KD)

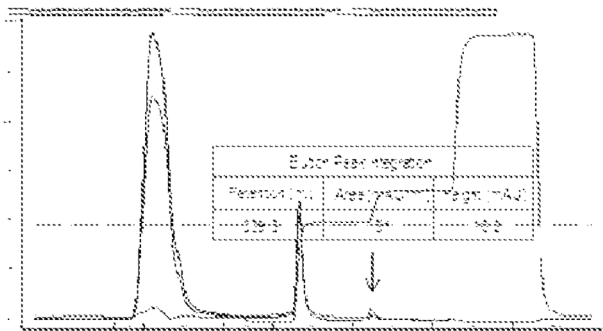


Figura 7

Carga
Elución A
Elución B
Elución C
Elución D

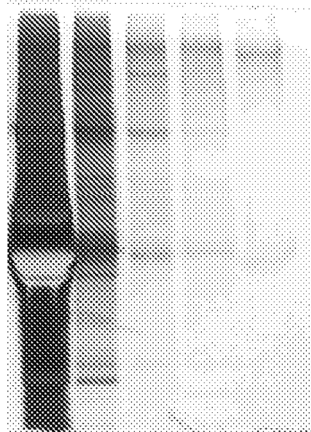


Figura 8

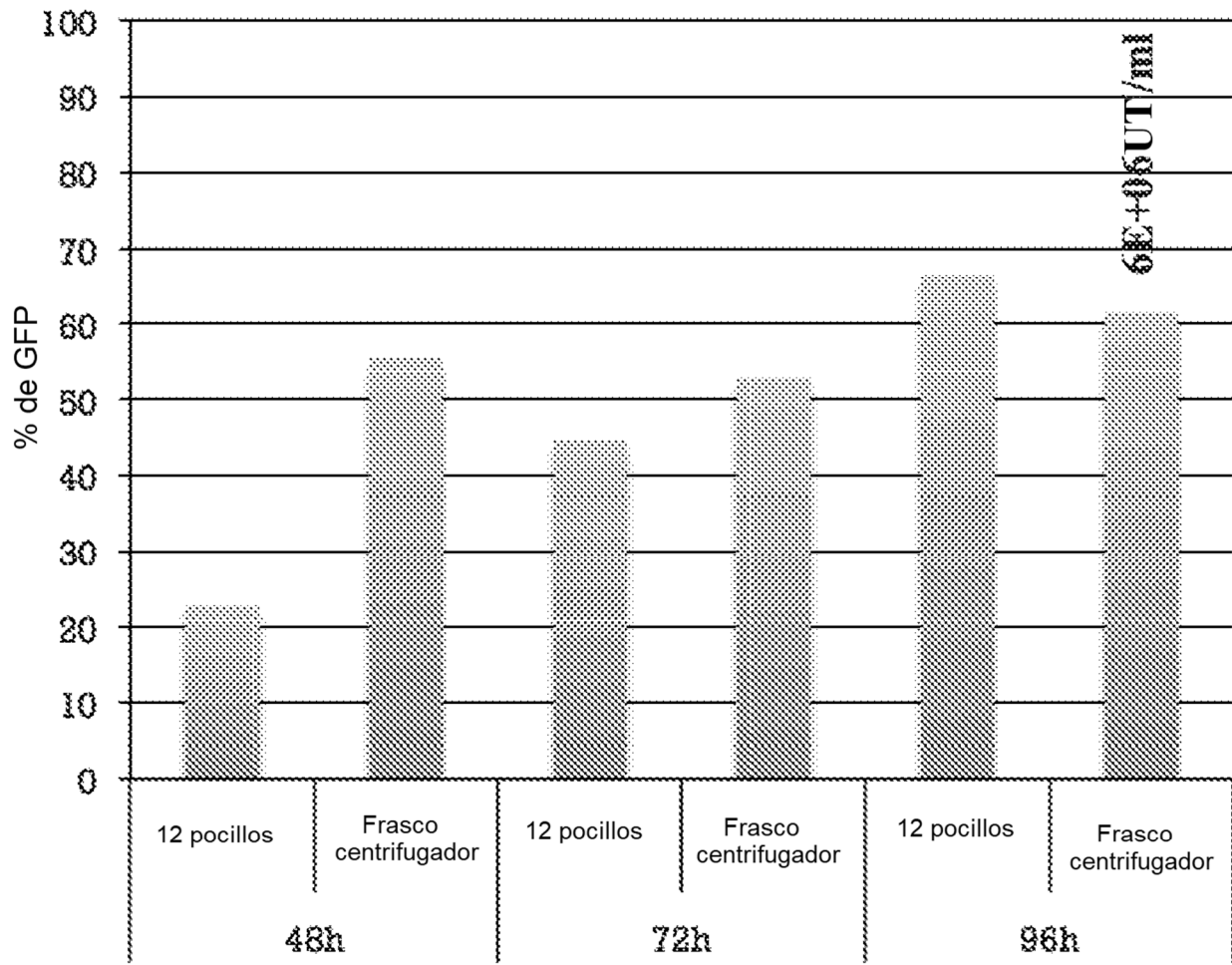


Figura 9