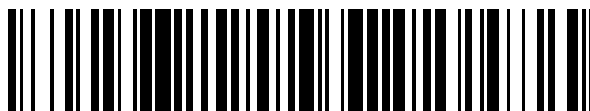


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 975**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2012 PCT/IB2012/001807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13014537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2012 E 12768898 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2737060**

54 Título: **Método para la producción de partículas retrovíricas útiles para transducir células eucariotas**

30 Prioridad:

27.07.2011 US 201161512289 P

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

11.10.2019

73 Titular/es:

**FLASH THERAPEUTICS (100.0%)
3, rue des Satellites, Canal Biotech 2
31400 Toulouse, FR**

72 Inventor/es:

**BOUILLE, PASCALE;
VERGNAULT, HÉLÈNE;
GAYON, RÉGIS y
MOAL, YOHANN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 726 975 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

Método para la producción de partículas retrovíricas útiles para transducir células eucariotas

5 Remisión a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/512289, presentada el miércoles 27 de julio de 2011.

10 Introducción

La presente invención proporciona un método para la producción de partículas retrovíricas basadas en ARN. Las composiciones de vector vírico resultantes son de un alto título y pureza y pueden usarse para la transducción de células eucariotas minimizando al mismo tiempo los cambios fenotípicos perjudiciales que se producen típicamente después de la transducción de células diana, tales como pérdida de una subpoblación de células transducidas y efectos sobre la proliferación, viabilidad y diferenciación de las células transducidas.

Antecedentes de la invención

20 El uso de vectores basados en virus ha llegado a ser un método de suministro crucial tanto para aplicaciones *in vitro* en el descubrimiento de fármacos, ensayos clínicos *in vivo* y *ex vivo* como para genoterapia. Los vectores víricos están dentro de dos categorías principales: vectores de integración, que se insertan así mismos en el genoma destinatario y vectores no integrantes, que habitualmente forman un elemento genético extracromosómico. Los vectores de integración tales como vectores gamma-retrovíricos (RV) y vectores lentivíricos (LV) se heredan de forma estable. Los
25 vectores no integrantes, tales como vectores adenovíricos (ADV) y vectores de virus adenoasociado (AAV) se pierden rápidamente de las células que se dividen rápidamente. Algunos factores que influyen en la elección de un vector particular, incluyen su capacidad de empaquetado, su rango de hospedador, su perfil de expresión génica, su eficacia de transducción y su capacidad de provocar respuestas inmunitarias, lo que es particularmente problemático si se necesitan administraciones y transducciones repetidas. Algunos de estos parámetros pueden ajustarse o controlarse.
30 Un parámetro es el uso de vectores altamente concentrados, pero también altamente purificados, para permitir la transducción eficaz de las células y para evitar las respuestas celulares específicas debidas a los contenidos diferentes al propio vector.

Los métodos actuales usados para producir y concentrar los vectores basados en virus no son óptimos para conservar la integridad del vector y la calidad del lote. De hecho, habitualmente se concentran lotes experimentales a pequeña escala por métodos simples basados en ultracentrifugación o centrifugación en unidades centrales listas para su uso. Dichos lotes se mencionan en este documento como lotes A-Serum (A-S) y B-Serum (B-S) y los procesos usados para producir dichos lotes se describen en la figura 4A. Esos métodos también concentran desechos celulares, fragmentos de membrana y proteínas secretadas por las células productoras y del medio de cultivo, incluyendo suero y son
40 inadecuados para producir lotes de vector en buenas prácticas de fabricación (GMP). Un inconveniente principal de estos lotes es su incapacidad de permitir una alta eficacia de transducción de una manera reproducible de algunas células no proliferantes tales como neuronas, macrófagos o células madre hematopoyéticas cuando se usa una multiplicidad baja o media de infección (M.O.I.). Habitualmente, los científicos se centran en el seudotipado de los vectores o las optimizaciones del protocolo de transducción para mejorar la eficacia de transducción (Janssens *et al.*,
45 2003) aunque el uso de mayores M.O.I. es la clave para alcanzar altos niveles de transducción. Sin embargo, como dicho lote B-S induce toxicidad celular (Selvaggi *et al.*, 1997; Reiser, 2000; Baekelandt *et al.*, 2003), los resultados de la eficacia de transducción con este tipo de producto B-S son siempre un equilibrio entre el nivel de transducción y la toxicidad resultante en células diana. Además, otro inconveniente de los vectores retrovíricos o lentivíricos producidos concentrados por técnicas clásicas es la incapacidad de que las células madre transducidas, particularmente células madre hematopoyéticas, progresen en las rutas de diferenciación después de la transducción.
50

Merten *et al.* (2010) usaron un proceso posterior basado en varias etapas basadas en membrana y cromatográficas, pero con un proceso de producción que usa un medio con un 10 % de suero, que es una diferencia crítica entre el proceso de Merten *et al.* y el proceso desarrollado de acuerdo con la presente invención. La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para la transducción de células usando vectores retrovíricos o lentivíricos que muestran un alto nivel de pureza. Dichas composiciones y métodos no tienen impacto perjudicial sobre la diferenciación de las células madre en las células especializadas.
55

Logan AC *et al.*, "Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors", 2004, Human gene therapy 15:976-988, han analizado varias variables implicadas en el diseño y producción de vectores lentivíricos tales como construcciones de vector, cantidades de plásmido y el punto temporal de la colección de sobrenadante individual o doble.
60

Segura MM *et al.*, "Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification", 2007, Biotechnology and bioengineering, 48:789-799, se refiere al uso de una línea celular específica (293ENBA-1) para mejorar la producción de vectores lentivíricos. Los parámetros optimizados
65

en este trabajo eran las relaciones plasmídicas, los tiempos de recolección (cada 24 h) y la densidad celular en el momento de la transfección.

5 Geraerts M *et al.*, "Upscaling of lentiviral vector production by tangential flow filtration", 2005, Journal of gene medicine, 7:1299-1310, se refiere a la normalización y el aumento de escala de los métodos de producción de vectores lentivíricos, en medio sin suero.

10 La etapa de producción tiene un gran impacto sobre el producto concentrado final ya que proporciona la materia prima que se somete posteriormente a las etapas de concentración y purificación. La producción podría realizarse con o son suero, con o sin inducción con butirato de sodio y el sobrenadante puede recogerse una vez 48 h después de la transfección o dos veces 64 h y 88 h después de la transfección, por ejemplo (Cooper *et al.*, 2011). La desventaja principal de dichos tiempos de recolección es la ausencia de consideración de la semivida de la partícula de vector, y las diversas condiciones tienen un gran impacto sobre el contenido de contaminantes iniciales (ADN y/o contaminantes proteínicos) y el nivel de contenido de toxicidad del sobrenadante crudo. Cooper *et al.*, no caracterizaron ni el producto inicial ni el producto final purificado midiendo los contaminantes iniciales y su eliminación después del proceso de concentración/purificación. El objeto de la presente invención es optimizar el proceso de producción de partículas retrovíricas a este respecto (véase la tabla 1).

20 Sumario de los aspectos destacados de la divulgación

La invención recae en un método para la producción de partículas retrovíricas basadas en ARN que comprende como se define en las reivindicaciones.

25 Este método permite la producción de partículas de alto título, de alta pureza, cuya naturaleza y usos se describen en este documento. Las características más destacados se resumen a continuación.

30 La presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada final que comprende menos de un 2 % de contaminantes proteínicos iniciales y menos de entre un 70 y un 90 % de contaminantes de ADN iniciales, en comparación con la composición de vector vírico basado en ARN cruda presente en el medio sin suero celular, pudiendo dicha composición transducir células eucariotas sin afectar significativamente a la viabilidad celular.

35 La presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada que comprende menos de un 2 % de contaminantes proteínicos iniciales y menos de un 30 % de contaminantes de ADN iniciales, en comparación con la composición de vector vírico basado en ARN cruda presente en el medio sin suero celular, pudiendo dicha composición transducir células eucariotas sin afectar a la viabilidad celular.

40 Se demuestra en este documento que cada uno de estos parámetros (suero, inducción con butirato de sodio y tiempos de recolección de vector) modifican la composición de sobrenadante de vector crudo inicial que induce un nivel de toxicidad diferencial en las células diana.

45 La presente divulgación proporciona composiciones de vector vírico (también mencionadas como partículas de vector vírico) de alto título y pureza, así como métodos para la producción de dichas composiciones. Las composiciones de vector vírico, en virtud de su alto título y pureza, minimizan los cambios fenotípicos en las células diana perjudiciales que se producen típicamente después de la transducción de células diana.

50 La presente solicitud divulga una composición de vector vírico basado en ARN purificada que comprende menos de un 2 % de contaminantes proteínicos iniciales y menos de un 70 hasta un 98,8 % de contaminantes de ADN, en comparación con la composición de vector vírico basado en ARN cruda presente en medio sin suero, el lote A crudo. Dicha composición puede transducir células eucariotas sin afectar a la viabilidad celular o dicha composición transduce células eucariotas sin afectar a la viabilidad celular.

55 En un aspecto, se divulga una composición de vector vírico basado en ARN purificada, en la que la eliminación de los contaminantes de ADN comprende entre un 60 y un 99 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y la eliminación de contaminantes proteínicos comprende entre un 55 y un 100 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda. Por tanto, la presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada que comprende menos de un 40 % de contaminantes de ADN en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y menos de un 45 % de contaminantes proteínicos en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada, en la que la eliminación de los contaminantes de ADN comprende entre un 60 y un 75 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y la eliminación de contaminantes proteínicos comprende entre un 55 y un 65 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda (lote B). Por tanto, la presente divulgación

proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada que comprende de un 25 % a un 40 % de contaminantes de ADN en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y de un 35 % a un 45 % de contaminantes proteínicos en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda. Esta composición de vector vírico basado en ARN purificada también puede usarse para transducir líneas celulares inmortalizadas sin afectar a su viabilidad.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada, en la que la eliminación de los contaminantes de ADN comprende entre un 70 y un 90 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y la eliminación de contaminantes proteínicos comprende hasta un 98 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda (lote C). Por tanto, la presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada que comprende de un 10 % a un 30 % de contaminantes de ADN en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y menos de un 2 % de contaminantes proteínicos en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda. Esta composición de vector vírico basado en ARN purificada puede usarse para transducir células eucariotas, células primarias y células madre sin afectar a su viabilidad.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada, en la que la eliminación de los contaminantes de ADN es de hasta un 98,8 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y la eliminación de contaminantes proteínicos es de hasta un 99,9 % en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda (lote D). Por tanto, la presente divulgación proporciona una composición de vector vírico basado en ARN purificada que comprende menos de un 2 %, preferentemente un 1,2 %, de contaminantes de ADN en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda y menos de un 1 %, preferentemente un 0,1 %, de contaminantes proteínicos en comparación con los contaminantes iniciales presentes en la composición de vector vírico basado en ARN cruda. Esta composición de vector vírico basado en ARN purificada también puede usarse para inyección *in vivo*.

En un aspecto específico, el vector vírico basado en ARN cruda es uno en el que las partículas físicas/unidades de transducción (PP/TU) están comprendidas entre 100:1 y hasta 900:1, preferiblemente de 200:1 hasta 900:1. En otro aspecto más, el vector vírico basado en ARN concentrado, concentrado por métodos simples basados en ultracentrifugación o centrifugación en unidades centrales listas para su uso, es uno en el que las partículas físicas/unidades de transducción (PP/TU) están comprendidas entre 100:1 y hasta 600:1, preferiblemente de 200:1 hasta 600:1. Además, el vector basado en ARN es un vector basado en ARN concentrado y purificado en el que las partículas físicas/unidades de transducción (PP/TU) están comprendidas entre 100:1 y hasta 400:1. Dichos vectores basados en ARN, a causa de su alto título y pureza, tienen de poco a ningún efecto sobre la proliferación celular, la viabilidad y/o la capacidad de las células, tales como las células madre, de diferenciarse. Los métodos descritos en este documento proporcionan un medio para seguir la evolución de la relación PP/TU desde el lote A crudo hasta los lotes C y D y para asegurar que disminuye o permanece estable. Un aumento en la relación podría demostrar que el proceso de concentración daña las partículas de vector.

La presente divulgación proporciona una construcción de ADN vírico contenida en un hospedador bacteriano depositado y los hospedadores bacterianos depositados en la CNCM Collection con el n.º de acceso 1-4487 (pEnv), n.º CNCM 1-4488 (pHIV-Gag/Pol) o n.º CNCM 1-4489 (pLV.EF1.GFP). La presente divulgación también proporciona una secuencia de nucleótidos purificada de origen vírico insertada en un vector para la producción de un vector basado en ARN de acuerdo como se divulga en este documento, siendo dicha secuencia de nucleótidos un inserto contenido en cualquiera de los tres hospedadores recombinantes depositados en la CNCM Collection con los números de acceso n.º CNCM 1-448, n.º CNCM 1-4488 o n.º CNCM 1-4489.

Dichos vectores víricos basados en ARN, como se divulga en este documento, pueden transducir células diana eucariotas para la transferencia de un ácido nucleico de interés (transgén) en dichas células. La divulgación proporciona un método para preparar células eucariotas modificadas, en el que dichas células se transducen sin afectar a su viabilidad mediante una composición de vector vírico basado en ARN purificada como se divulga en este documento. Dichos métodos de transducción pueden usarse, por ejemplo, en aplicación *in vitro* para el descubrimiento de fármacos, en ensayos clínicos *in vivo* y *ex vivo* y para genoterapia. Las composiciones de la invención son especialmente muy adecuadas para transducir células que requieren una alta M.O.I. (multiplicidad de infección).

Sumario de la invención

La invención recae en un método para la producción de partículas retrovíricas basadas en ARN, que comprende:

- (i) transfección de una célula productora, modificada para eliminaciones complementarias en el genoma vírico de ARN sobre el que se basa el vector vírico, y el cultivo de las células productoras en condiciones adecuadas para permitir la producción de partículas de vector vírico basado en ARN, en el que dicho cultivo después de la transfección se realiza en medio sin suero;

(ii) recogida del sobrenadante que contiene dichas partículas de vector vírico basado en ARN, realizándose la recogida de dicho sobrenadante durante las 72 h después de la transfección de las células productoras, por múltiples etapas comprendidas entre 3 y 6, a intervalos regulares de tiempo específicos dependiendo de la semivida de la partícula de vector a 37 °C en el medio de la célula productora

5 de modo que las partículas de vector se protegen de la degradación en el medio celular y la lisis de las células productoras está limitada; comprendiendo dicho método ninguna etapa de inducción con butirato de sodio.

10 En una realización de la invención, el sobrenadante que contiene las partículas de vector vírico basado en ARN pueden recogerse a intervalos de tiempo específicos después de la transfección, dependiendo dichos intervalos de tiempo específicos de la semivida de las partículas de vector a 37 °C, que es típicamente aproximadamente 8-10 horas dependiendo del tipo de célula productora y el medio de cultivo usado (Le Doux *et al.*, 1999). Preferiblemente, la recogida del sobrenadante se realiza por múltiples etapas comprendidas entre 3 y 6, tal como 4, a intervalos de tiempo
15 específicos. Los intervalos de tiempo son ventajosamente igual a aproximadamente dos veces la semivida de las partículas de vector a 37 °C. Esta etapa protege las partículas de vector de la degradación en el medio celular durante la etapa de producción y la liberación resultante de partícula de vector residual en el sobrenadante.

20 El método de la invención puede comprender además opcionalmente la etapa de ultrafiltración tangencial que contiene una etapa de diafiltración del sobrenadante. En otra realización más de la invención, después de la etapa de diafiltración por ultrafiltración tangencial, el método de la invención puede comprender además una etapa de cromatografía de intercambio iónico que se realiza para concentrar adicionalmente y purificar las partículas de vector vírico.

25 En una realización específica de la invención, la ultrafiltración se hace funcionar en cartuchos de fibra hueca de polisulfona. De forma ventajosa, puede realizarse un aclarado por centrifugación después de la recogida del sobrenadante y antes de la etapa de ultrafiltración, si la hay. El retenido obtenido después de esta centrifugación puede tratarse además con una enzima, tal como una nucleasa, que puede degradar los ácidos nucleicos contaminantes. Dichas enzimas incluyen, aunque sin limitación, una benzonasa o una DNasa. Después de la recuperación del
30 producto, las partículas de vector vírico pueden purificarse adicionalmente en una columna de intercambio iónico añadiendo, por ejemplo, DMEM y separación por formación de un gradiente salino.

Los métodos de la invención permiten la preparación de partículas de vector vírico basado en ARN purificadas, en los que la eliminación de contaminantes de ADN comprende entre un 70 y un 99 % de dichos contaminantes presentes
35 en el medio de cultivo sin suero inicial y en los que la eliminación de contaminantes proteínicos celulares comprende entre un 50 y un 99,9 % de las proteínas celulares contenidas en el medio de cultivo sin suero inicial y en los que la relación PP/TU está comprendida entre 100 y 900. La calidad del lote aumenta según disminuye la relación PP/TU. Esto significa que un exceso de partículas físicas con respecto a las partículas eficaces tiene un efecto negativo sobre la eficacia de transducción y el fenotipo de las células transducidas. Una relación PP/TU de más de 1000, calculada
40 usando métodos como se describe en este documento en Materiales y métodos, se considera como el límite aceptable superior.

Los métodos de la invención permiten además la preparación de partículas de vector vírico basado en ARN purificadas, en los que la eliminación de contaminantes de ADN comprende hasta un 71 % del contenido de dichos contaminantes
45 presentes en el medio de cultivo sin suero inicial y en los que la eliminación de contaminantes proteínicos celulares de hasta un 56 % del contenido de dichos contaminantes presentes en el medio de cultivo sin suero inicial y en los que la relación PP/TU comprende entre 100 y 600.

Los métodos de la invención provocan la producción de partículas de vector vírico basado en ARN purificadas que
50 pueden transducir células eucariotas diana sin afectar a la viabilidad de las células, su capacidad de proliferar *in vitro* o su capacidad de progresar en una ruta de diferenciación (por ejemplo, cuando se transducen células madre). Dichas partículas de vector vírico basado en ARN purificadas se producen en un sistema sin suero celular y pueden usarse para transducir células eucariotas diana *in vitro*, siendo dichas células adecuadas para su inyección en un hospedador *in vivo*. Dichas células eucariotas incluyen, por ejemplo, células inmortalizadas, células primarias, células madre o
55 células madre pluripotentes inducidas.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de preparación de una célula eucariota genéticamente modificada caracterizado por las etapas de poner en contacto una célula eucariota con una
60 composición de vector vírico basado en ARN como se describe en este documento. El método puede comprender además separar la célula eucariota genéticamente modificada del sobrenadante de medio celular de cultivo sin suero. El medio sin suero es importante cuando se producen partículas de vector vírico, pero también cuando se transducen células como células madre o células primarias, por ejemplo, que pueden requerir medio específico y/o suero. De hecho, cada uno de los parámetros entre la presencia/ausencia de suero, inducción con butirato de sodio o tiempos de recolección del vector, pueden afectar a la composición de sobrenadante de vector cruda inicial y, por tanto, producir
65 un nivel de toxicidad diferencial en células transfectadas. La presente divulgación proporciona una célula eucariota

modificada en la que dicha célula se transduce sin afectar a su viabilidad mediante una composición de vector vírico basado en ARN purificado como se describe en este documento.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1. Esquema de producción de vector. Las células productoras se transfectan con plásmidos de empaquetado y expresión para producir vectores lentivíricos no replicantes en el sobrenadante celular.

10 Figura 2: Construcción de ADN vírico contenido en un hospedador bacteriano depositado en el CNCM con el número de acceso n.º CNCM 1-4487, n.º CNCM 1-4488 o n.º CNCM 1-4489. Figura 2A. Plásmido que alberga los genes gag y pol. Figura 2B. Plásmido auxiliar que expresa la envuelta. Figura 2C. Plásmido de expresión de transgén.

15 Figura 3A. Ensayo de transducción celular de líneas celulares inmortalizadas. Se siembran 50 000 células por pocillo en microplaca de 24 pocillos (microplaca de 24 pocillos Corning CellBind) y se mezclan con un vector lentivírico que expresa GFP. Las condiciones óptimas de transducción se determinan usando un intervalo de M.O.I. de 10 a 100, en presencia de 4 µg/ml de polibreno en un volumen total de 1 ml, durante una noche a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se reemplaza con medio de cultivo fresco después de la incubación durante una noche. Tres días después de la transducción, las células transducidas se analizan por citometría de flujo. Figura 3B. Ensayo de transducción celular de células primarias. Se siembran 50 000 células por pocillo en microplaca de 24 pocillos (microplaca de 24 pocillos Corning CellBind) y se mezclan con un vector lentivírico que expresa GFP. Las condiciones óptimas de transducción se determinan usando un intervalo de M.O.I. de 10 a 100, en presencia de 4 µg/ml de polibreno en un volumen total de 1 ml, durante una noche a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se reemplaza con medio de cultivo fresco después de la incubación durante una noche. Tres días después de la transducción, se analizan las células transducidas por citometría de flujo.

25 Figura 4A. Método de producción de vector habitual con suero por procesos de vanguardia. Figura 4B. Evaluación del perfil de proteínas de acuerdo con la tasa de FCS analizada por gel de SDS-PAGE. Se cargaron 15 µg de proteínas totales de sobrenadantes víricos en gel de SDS-PAGE. Las proteínas totales se cuantificaron por espectrofotometría a 280 nm. Figura 4C. Resumen de los títulos de los lotes usados para evaluar los perfiles de proteínas. (1) Se determinaron las unidades de transducción (TU) por citometría de flujo. (2) Se cuantificaron las partículas físicas (PP) por ELISA de p24 de VIH para determinar la relación PP/TU. (3) Se cuantificaron las proteínas totales por espectrofotometría a 280 nm.

35 Figura 5A. Concentración de vector vírico y procesos de purificación de la presente invención. Los diferentes procesos son secuenciales (de A a D correspondientes a la obtención de los lotes A a D) para cumplir los requisitos de concentración de células diana y purificación: células inmortalizadas (A), células primarias y células madre (C) e inyección *in vivo* (D). Figura 5B. Gel de SDS-PAGE de vectores ultracentrifugados y centrifugados en unidades centrales producidos sin suero (B). Carril 1: 3x10⁵ TU de lote ultracentrifugado. Carril 2 y 3: respectivamente 3x10⁵ TU y 3x10⁶ TU de centrifugados en unidad central. Figura 5C. Rendimientos del proceso de purificación a través de análisis de gel de SDS-PAGE. Carril 1: 3x10⁵ TU de lote ultrafiltrado usando unidad de centrifugación lista para su uso (estrategia B). Carril 2: 3x10⁶ TU de lote ultrafiltrado usando unidad de centrifugación lista para su uso (estrategia B). Carril 3: 3x10⁵ TU de lote ultrafiltrado usando fibras huecas (estrategia C). Carril 4: 3x10⁵ TU de lote ultrafiltrado usando fibras huecas seguido de una etapa de concentración adicional usando unidad de centrifugación lista para su uso. Carril 5: 3x10⁶ TU de lote ultrafiltrado usando fibras huecas seguido por una etapa de concentración adicional usando unidad de centrifugación lista para su uso. Carril 6: 3x10⁵ TU de lote cromatografiado (estrategia D). Carril 7: 3x10⁶ TU de lote cromatografiado seguido de una etapa de concentración adicional usando unidad de centrifugación lista para su uso. Carril 8: 15x10⁶ TU de lote cromatografiado seguido de una etapa de concentración adicional usando unidad de centrifugación lista para su uso.

50 Figura 6. Impurezas restantes que dependen de las estrategias de purificación de la presente invención. Las estrategias de concentración y purificación muestran diferentes perfiles de eliminación de impurezas dependiendo de las técnicas de concentración y purificación usadas. De A a D, las impurezas restantes (proteínas, ADN y vectores víricos no biológicos (PP)) disminuyen hasta conseguir los requisitos de purificación de la FDA para la inyección *in vivo* (D).

55 Figura 7. Actividades específicas de vectores retrovíricos biológicamente activos purificados en comparación con impurezas, dependiendo de las estrategias de purificación. Las partículas víricas y sus contaminantes ambientales están representados por las actividades específicas. La actividad específica es la actividad biológica de los vectores por miligramo de proteína total (expresada en TU/mg) o por microgramo de ADN residual (expresado en TU/µg), dando de este modo una medición de las actividades del vector vírico en su entorno. La actividad específica aumenta según disminuyen los contaminantes en el entorno del vector.

60 Figura 8. Relación de partículas físicas/unidad de transducción (PP/TU) dependiendo de las estrategias de purificación de la presente invención. Pueden aparecer algunos defectos en las fases de producción del vector de etapas tardías que dan lugar a la producción de vectores víricos no infecciosos. Las partículas físicas desprovistas

de cualquier actividad biológica tienen casi las mismas propiedades fisicoquímicas de las partículas biológicamente activas que causan dificultades en su eliminación durante los procesos de concentración-purificación.

5 Figura 9. El nivel de purificación de vectores retrovíricos biológicamente activos purificados comparado con las impurezas, dependiendo de las estrategias de purificación de la presente invención. Los niveles de purificación representan la relación de purificación entre los vectores víricos y las impurezas, tales como proteínas o ADN, presentes en el entorno del vector vírico. El nivel de purificación de los cuatro lotes aumenta del lote A al lote D según disminuyen las impurezas restantes en el producto de recuperación final.

10 Figura 10. Transducción celular de IMR90 con vectores lentivíricos no integrantes (NILV) y vectores lentivíricos de integración (ILV). Se siembran 50 000 células por pocillo en microplaca de 24 pocillos y se mezclan con el vector lentivírico de M.O.I. 5 a 200, en presencia de 4 µg/ml de polibreno en un volumen total de 1 ml, durante una noche a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se reemplaza con medio de cultivo fresco después de la incubación durante una noche. Seis días después de la transducción, se determina la expresión de GFP por análisis de FACS. Figura 10A. Porcentaje de células IMR90 transducidas con ILV y NILV que expresan GFP a M.O.I. creciente. Figura 10B. Intensidad de fluorescencia en células IMR90 transducidas con ILV y NILV que expresan GFP a M.O.I. creciente.

15 Figura 11. Ensayo de LDH en células 293T y células 293T transfectadas con los tres plásmidos usados para la producción de lentivirus.

20 Figura 12A. Expresión de GFP en células de prepucio cinco días después de la transducción con vectores lentivíricos (ILV) que expresan GFP. Los lotes se mencionan como las letras A, B, C y D. Se siembran 50 000 células por pocillo en microplaca de 24 pocillos y se mezclan con el vector lentivírico a M.O.I. 40 y 150 en presencia de 4 µg/ml de polibreno en un volumen total de 1 ml, durante una noche a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se reemplaza con medio de cultivo fresco después de la incubación durante una noche. Cinco días después de la transducción, se fijaron las células. Figura 12B. Expresión de GFP en células de prepucio once días después de la transducción con vectores lentivíricos (ILV) que expresan GFP. Los lotes se mencionan como las letras A, B, C y D. Se siembran 50 000 células por pocillo en microplaca de 24 pocillos y se mezclan con el vector lentivírico a M.O.I. 40 y 150 en presencia de 4 µg/ml de polibreno en un volumen total de 1 ml, durante una noche a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se reemplaza con medio de cultivo fresco después de la incubación durante una noche. Once días después de la transducción, se fijaron las células. Figura 12C. Expresión de GFP en células de prepucio medida por FACS once días después de la transducción con vectores lentivíricos (ILV) que expresan GFP. Los lotes se mencionan como las letras A, B, C y D. Las células de prepucio se transducen en placas de 96 pocillos y se transducen un día después. Después de 11 días, se mide intensidad de GFP por FACS en todas células diana.

25 Figura 13. Viabilidad celular 11 días después de la transducción. Las células de prepucio se transducen en placas de 96 pocillos y se transducen un día después.

30 Figura 14A. Proliferación celular medida por ensayo de MTT 11 días después de la transducción con el lote B. Las células de prepucio se transducen en placas de 96 pocillos y se transducen un día después con el lote B. Las células se pasaron a una tercera después de 5 días en todos los pocillos y después de 11 días, se realiza el ensayo de MTT. Figura 14B. Proliferación celular medida por ensayo de MTT 11 días después de la transducción con todos los lotes A, B, C y D. Las células de prepucio se transducen en placas de 96 pocillos y se transducen un día después con el lote B. Después de 11 días, se realiza el ensayo de MTT. Figura 14C. Proliferación celular medida por ensayo de MTT 11 días después de la transducción con los otros lotes en comparación con el lote B. Las células de prepucio se transducen en placas de 96 pocillos y se transducen un día después con el lote B. Después de 11 días, se realiza el ensayo de MTT.

35 Figura 15A. Células de prepucio cultivadas 48 horas después de transducción con un casete vacío que porta vector lentivírico (rLV-EF1) sin ADNc, a M.O.I. 40 o M.O.I. 150. El lote B y C de rLV-EF1 se obtuvieron de la misma recolección cruda. Figura 15B. Características de los lotes B y C de rLV-EF1 usados para el análisis de transcriptómica. (1) Se determinaron las unidades de transducción (TU) por qPCR. (2) Se cuantificó el ADN residual usando el kit de ADNbc Quant-iT kit PicoGreen (Life Technologies). (3) Se cuantificaron las proteínas totales por espectrofotometría a 280 nm. (4) Se cuantificaron las partículas físicas (PP) por ELISA de p24 de VIH para determinar la relación PP/TU.

40 Figura 16A. Diagrama de dispersión que representa el conjunto de sondas expresadas de forma diferencial en células transducidas del lote B de rLV-EF1 a M.O.I. 150 frente a células no transducidas y no afectadas en células transducidas del lote C rLV-EF1 a M.O.I. 150 frente a células no transducidas. El eje de abscisas representa las intensidades normalizadas para células no transducidas (NT) y el eje de ordenadas las intensidades normalizadas para células transducidas (T). Las líneas de tono gris muy claro son líneas de cambio factorial que representan los valores de cambios factoriales de -1,5, 1 y 1,5. Figura 16B. Gráfico de perfil que representa el mismo conjunto de sondas que se muestran en la figura 16A después de la transformación basal de los valores de intensidad. Figura 16C. Diagrama de dispersión que representa el conjunto de sondas expresadas de forma diferencial en células transducidas del lote B de rLV-EF1 a M.O.I. 40 frente a células no transducidas y no afectadas en células transducidas del lote C rLV-EF1 a M.O.I. 40 frente a células no transducidas. El eje de abscisas representa las

intensidades normalizadas para células no transducidas (NT) y el eje de ordenadas las intensidades normalizadas para células transducidas (T). Las líneas de tono gris muy claro son líneas de cambio factorial que representan los valores de cambios factoriales de -1,5, 1 y 1,5. Figura 16D. Gráfico de perfil que representa el mismo conjunto de sondas que el mostrado en la figura 16C después de la transformación basal de los valores de intensidad.

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

Figura 17A. Células de prepucio 48 horas después de la transducción con un casete vacío que porta vector lentivírico (rLV-EF1) producido en presencia de suero a M.O.I. 40 y 150. Figura 17B. Características del lote B-S de rLV-EF1 usado para el estudio de transcriptómica. (1) Se determinaron las unidades de transducción (TU) por qPCR. (2) Se cuantificó el ADN residual usando el kit de ADNbc Quant-iT kit PicoGreen (Life Technologies). (3) Se cuantificaron las proteínas totales por espectrofotometría a 280 nm. (4) Se cuantificaron las partículas físicas (PP) por ELISA de p24 de VIH para determinar la relación PP/TU.

Figura 18. Gráfico de perfil que representa el conjunto de sondas específicamente diferenciales con el lote B-S de rLV-EF1 en comparación con no transducidas (NT) y no afectadas por el lote B y C de rLV-EF1 frente a NT (a M.O.I. 40 y 150). Se aplicó una transformación basal sobre los valores de intensidad antes de representar los datos. Las líneas están coloreadas de acuerdo con su intensidad normalizada en condiciones de lote B-S M.O.I. 150.

Tabla 1: Rendimientos de productos relacionados de esta invención obtenidos con el proceso de concentración de vanguardia (correspondiente a la obtención del lote B) y los procesos descritos en esta invención (A, C y D) de un vistazo. Esta tabla resume las características del lote descritas en esta invención, dependiendo de los procesos de concentración y purificación. El proceso B (correspondiente a la obtención del lote B) representa el proceso de vanguardia. La transducción usando vectores de este proceso da lugar a cuestiones de viabilidad celular y proliferación. C y D son los procesos (correspondiente a los lotes C y D obtenidos) desarrollados en esta invención para responder a los inconvenientes de viabilidad celular observados después de la transducción usando vectores del proceso B (correspondiente a la obtención del lote B). El lote A se consideró como una referencia para todos los datos de porcentaje (recuperación del proceso, eliminación de proteínas y ADN) en esta tabla. El lote A se considera un lote optimizado ya que se produjo en un medio sin suero, sin inducción con butirato de sodio y se recogió en diferentes momentos basándose en la semivida específica para la partícula vírica de interés.

Tabla 2: Medidas de contaminantes y títulos en todos los lotes A, B, C y D y de eficacia.

Tabla 3. Impacto de los tiempos de recolección, inducción con butirato de sodio sobre células productoras transfectadas y sobre la composición de vector crudo resultante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un proceso novedoso para la producción de composiciones de vector retrovírico basado en ARN (también mencionadas en este documento como partículas de vector vírico) de alto título y pureza. Como se describe en este documento, se ha desarrollado un nuevo proceso tanto para la producción como para la concentración de vector (figura 5A). El proceso se basa en primer lugar en la transfección transitoria de células eucariotas en un medio sin suero que provoca la producción de un lote crudo mencionado como lote A (figura 5A) que muestra alto rendimiento de calidad en comparación con un lote producido con suero (lote A-S como se describe en la figura 4). Este sobrenadante crudo (lote A) está optimizado porque se produce sin inducción con butirato de sodio, sin suero y se recoge en tiempos específicos después de la transfección dependiendo de la semivida de las partículas de vector a 37 °C, que es aproximadamente 8 horas, dependiendo del tipo de célula productora y el medio de cultivo usado (Le Doux *et al.*, 1999). La etapa de producción puede estar seguida de la concentración a través de ultrafiltración y la purificación de partículas de vector por cromatografía de intercambio iónico y da lugar respectivamente a los lotes mencionados en este documento como lotes C o D y que muestran una alta tasa de eliminación de proteína y ADN (tablas 1 y 2. Los productos, lotes C y D, pueden obtenerse para aplicaciones a escala pequeña y grande y permiten la transducción eficaz sin efecto significativo sobre la viabilidad celular y la proliferación medida por los métodos disponibles existentes. Dicha transducción eficaz requiere métodos, proporcionados en este documento, para la producción eficaz de vector, la concentración y purificación mientras se mantiene la potencia del vector sin introducir los contenidos celulares y del medio que pueden interferir con la división y el metabolismo de la células diana (figura 5A).

El método de la invención para la producción de vectores víricos basados en ARN comprende:

(i) transfección de una célula productora, modificada para eliminaciones complementarias en el genoma vírico basado en ARN en el que se basa el vector, y cultivo en condiciones adecuadas para permitir la producción de partículas de vector vírico basado en ARN, en el que dicho cultivo después de la transfección se realiza en medio sin suero;

(ii) recogida del sobrenadante que contiene dichas partículas de vector vírico basado en ARN, realizándose la recogida de dicho sobrenadante durante las 72 h después de la transfección de las células productoras, por

múltiples etapas comprendidas entre 3 y 6, a intervalos regulares de tiempo específicos dependiendo de la semivida de la partícula de vector a 37 °C en el medio de la célula productora

de modo que las partículas de vector se protegen de la degradación en el medio celular y la lisis de las células productoras está limitada;

comprendiendo dicho método ninguna etapa de inducción con butirato de sodio.

Los tiempos de intervalo regulares entre cada etapa de recolección son un equilibrio entre el título funcional de vector crudo requerido ($>10^6$ TU/ml) y la presencia de contaminantes que pueden inducir toxicidad en las células transfectadas.

Las células productoras se transfectan con un vector vírico de interés. El vector vírico se diseña para que exprese un ácido nucleico de interés (también mencionado en este documento como transgén) insertado en el ácido nucleico vírico tras la introducción en una célula hospedadora diana, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Dicha introducción en la célula hospedadora diana puede usarse, por ejemplo, en el descubrimiento de fármacos o aplicaciones de genoterapia.

La transfección se define como el proceso de introducción deliberada de ácidos nucleicos en células. El término se usa estrictamente para métodos no víricos en células eucariotas. La transfección se usa en el proceso de producción de vector vírico cuando se transfectan plásmidos que expresan gag-pol y env en células productoras para obtener vectores víricos en el sobrenadante. La transducción es el proceso de introducción deliberada de ácidos nucleicos en células. El término se usa para métodos basados en virus en células eucariotas. Los vectores víricos se recolectan de las células productoras y se ponen en contacto con las células eucariotas para obtener las células finalmente transducidas.

Los vectores víricos se basan en virus que pertenecen a la familia *Retroviridae* que comprende virus de ARN con envuelta incluyendo, por ejemplo, vectores lentivíricos (LV) y gamma-retrovírico (RV). El desarrollo de un proceso de purificación demanda un conocimiento preciso de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los vectores. Los vectores retrovíricos se obtienen de virus que pertenecen a la familia *Retroviridae* que comprende virus de ARN con envuelta con una estructura macromolecular compleja que tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 150 nm (Salmeen *et al.* 1975). Debido al gran tamaño, las partículas víricas tienen baja capacidad de difusión (10^{-8} cm²/s); su densidad es de aproximadamente 1,15-1,16 g/cm³ determinada por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Coffin *et al.* 1997). Están compuestas de un 60-70 % de proteína, un 30-40 % de lípido (derivado de la membrana plasmática de las células productoras), un 2-4 % de carbohidrato y un 1 % de ARN (Andreadis *et al.* 1999). Las partículas retrovíricas consisten en dos copias idénticas de ARN codificante positivo monocatenario, más las enzimas integrasa y transcriptasa inversa, contenidas dentro de una cápside proteínica rodeada por una membrana de bicapa lipídica. La bicapa lipídica está incrustada con proyecciones glucoproteínicas. Los vectores retrovíricos son partículas cargadas negativamente en un amplio intervalo de pH ya que su punto isoeléctrico se produce a valores de pH muy bajos. Las proteínas de la envuelta y la bicapa lipídica son probablemente los contribuyentes principales a la carga negativa en la superficie del virus (Rimai *et al.* 1975).

Los tipos de células productoras a transfectar dependerán del vector vírico que se ha elegido, típicamente células de mamífero fácilmente transfectables. Dichas células, como HeLa y 293T, son bien conocidas por los expertos en la materia. En la invención, usando vectores víricos derivados de la familia de retrovirus, tales como vectores gamma-retrovíricos (RV) y vectores lentivíricos (LV), pueden usarse células 293T.

Las células productoras se genomanipulan para que expresen de forma transitoria o estable, cualquier proteína vírica, cuya expresión es necesaria para el ensamblaje y empaquetado del vector vírico en una partícula de virus. En la invención, los vectores retrovíricos que incluyen vectores lentivíricos se producen por líneas celulares que están genomanipuladas para que expresen el vector (que codifica el transgén) y construcciones auxiliares (que codifican las proteínas víricas) como se describe en la figura 1. Para minimizar los eventos de recombinación y la producción de retrovirus de replicación competente, las secuencias de genoma retrovírico pueden dividirse en tres construcciones diferentes (figura 2A-C).

La primera construcción, el vector de gag-pol, codifica las proteínas estructurales y las enzimas víricas. Respectivamente, gag codifica las proteínas de la matriz (MA), las estructuras de la cápside (CA) y la nucleoproteína (NC) y pol codifica las enzimas transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN). Mucho más preferiblemente, los genes víricos gag y pol se obtienen de retrovirus, preferiblemente un lentivirus y mucho más preferiblemente de VIH.

La segunda construcción, el vector de env, codifica las proteínas de la envuelta de las que se obtiene el componente superficial (SU) y transmembranario (TM) por enlaces disulfuro. El componente (TM) está anclado por un segmento transmembranario y no puede retirarse de los vectores sin su alteración (Coffin *et al.* 1997). El gen env puede obtenerse de cualquier virus, incluyendo retrovirus. La env puede ser una proteína de envuelta anfótera que permite la transducción de células de la especie humana y otras especies, o puede ser una proteína de envuelta ecotrópica, que puede transducir únicamente células de ratón y rata. Además, puede ser deseable dirigir el virus recombinante por enlace de la proteína de envuelta con un anticuerpo o un ligando particular para dirigirlo a un receptor de un tipo

celular particular. Insertando una secuencia (incluyendo región reguladora) de interés en el vector vírico, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector ahora es específico de diana. Lo vectores retrovíricos pueden hacerse específicos de diana insertando, por ejemplo, un glucolípid o una proteína. La dirección se consigue a menudo usando un anticuerpo para dirigir el vector retrovírico. Los expertos en la materia conocerán, o podrán averiguar fácilmente sin experimentación excesiva, los métodos específicos para conseguir el suministro de un vector retrovírico a una diana específica. Los ejemplos de genes env derivados de retrovirus incluyen, aunque sin limitación: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del simio gibón (GaLV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del sarcoma de Rous (VSR). También pueden usarse otros genes env tales como del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (proteína G).

El vector que proporciona la secuencia de ácido nucleico de env vírica está asociada con la secuencia reguladora, por ejemplo, un promotor o potenciador. Preferiblemente, la secuencia reguladora es un promotor vírico. La secuencia reguladora puede ser cualquier promotor o potenciador eucariota, incluyendo, por ejemplo, el elemento promotor-potenciador del virus de la leucemia murina de Moloney, el potenciador de citomegalovirus humano (como se usa en el ejemplo ilustrativo). En algunos casos, tal como el elemento promotor-potenciador del virus de la leucemia murina de Moloney, estos elementos promotores-potenciadores están ubicados dentro o adyacentes a las secuencias LTR.

Una tercera construcción, el transgén del vector, proporciona las secuencias víricas de acción en cis necesarias para el ciclo vital del virus (figura 2C). Dichas secuencias incluyen la secuencia de empaquetado psi, las señales de transcripción inversa, las señales de integración, el promotor vírico, el potenciador y las secuencias de poliadenilación. Este tercer vector también contiene un sitio de clonación para una secuencia de ácido nucleico heteróloga a transferir a una célula diana. Se muestra una ilustración esquemática de un vector adecuado en la figura 2C con la GFP como transgén, pero que puede remplazarse por cualquier gen o secuencia de interés tal como ARNhc (ARN de horquilla corta) o miARN (micro-ARN).

Esta construcción puede contener otros elementos de expresión como una secuencia WPRE de tipo silvestre (Zufferey *et al.* 1999), un elemento cPPT/CTS (Manganini *et al.*, 2002). El gen que codifica la beta lactamasa se usa para seleccionar bacterias transformadas con estos plásmidos para producir los plásmidos. Después de la transfección de las células productoras con estos plásmidos, se inicia la transcripción a partir del promotor eucariota (U3 de VSR) hasta el sitio de poliadenilación (R de VIH1) y no incluye el gen que codifica la beta lactamasa. Ni la proteína beta lactamasa ni el ARN correspondiente se expresan en la línea celular productora o se encapsida en la partícula de vector.

Se elimina la patogenia vírica sustituyendo las regiones del genoma necesarias para la replicación retrovírica por el transgén. Esto asegura que el genoma empaquetado en los vectores retrovíricos codifica únicamente el transgén y secuencias requeridas para el empaquetado y la transcripción inversa.

La separación de las tres construcciones retrovíricas permite el seudotipado de los vectores retrovíricos con proteínas de superficie de otros virus, ampliando de este modo el tropismo vírico. Los vectores retrovíricos como se describe en este documento, en una realización no limitante, se han seudotipado con proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (Clapham, P. *et al.*, 1984). Los vectores retrovíricos seudotipados con proteína G de VSV entran en las células mediante interacción con componente lipídico ampliamente distribuido de la membrana plasmática, permitiendo de este modo un espectro muy amplio de transducción (Verhoeven *et al.* 2004 y Yee *et al.* 1994). El seudotipado puede tener un gran impacto sobre la producción y purificación de vectores retrovíricos debido a la alteración de la estructura de la envuelta, afectando de este modo a las propiedades fisicoquímicas de la membrana de los vectores retrovíricos usados durante el proceso posterior.

Las células productoras pueden transfectarse con construcciones de vector de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas para los expertos en la materia. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, la técnica de fosfato de calcio, la técnica de DEAE-dextrano, electroporación, métodos basados en choque osmótico, microinyección o métodos basados en el uso de liposomas. En una realización preferida de la invención, las células pueden transfectarse usando un método de precipitación con calcio. Dicho método es preferido cuando las células 293T son las células productoras de elección, pero también pueden usarse células equivalentes.

Después de la transfección, las células se incuban en medio sin suero durante un tiempo suficiente para permitir la producción eficaz de partículas víricas. El medio sin suero se define como medio de crecimiento para cultivo de células de mamífero sustancialmente sin suero derivado de animal. El medio sin suero es bien conocido en la técnica (Bruner *et al.* 2010). El tiempo de incubación después de la transfección, dependerá de una combinación de factores incluyendo, por ejemplo, el tipo de vector vírico usado y la línea celular productora de elección. Durante el intervalo de tiempo después de la transfección, es decir, el tiempo de incubación, se realizan de tres a seis recolecciones del vector. Por ejemplo, pueden realizarse cuatro recolecciones del vector. Para determinar las condiciones de incubación más productivas, pueden realizarse experimentos de lotes pequeños para determinar las condiciones optimizadas para generar el máximo título y el lote más puro de partículas víricas.

El sobrenadante de cultivo inicial, que contiene particular de vector vírico, se menciona en este documento como, lote A. El método de la invención puede comprender además la etapa de diafiltración por ultrafiltración tangencial del producto de lote A para purificación adicional de partículas de vector vírico. Dicha etapa de diafiltración por ultrafiltración es un tipo de filtración en membrana en que la presión hidrostática impulsa a un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y los solutos de mayor peso molecular que el punto de corte de la membrana se retienen, mientras que el agua y los solutos de menor peso molecular que el punto de corte de la membrana pasan a través de la membrana. En una realización preferida de la invención, la técnica de ultrafiltración se realiza por ultrafiltración de flujo tangencial usando cartuchos de fibra hueca de polisulfona. Dicha técnica permite el control y adaptación de la presión para asegurar el mantenimiento de la integridad y viabilidad del vector. Dicha etapa proporciona concentración de las partículas de vector, así como su acción como una etapa de purificación para la eliminación de contaminantes iniciales, tales como proteínas y ácidos nucleicos de la célula hospedadora, del lote recogido. Dicho lote se menciona en este documento como lote C.

En otra realización más de la invención, después de la etapa de ultrafiltración tangencial y/o diafiltración, el método de la invención puede comprender además la etapa de cromatografía de intercambio iónico que puede realizarse para concentrar adicionalmente y purificar las partículas de vector vírico. Dicho lote se menciona en este documento como lote D.

La presente divulgación proporciona el uso de la composición de lote A en líneas celulares inmortalizadas permisivas tales como, por ejemplo, HCT116. Además, la presente divulgación proporciona el uso de las composiciones de lotes C o D en aplicaciones de genoterapia que se demuestra que inducen ningún cambio fenotípico celular o cambios fenotípicos celulares mínimos, debido a las condiciones de preparación de los vectores o las condiciones de los cultivos celulares en comparación con el productos de la técnica anterior del lote B-S como se describe en la figura 4. Como se expone en este documento, el uso de ultrafiltración en lotes crudos sin suero permite no solamente concentrar las partículas de vector, sino también purificarlas eliminando más de un 70 % de los contaminantes iniciales, tales como la proteínas y ADN de la célula hospedadora usada para la transfección (tabla 2 y 3) del lote recogido. Como las etapas posteriores de concentración y purificación se ven afectadas directamente por cambios en los métodos de cultivo celular durante la producción del vector, se prefiere que tanto el cultivo celular como las etapas de concentración/purificación se realicen en paralelo. La eliminación del suero del medio de cultivo de las células productoras tiene un fuerte impacto en las etapas de ultrafiltración y cromatografía ya que los contenido iniciales de proteína y ADN son completamente diferentes en lotes crudos producidos con o sin suero. Merten *et al.* (2010) usaron un proceso posterior basado en varias etapas basadas en membrana y cromatográficas, pero con un proceso de producción que usa un medio que contiene un 10 % de suero, que es una diferencia crítica entre el proceso desarrollado de acuerdo con la presente invención y el proceso de la técnica anterior de Merten *et al.* (2010). En el sobrenadante crudo de Merten *et al.* (2010), la concentración inicial de proteína total era de aproximadamente 6 mg/ml, mientras que es de 0,14 mg/ml en la presente invención sin suero, una diferencia de un factor 40. Como se describe en este documento, la concentración final de proteínas en los lotes C y D es de menos de 0,061 mg/ml y 0,01 mg/ml después de ultrafiltración y cromatografía respectivamente, mientras que alcanza un promedio de 1,5 mg/ml después de varias etapas basadas en membrana y cromatográficas en un lote producido con suero (Merten *et al.*, 2010), una diferencia respectiva de un factor 25 y 150.

La ausencia de suero en el lote crudo puede explicar la diferencia obtenida en la concentración de vector y la eliminación de contaminantes obtenida en la presente invención y los estudios preliminares con estos métodos para purificación de virus o vectores (Grzenia *et al.*, 2008). Grzenia *et al.* observaron dificultades porque algunas partículas de virus dañadas más pequeñas y fragmentos de virus probablemente se depositaban en la superficie de la membrana. La eficacia de la purificación parece recaer en el equilibrio entre el punto de corte de peso molecular de la membrana, la fuerza iónica, la presión a través de la membrana (TMP) y el tamaño del vector. Como se demuestra en este documento, otro parámetro que puede interferir en el proceso de purificación se basa en el contenido inicial de medio que puede influir en la eliminación del ADN y las proteínas hospedadoras del lote crudo. Como se describe en este documento, una combinación de etapas de cultivo celular, concentración y purificación permite una alta recuperación de partículas basadas en lentivirus o retrovirus, que están asociadas con alta pureza. Los vectores producidos de acuerdo con la invención, con un alto nivel de calidad permiten la generación de iPS (célula madre pluripotente inducida) sin efectos sobre la proliferación celular durante el proceso de reprogramación debido a los contenidos de suero o contaminantes del medio, como se divulga en el documento WO 2007/09666 y el documento WO 2009/13971.

La presente invención se basa en la investigación de los contenidos de proteína y ADN asociados con la cuantificación de partículas en partículas físicas (PP), o partículas biológicas que pueden transducir células (TU) después de cada etapa del proceso de la invención (correspondiente a la obtención de los lotes A, C y D) en comparación con los métodos de concentración de la técnica anterior habitualmente usados (correspondiente a la obtención del lote B). En paralelo, se evaluó la toxicidad y proliferación en las células transducidas para determinar las consecuencias fenotípicas de los métodos de concentración y purificación en las células.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden partículas víricas de alto título y altamente purificadas que pueden usarse para transducir células. Las composiciones proporcionan un medio para la transducción de células delicadas o frágiles, tales como células primarias y células madre, cuando se requiere el uso de un gran volumen de medio o alta multiplicidad de infección (M.O.I.). Las composiciones, por lo tanto, son adecuadas para el

uso de vectores lentivíricos no integrantes (NILV) en células delicadas y frágiles, que habitualmente requieren transducción de alta M.O.I.

Como se demuestra en este documento, la producción eficaz de partículas basadas en virus para el descubrimiento de fármacos y aplicaciones de genoterapia requiere el desarrollo tanto de operaciones de concentración robustas y etapas de purificación así como el uso de medios adaptados para cultivar las células y para resuspender el lote de vector que se usará para transducir las células. Como se demuestra en este documento, la eficacia de transducción de células diana depende no solamente del tipo de célula (células inmortalizadas, primarias o madre) o el tejido de origen, sino también de las características del vector (título, nivel de pureza, contenidos de proteínas y ADN).

Las preparaciones de vector retrovítico no solamente se definen por las propias partículas víricas, sino también por su entorno cercano, que influye en el nivel de calidad de la preparación final de vectores víricos y como se demuestra en esta ocasión el nivel de transducción y la viabilidad celular.

Los vectores retrovíticos son ensamblajes macromoleculares complejas de proteínas, lípidos y ARN, en un medio de cultivo celular que contiene proteínas y contaminantes de ADN. Por lo tanto, la evaluación de dicho entorno puede ser difícil. La mayor parte de la dificultad surge de la incorporación de componentes de las células productoras, principalmente proteínas, durante el proceso de gemación, tanto dentro de la bicapa lipídica como dentro de la partícula vírica. Todas estas características aumentan enormemente la dificultad en la determinación de los componentes de la muestra que están asociados con el vector y que de hecho son contaminantes en el sobrenadante. Los contaminantes del sobrenadante más relevantes son (i) partículas físicas (PP) no infecciosas, (ii) proteínas celulares o víricas y (iii) ADN.

Las impurezas proteínicas son los contaminantes más abundantes en los sobrenadantes de vector retrovítico. Surgen principalmente de la secreción de proteínas de las células productoras y la proporción de proteínas de sobrecarga aumenta mientras se realiza un proceso sin suero. Los vectores retrovíticos incorporan las proteínas de la célula hospedadora durante la gemación, lo que complica la distinción entre las proteínas contaminantes y asociadas con el vector. En este estudio, las partículas y su entorno proteínico están representados por sus actividades específicas. La actividad específica es la actividad biológica de los vectores por miligramo de proteína total (expresada en TU/mg), dando de este modo una medición de las actividades del vector vírico en la composición del medio celular. La actividad específica aumenta según disminuyen los contaminante durante el proceso de purificación como se describe en la presente invención.

Los contaminantes de ADN también se encuentran en sobrenadantes del vector retrovítico. La preocupación respecto a la contaminación de ácido nucleico surge de la posibilidad de eventos de transformación celular en las células diana, así como inflamación celular en tratamientos *in vivo*. Los límites de contaminación de ADN dependen habitualmente de las dianas de transducción y las aplicaciones. Las diferentes fuentes de ADN contaminante son las células productoras hospedadoras y los plásmidos de transfección transitoria usados en la producción de vectores retrovíticos. Por consiguiente, pueden introducirse DNAsas (por ejemplo, Benzonase® de Merck, Alemania) en el proceso de purificación para reducir la contaminación de ADN. Las partículas víricas y su ADN en el medio celular están representadas por sus actividades específicas. La actividad específica es la actividad biológica de los vectores por microgramo de ADN residual (expresado en TU/μg). Como se menciona previamente, la actividad específica aumenta según disminuyen los contaminante durante el proceso de purificación como se describe en la presente invención.

Como con virus de tipo silvestre, no todas las partículas víricas producidas en una preparación son infecciosas. De hecho, aparecen algunos defectos en las fases de producción del vector de etapa tardía. Típicamente, el ensamblaje de partículas, la encapsidación, el empaquetado de ARN vírico o la gemación pueden dar lugar a algunas anomalías físicas. Por lo tanto, las partículas víricas sin ARN de hebra, con proteínas de cápside alteradas o no existentes, o con las proteínas de envuelta perdidas se producen típicamente junto con vectores infecciosos. Esas partículas físicas desprovistas de cualquier actividad biológica tienen casi las mismas propiedades fisicoquímicas que las partículas biológicamente activas que causan dificultades en su eliminación. De acuerdo con la invención, la relación de partículas físicas a infecciosas o de transducción (PP/TU) se considera óptima cuando la relación está comprendida entre:

900:1 y 200:1, para un lote A crudo, preferiblemente menos de 600;

600:1 y 200:1, para un lote C, preferiblemente 300:1 o menos;

400:1 y 100:1, para un lote D, preferiblemente menos de 300:1.

El aumento de la relación PP/TU antes y después de una etapa de concentración, como se observa para el proceso B (correspondiente a la obtención del lote B), significa que el proceso daña las partículas de vector. Esta relación representa un índice relevante de pureza por varias razones. En primer lugar, da una imagen del estado de los vectores en el sobrenadante crudo y su evolución muestra el impacto del proceso usado para concentrar y purificar los vectores sobre su integridad. Según aumenta, el proceso daña las partículas. En el proceso descrito en esta invención, el título crudo muestra una relación PP/TU comprendida entre 500 y 900, aunque una gran cantidad de estudios obtuvo una

relación mayor de 1000 o más. Merten *et al.*, (2010) dan una relación de 2333 en un lote que contenía un 10 % de suero y recolectaron 2 veces cada 24 h después de la transfección. Este número se calcula siguiendo la fórmula descrita a continuación:

5 PP/TU= $(4,9 \times 10^4 \text{ ng P24/ml} \times 10^7 \text{ PP/ng P24}) / 4,3 \times 10^3 \text{ IG/ml}$ calculado en Merten *et al.* 2010. Un nanogramo de P24 representa 10^7 PP y el título eficaz calculado en el genoma integrado por ml se proporciona en Merten *et al.* Esta mayor relación demuestra que algunos vectores se degradan durante la fase de producción a 37 °C y que los contenidos del suero potencian esta degradación del vector. Esta diferencia resalta que el suero y el tiempo de recolección son puntos clave para iniciar las etapas de concentración y purificación con un lote conveniente que muestre una relación PP/TU menor de 900:1. En una realización preferida de la invención, el tiempo de la primera recolección es entre 24 h y 36 h después de la transfección. Cualquier recolección posterior puede hacerse 12 h de la recolección precedente. Los lotes crudos con una relación mayor no dan lugar al producto final requerido después de las etapas de concentración y purificación.

15 Las composiciones que contienen los vectores descritos en la técnica anterior contienen contaminantes, que pueden tener una influencia dañina sobre el fenotipo de la célula diana y pueden afectar a la capacidad de las células diana, transducidas por preparaciones de vectores retrovéricos, de expresar o expresar elevadamente el transgén de interés. Pueden producirse cambios en dichos fenotipos después de la transducción y la proliferación celular y la viabilidad celular puede verse afectada en las células transducidas. La presente invención proporciona varios procesos de purificación robustos y que se pueden cambiar de escala que permiten una disminución notable en las concentraciones de proteína y ADN contaminantes y en la relación de partículas físicas a infecciosas compatible con las células diana refractarias delicadas y los requisitos de ensayo preclínico *in vivo*.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a comprender mejor la invención, aunque la invención no se limita a estos ejemplos.

Material y métodos

30 Construcción del plásmido. Se usaron tres vectores para producir un virión recombinante o retrovirus recombinante. Un primer vector proporciona un ácido nucleico que codifica genes gap y pol víricos (figura 2A). Estas secuencias codifican un antígeno específico de grupo y transcriptasa inversa (y las enzimas integrasa y proteasa necesarias para la maduración y la transcripción inversa), respectivamente, como se analiza anteriormente. Un segundo vector proporciona un ácido nucleico que codifica una envuelta vírica (env) (figura 2B). Un tercer vector proporciona las secuencias víricas de acción en *cis* necesarias para el ciclo vital del virus (figura 2C). Este tercer vector también contiene un sitio de clonación para una secuencia de ácido nucleico heteróloga a transferir a una célula diana. Se muestra una ilustración esquemática de un vector adecuado en la figura 2C con la GFP como transgén, pero que puede remplazarse por cualquier gen o secuencia de interés tal como ARNhc o miARN.

40 Procesos de fabricación de vectores víricos. Líneas celulares y condiciones de cultivo. Los vectores víricos se produjeron usando la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293T). La línea de células adherentes de carcinoma de colon humano (HCT116; ATCC n.º CCL-247) se usa para la cuantificación de partículas infecciosas. Todas las células se proporcionaron por la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Paisley, RU) complementado con FCS (suero fetal de ternera o suero bovino fetal, FBS) al 10 %; penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 % a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire. Para la producción de sobrenadantes de vectores víricos el DMEM se complementó únicamente con penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 %.

50 Producción de vectores víricos. La producción de vectores víricos se realizó en CellSTACK de 10 capas (6320 cm², Corning). Se sembraron células HEK293T a $9,5 \times 10^3$ células viables/cm² en DMEM complementado con FCS al 10 %; penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 % y se colocaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire. Cuatro días después de la siembra, se desechó el sobrenadante y se reemplazó con DMEM fresco sin FCS complementado con penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 % antes de transfectar las células.

60 La mezcla triple de transfección estaba compuesta por los siguientes tres plásmidos: pENV, pGagPol, pLV-EF1-GFP. La concentración final se ajustó a 40 mg/ml-1 usando agua estéril. Entonces se hizo gotear CaCl₂ (2,5 M) a la mezcla de plásmido-agua en comprobación suave hasta alcanzar una concentración final de 500 mM. La mezcla obtenida entonces se hizo gotear hasta un volumen equivalente de solución salina tamponada con Hepes (HBS 2X) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la incubación, la mezcla de transfección se añadió al medio de cultivo celular y se incubó durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire.

65 24 horas después de la transfección, el sobrenadante se desechó y se reemplazó por DMEM no complementado fresco y las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire. Después del intercambio del medio, se recogió el sobrenadante varias veces (32 h, 48 h, 56 h y 72 h después de la transfección). Se añadió algo

ES 2 726 975 T3

de medio fresco y no complementado y las células se incubaron antes de las recolecciones posteriores a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %.

5 Cada recolección se aclaró por centrifugación durante 5 min a 3000 g antes de microfiltrarse a través de una unidad de filtro estéril de tamaño de poro de 0,45 µm (Stericup, Millipore). El conjunto completo de recolección entonces se combinó para suministrar la recolección cruda.

10 Ensayo de citotoxicidad de LDH. También se usó el kit II de ensayo de citotoxicidad de LDH.(PromoKine) para medir la enzima LDH (Lactate Dehydrogenase) liberada de las células productoras 293T después de la transfección por los plásmidos que codifican partículas de vector lentivírico. El sobrenadante de las células 293T se usó como "control bajo" mientras que las células 293T se lisaron por la solución de lisis celular para que representaran el "control de nivel alto". Después, se realizó el ensayo de LDH según el protocolo del fabricante en cada recuperación de sobrenadante crudo como muestra para evaluar la mortalidad de las células 293T durante los diferentes procesos de producción de vectores lentivíricos. El kit II de ensayo de citotoxicidad de LDH utiliza el reactivo WST (tetrazolio soluble en agua) para la detección de LDH liberada de las células dañadas. El ensayo usa una reacción de acoplamiento enzimático; LDH oxida el lactato para generar NADH, que entonces reacciona con WST para generar un color amarillo. La actividad de LDH entonces se cuantifica con un espectrofotómetro (Glomax MultiDetection System, referencia de Promega) a densidad óptica de 450 nm. El ensayo se repitió una vez por cada sobrenadante crudo ensayado.

20 Concentración y purificación de vectores víricos. La concentración y purificación de la recolección cruda se realizó en primer lugar por ultrafiltración de flujo tangencial usando cartuchos de ficha hueca de polisulfona. El sobrenadante entonces se diafiltró durante 20 volúmenes de diafiltración en una diafiltración de modo continuo frente a DMEM o tampón TSSM. Una vez realizada la diafiltración, el retenido se recuperó y se concentró adicionalmente en unidades desechables de ultrafiltración.

25 El retenido de filtración en fibra hueca (HFF) entonces se trató con benzonasa mediante la adición de benzonasa (250 U/µl) para una concentración final de (72 U/ml) y MgCl₂ (1,0 mM) para una concentración final de 1 µM, antes de incubar a 37 °C durante 20 minutos.

30 El material después de HFF entonces se purificó adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico (IEX) en membrana desechable Sartobind Q75 (Sartorius) usando un sistema purificador AKTA (GE Healthcare). La membrana de intercambio iónico se equilibró con 5 volúmenes de columna de DMEM no complementado (o TSSM) a 2 ml/min. El sobrenadante vírico entonces se cargó en la membrana a 2 ml/min usando un asa de muestreo. Se recogió el flujo directo. Se aplicó el siguiente gradiente en etapas al sistema AKTA: 0 M, 0,5 M, 1,2 M y 2 M de NaCl. El pico de elución (recogido con el gradiente en etapas de 1,2 M de NaCl) se diluyó inmediatamente 10x en el siguiente tapón: Tris 20 mM + sacarosa al 1,0 % p/v + manitol al 1,0 % p/v, pH 7,3 y se concentró adicionalmente en unidades desechables de ultrafiltración.

40 Cuantificación de partículas funcionales usando qPCR. Se realizaron ensayos de titulación de unidades de transducción de la siguiente manera. Se sembraron células HCT116 en placa de 96 pocillos a 12 500 células por pocillo y 250 µl de DMEM complementado con FCS al 10 %; penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (medio completo) al 1 %. Después de 24 h, se realizaron cinco diluciones en serie con medio completo para cada muestra de vector y un patrón interno de rLV-EF1-GFP. Las células se transdujeron mediante estas diluciones en serie en presencia de 8 µg/ml de Polybrene® (Sigma). Para cada serie de muestras, se añade un pocillo de células no transducidas para el control. Tres días después de la transducción, las células se tratan con tripsina y cada sedimento celular se recoge con 250 µl de PBS. Después se colocan 100 µl de la suspensión celular en una cubeta y se mide la intensidad de fluorescencia usando Versafluor (Biorad) en URF (unidades relativas de fluorescencia). El título se determina mediante unidades de transducción/ml (TU/ml) usando el patrón interno cuyo título se determinó previamente por FACS.

50 Cuantificación de partículas física por ensayo de ELISA de p24. El antígeno central p24 se detecta directamente en el sobrenadante vírico con un kit de ELISA de p24 de VIH-1 proporcionado por Perkin Elmer. El kit se usa como se especifica por el proveedor. El antígeno capturado se pone en complejo con anticuerpo policlonal biotinilado contra p24 de VIH-1, seguido de un conjugado de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano rústico). El complejo resultante se detecta por incubación con ortofenilediamina-HCl (OPD) que produce un color amarillo que es directamente proporcional a la cantidad de p24 capturado. La absorbancia de cada pocillo de microplaca se determina usando lector de microplaca y se calibra frente a la absorbancia de una curva patrón de antígeno de p24 de VIH-1. El título vírico expresado en partículas físicas por ml se calcula a partir de la cantidad de p24 sabiendo que 1 pg de p24 corresponde a 10⁴ partícula físicas.

60 Cuantificación de ADN residual. La cantidad residual de ADN en cada muestra se determinó usando el reactivo de ADNdc y los kits Quant-iT kit PicoGreen (Life Technologies) que se especifican por el proveedor. Se realiza una curva de calibración usando un plásmido diluido en tampón de dilución de muestra (DMEM o TSSM). La propia reacción consiste en mezclar 25 µl de la muestra con 25 µl de tampón TE y 50 µl de la solución de trabajo de tinte PicoGreen® en una placa de 96 pocillos. La reacción entonces se incuba en la oscuridad durante 5 minutos para permitir el tinte

65

se una a ADN bicatenario. La fluorescencia de las muestras entonces se miden en un lector de placa a excitación/emisión de 435/535 nm.

5 Cuantificación de proteína total. La cantidad total de proteína en cada muestra se determinó usando el kit de proteína de DCTM (Biorad) cuyo método deriva del método de Lowry. El kit se usa como se especifica por el proveedor. Se realiza una curva de calibración usando BSA diluida en tampón de dilución de muestra (DMEM o TSSM). El ensayo se basa en la reacción de proteína con una solución alcalina de tartrato de cobre y reactivo de Folin. Como con el ensayo de Lowry, hay dos etapas que dan lugar al desarrollo de color: La reacción entre la proteína el cobre en un medio alcalino, y la posterior reducción del reactivo de Folin por la proteína tratada con cobre.

10 Electroforesis en gel de SDS-PAGE. Las muestras se desnaturalizan 5 min a 95 °C en "tampón de muestra 4X" (Biorad) y "agente reductor 20X" (Biorad). Después de la desnaturalización, las muestras se colocan en los pocillos de un "gel Criterion XT de Bis-Tris al 4-12 %" (Biorad). El marcador de peso molecular "patrón de color doble de proteína Precision Plus" se coloca además de las muestras. La migración se realiza en el "tampón XT MOPS" (Biorad). Después de la migración, el gel se aclara varias veces con agua antes de teñirlo con el "tinte de Coomassie Biosafe" (Biorad). Finalmente, se realizan varios aclarados con agua para obtener el contraste deseado.

20 Transducción celular. Cultivo celular. Se obtuvieron líneas celulares de fibroblastos embrionarios pulmonares humanos (IMR90) de la American Type Culture Collection (n.º CCL-186) y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) complementado con suero bovino fetal (FCS; Gibco) al 10 % a 37 °C en una incubadora de atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %.

25 Transducción de células IMR90 usando vectores víricos. Se siembran células IMR90 en placas de 6 pocillos a 50 000 células/pocillos 24 horas antes de la transducción. Las células entonces se transdujeron con vectores lentivíricos que portaban eGFP normalizada a TU a diferente M.O.I. que va de 5 a 200. El sobrenadante de transducción se elimina después de 5 horas. A los 6 días después de la transducción las células se recolectaron y se analizó la expresión de eGFP por citometría de flujo.

30 Ensayo de proliferación celular. La proliferación celular se midió usando el método de reducción de tinte colorimétrico bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma). Las células IMR90 se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1,5x10³ células por pocillo en DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células se cultivaron durante 24 horas antes de la transducción usando vectores víricos a diferente nivel de purificación a M.O.I. 40 y 150 para cada vector vírico. Cinco o catorce días después de las transducción se añadieron 20 µl de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; 5 mg/ml; Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a cada pocillo y se cultivó durante otras 2,5 horas a 37 °C. Después, se desechó el medio de cultivo y se disolvieron los cristales azules oscuro en 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) en cada pocillo. Los pocillos entonces se homogeneizaron antes de medir la densidad óptica (DO) a 560 nm usando un lector de placa espectrofotométrica (Glomax MultiDetection System, Promega). Los ensayos de proliferación se repitieron por triplicado para cada vector vírico ensayado.

40 Ensayo de citotoxicidad de LDH. Se usó el kit II de ensayo de citotoxicidad de LDH (PromoKine) para medir la enzima LDH (lactato deshidrogenasa) liberada de las células después de la transducción. Se sembraron células fibroblásticas humanas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1,5x10³ células por pocillo en DMEM que contenía FCS al 10 % y después el suero se restringió a FCS al 2 % durante 24 h. Las células entonces se transdujeron usando vectores víricos a diferente nivel de purificación a M.O.I. 40 y 150 para cada vector vírico. Seis días de la transducción, se realizó el ensayo de LDH según el protocolo del fabricante. El kit II de ensayo de citotoxicidad de LDH utiliza el reactivo WST (tetrazolio soluble en agua) para la detección de LDH liberada de las células dañadas. El ensayo usa una reacción de acoplamiento enzimático; LDH oxida el lactato para generar NADH, que entonces reacciona con WST para generar un color amarillo. La actividad de LDH entonces se cuantifica con un espectrofotómetro (Glomax MultiDetection System, referencia de Promega) a densidad óptica de 450 nm. El ensayo se repitió por triplicado para cada vector vírico ensayado.

55 Producción de vector de casete vacío para análisis de micromatriz. Se produjo un vector lentivírico que portaba casete vacío (rLV-EF1) sin ADNc, a diferentes purezas para estudios de micromatriz. Los lotes B y C de los vectores rLV-EF1 se purificaron de la misma recolección cruda. Se consiguió una producción adicional en presencia de suero bovino fetal (BIOWEST) al 10 % para general un lote B, a partir de ahora en este documento mencionado como lote B-S.

60 Cultivo de células de prepucio. Se obtuvieron células fibroblásticas de prepucio humanas de la American Type Culture Collection (n.º CRL-2097) y se cultivaron en EMEM (medio esencial mínimo de Earl, GIBCO) complementado con suero bovino fetal (BIOWEST) al 10 %, penicilina/estreptomicina (PAA) al 1 % y glutamina (PAA) 2 mM. Las células se mantuvieron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % y se pasaron dos veces a la semana a 5000 células/cm². La presente invención no está limitada a células primarias, tales como células fibroblásticas de prepucio humanas.

65 Transducción de células de prepucio para análisis de transcriptoma. Se sembraron fibroblastos de prepucio humanos a 5000 células/cm² en matraces T25 24 hora antes de la transducción. Las células se transdujeron por cuadruplicado a M.O.I. 40 y 150 usando los lotes B, C y B-S del vector rLV-EF1 en un volumen final de 5 ml y en presencia de 4 µg/ml

de Polybrene® (Sigma). Un control no transducido recibió únicamente 4 µg/ml de Polybrene®. El sobrenadante de transducción se retira después de aproximadamente 16 h. Las células se trataron con tripsina 54 horas después de la transducción, se lavaron con PBS 1x, se centrifugaron y los sedimentos se mantuvieron a -80 °C. Se tomaron imágenes 48 horas después de la transducción.

Extracciones de ARN. Se extrajeron muestras de ARN total de los sedimentos celulares usando el sistema de purificación de ARN TRIZol® Plus (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN total y la pureza se determinaron usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Nanodrop Technologies). La calidad e integridad del ARN se comprobaron con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE. UU.) y se ajustaron a los requisitos de micromatriz de Agilent.

Experimentos de micromatriz de ADN. Se realizaron experimentos de micromatriz en la plataforma Biochips de Genopole, Universidad de Toulouse, INSA, UPS, INP, CNRS e INRA (Toulouse, Francia) de acuerdo con los protocolos del fabricante. En resumen, después de la adición de una dilución de ARN exógeno del kit de adición de ARN de un color (Agilent Technologies) para la comprobación del control de calidad, 100 ng de ARN total se convirtieron en ARNc, se amplificaron y se marcaron con cianina 3 usando el kit Agilent Low Input Quick Amp. Se hibridaron 1650 ng de ARNc marcado con cianina 3 a 65 °C durante 17 horas a 10 r.p.m. con micromatrices de oligómeros de genoma humano completo Agilent 4x44K versión 2, que contenían 44 000 sondas dirigidas a 27 958 genes. Las matrices hibridadas se lavaron y exploraron en el escáner de alta resolución Agilent G2505C y las imágenes se analizaron usando Feature Extraction 10.10 (Agilent Technologies). Después del control de calidad basado en los informes de QC de Feature Extraction, se retuvieron 3 o 4 réplicas por condición.

Análisis estadísticos de datos de micromatriz. Los conjuntos de datos sin procesar de Feature Extraction se importaron al programa informático GeneSpring® GX 12 (Agilent Technologies) y se normalizaron usando los métodos del 75.º percentil. Las sondas entonces se filtraron por valores de señal atribuidos por GeneSpring® cuando se importan los datos de Feature Extraction (para cada sonda, se ve afectada una de las siguientes señales: "detectado", "no detectado" o "comprometido"). Las sondas detectadas y no comprometidas en más de un 60 % de réplicas en al menos una condición se retuvieron (eliminando las manchas no detectadas o comprometidas). La transformación basal de los valores de intensidad a la mediana de todas las muestras se aplicó para las representaciones de gráfico de perfil. Significa que, para cada sonda, la mediana del logaritmos de los valores resumidos de todas las muestras se calcula y sustrae de cada una de las muestras. Para identificar las sondas expresadas de forma diferencial entre cada condición y la condición de control, se realizaron ensayos de la t independientes con corrección de ensayo múltiple de Benjamini-Hochberg y un valor p corregido <0,05. Las sondas con valor absoluto de cambio factorial (FC) ≥1,5 se retuvieron como expresadas de forma diferencial para sondas tanto reguladas por aumento como reguladas por disminución. Las sondas que tienen valor absoluto de cambio factorial <1,3 se consideraron no diferenciales.

Resultados

Eficacia de transducción celular en diferentes tipos celulares. Cuando se requiere sobreexpresión génica estable o silenciamiento, el primer ensayo a realizar es la elección de la multiplicidad de infección (M.O.I.) requerida para obtener la modulación génica óptima. Todas las células no muestran la misma permisividad a vectores retrovíricos o lentivíricos. Las células diana se transducen con cantidades crecientes de vectores lentivíricos que expresan GFP para determinar las condiciones en que las células se transducen completamente y para identificar el nivel de expresión génica correspondiente. En la figura 3A y 3B, se observa que se según aumenta la M.O.I., en primer lugar el número de células transducidas aumenta hasta un 95-100 % de los células diana y en segundo lugar el nivel de expresión de GFP está potenciado. Este fenómeno se observa en líneas celulares inmortalizada, en células primarias y en células madre. Este resultado muestra un efecto de dosis de suministro génico con el vector lentivírico para todas las células ensayadas, pero también que la M.O.I. usada para un tipo celular no es trasladable a otro tipo celular. Cada tipo celular requiere una M.O.I. específica.

Cuantificación del título de vector lentivírico. Los títulos de virus en general, y los vectores basados en lentivirus en particular, dependen del método y las células usadas para la titulación. La cuantificación de las partículas de vector que pueden conseguir las etapas de la ruta de transducción desde la entrada en la célula hasta la integración génica y la expresión génica depende del propio vector y las características celulares.

Respecto a las células usadas para la titulación del vector, es importante asegurar que como se muestra en las figuras 3A y 3B, las células diana sean fácilmente permisivas, ya que se demostró que la permisividad de todos los tipos celulares no es equivalente. Otro punto es que la eficacia de transducción debe controlarse fácilmente para una cuantificación fiable para cualquier transgén y vector a lo largo del tiempo. En este caso, en cada experimento de titulación se cuantifica un vector lentivírico que expresa GFP convencional en términos de unidades eficaces tanto por FACS (representado por el número de unidades de transducción por ml TU/ml) como qPCR (representado por el número de genoma integrado por ml IG/ml) después de transducción de HCT116 con diluciones en serie de los vectores de acuerdo con el material y los métodos expuestos anteriormente. Ambos resultados dan un número relativo de partículas eficaces para transducción, pero sus números absolutos respectivos no dan el mismo título dependiendo de la propia PCR y la secuencia diana usada para amplificación. Estos datos muestran que es difícil comparar de

forma precisa estas diferentes estrategias basándose en los títulos funcionales en ausencia de métodos normalizados que deben incluir un lote de referencia con un título conocido y un tipo de célula diana definido.

En paralelo, la determinación de las partículas totales se cuantifica con el kit de ELISA de P24 para estimar las partículas de vector totales, incluso aquellas que no contienen ningún ARN genómico y/o que están desprovistas de proteínas de envuelta. Ambos títulos son útiles para determinar la relación entre las partículas físicas PP que refleja las partículas totales y el título biológico que da la capacidad de transducción real. Esta relación da una estimación de la pureza e integridad del vector. Se usa otra relación para reflejar la integridad o infectividad del vector y se expresa como el número de IG por ng de P24 (1 ng de P24 corresponde a 10^7 PP).

Proceso de producción de vectores víricos. Los vectores basados en retrovirus y lentivirus, se producen por transfección triple en células 293T usando procedimientos convencionales con fosfato de calcio. A las 24 horas después de la transfección (Sena-esteves *et al.*, 2004), las células se lavan con medio sin suero y los sobrenadante víricos se recogen 24 horas después y se filtran. Los vectores en la técnica anterior se producen habitualmente en medio que contiene suero y se concentran por ultracentrifugación o centrifugación en unidades centrales proporcionadas por diferentes proveedores. En la presente invención, el lote crudo mencionado como lote A en la figura 5A, muestra un título promedio de aproximadamente 10^6 TU/ml que depende de las construcciones de plásmido de expresión. Después de las etapas de concentración descritas en este documento, en título alcanza hasta 10^7 - 10^8 TU/ml, por ejemplo. Estos lotes de pequeña escala producidos por estos métodos convencionales muestran varios inconvenientes. En primer lugar, el aumento de escala es difícil debido a la capacidad restringida de estos métodos simples. En segundo lugar, los métodos están restringidos a la concentración y no permiten una eliminación significativa del contenido del medio. Para evitar la presencia de proteínas y elementos del suero, el proceso de acuerdo con la invención, recolecta los sobrenadantes del vector en un medio sin suero antes de someter el lote A, a ultrafiltración y/o cromatografía para concentrar y purificar el lote de vector. Esto es importante ya que en algunos casos, los vectores tienen que usarse a alta M.O.I. *in vitro* e *in vivo*, especialmente para vectores lentivíricos no integrantes (figura 10A y 10B).

Influencia del suero en el título del vector. La presente invención proporciona un proceso robusto optimizado para la producción de sobrenadantes víricos de alto título en medio sin suero. Se produjeron vectores lentivíricos rLV-EF1-GFP por transfección triple transitoria en células 293T, en FCS (suero fetal de ternero) al 0, 5 y 10 % usando procedimientos convencionales con fosfato de calcio. El promotor EF1 alfa (factor 1 alfa de elongación humano) es un promotor fuerte ubicuo. Los sobrenadantes víricos se recolectaron y se cargaron 15 µg de proteínas totales en un gel de SDS-PAGE para analizar los contenidos de proteína total. Los resultados muestran que el sobrenadante crudo producido sin suero contiene una cantidad inferior de proteínas directamente ligada a la ausencia de suero. En paralelo, la relación entre PP y TU se determinó con y sin suero. Se demostró que los títulos (TU/ml) y la relación PP/TU permanecían estables en todas las condiciones. Para concluir, la producción de vectores retrovíricos sin suero no disminuye la eficacia de producción del vector (figura 4C), pero disminuye el contenido de proteína total de la muestra (figura 4B y tabla 1).

Recolección secuencial de partículas de vector después de la transfección celular. En este documento se proporciona una comparación de la toxicidad inducida en células productora transfectadas dependiendo de la inducción de butirato de sodio (a las 18 horas después de la transfección) o no y el número de recolecciones durante las 72 h después de la transfección. Estos experimentos muestran que el título funcional es mayor de 10^6 TU/ml en cualquier recolección de sobrenadante crudo y resalta el fuerte impacto del número de recolecciones de sobrenadante y la inducción con butirato de sodio sobre la toxicidad resultante de las células productoras. Por un lado, los solicitantes aprecian que el número de recuperaciones y la inducción o no con butirato de sodio tiene un pequeño impacto sobre el título del sobrenadante crudo con una producción mejorada de unidades de transducción (véase la tabla 3, TU/producción) en un factor de dos para la producción de vector vírico sin inducción con butirato de sodio, recolectado en cinco etapas. Por otro lado, la concentración del ADN total liberado en el sobrenadante crudo producido en ausencia de inducción con butirato sodio y suero, recolectado en múltiples etapas ajustado a las semivida de las partículas de vector, es la más baja, con un factor de siete en comparación con una producción con inducción con butirato de sodio y tiempos de recolección fijados a 64 h y 88 h después de la transfección. Estos resultados se confirman por ensayos de citotoxicidad de LDH hechos directamente en sobrenadante crudo y muestran que la lisis de células transfectadas se limita cuando el sobrenadante crudo se produce en ausencia de inducción con butirato de sodio y suero, recolectado en múltiples etapas ajustadas a la semivida de las partículas de vector. Al mismo tiempo, la concentración de ADN total en el sobrenadante crudo y los niveles de citotoxicidad se aumentan por inducción con butirato de sodio y tiempos de recolección fijados a 64 h y 88 h después de la transfección, que muestra que la lisis celular se potencia en estas condiciones de producción. Cuando el sobrenadante crudo se recolecta sin inducción con butirato de sodio en solamente dos etapas a 40 horas y 64 horas después del lavado de las células, la toxicidad inducida alcanza un 82 % y un 48 % aunque con recolecciones intermedias la toxicidad en las células transfectadas no excede de un 30 % con un promedio de un 13,3 % para las tres primeras recolecciones y un 16,4 % para la última recolección (tabla 3). Por tanto, la recuperación de sobrenadante crudo lograda en múltiples etapas, comprendidas entre 3 y 6, a intervalos regulares es el punto de partida para obtener la composición de vector vírico basado en ARN purificada reivindicada. Las diferentes recolecciones se realizan en tiempos específicos después de la transfección en relación con la semivida de las partículas de vector a 37 °C que es aproximadamente 8 horas dependiendo del tipo de célula productora y el medio de cultivo (Le Doux *et al.*, 1999). La recolección en múltiples etapas relacionada con la semivida del vector, sin

inducción con butirato de sodio y suero son las mejores condiciones para producir un sobrenadante crudo, es decir, Lote A de acuerdo con la presente invención. Estos resultados resaltan que la composición de sobrenadante crudo inicial está en gran medida influida por el propio proceso de producción y esta composición de partida tiene un impacto drástico sobre las células transducidas diana en términos de toxicidad.

5 Concentración y purificación del vector. Los métodos de acuerdo con la invención incluyen dos tipos de lotes de concentración y/o purificación (C y D) asociados con un proceso de producción sin suero (correspondiente a la obtención del lote A). Estos métodos se compararon con un patrón y usaron habitualmente un proceso de
10 concentración basado en ultracentrifugación o centrifugación en unidades centrales (correspondiente a la obtención de lote B). Los diferentes lotes corresponden a diferentes estrategia de purificación que van de ausencia de purificación a varias etapas de purificación basadas en ultrafiltración y cromatografía. Los cuatro procesos de purificación tienen una calidad creciente en términos de eliminación de contaminantes (figura 6 y 7).

15 Proceso A correspondiente a la obtención del lote A: Este de tipo de lote no incluye ninguna etapa de purificación y corresponde a la recolección después del aclarado. Este tipo de lote habitualmente muestra una o más de las siguientes características: (i) un título final promedio a aproximadamente 10^6 TU/ml, que depende de las construcciones de plásmido de expresión (tabla 1); una concentración promedio de contaminantes de ADN finales de hasta 650 ng/ml; (iii) una concentración promedio de contaminantes proteínicos finales de hasta 200 μ g/ml; y (iv) una
20 relación PP/TU final promedio comprendida entre 500 y 900 (tablas 1 y 2) o menos.

Los vectores víricos producidos usando este proceso son adecuados para transducir algunas líneas celulares inmortalizadas permisivas cuando la M.O.I. de trabajo requerida puede ser baja. Este lote se usa como referencia en los estudios de caracterización de eliminación de contaminantes de los otros lotes (es decir, los contaminantes de este lote representan un 100 % de las impurezas del proceso de producción) (tabla 1 y figura 6). Todos los siguientes datos
25 están relacionados con este lote crudo de referencia. El lote A es un lote optimizado a causa de la ausencia de suero e inducción con butirato de sodio y la elección de diferentes tiempos de recolección basados en la semivida específica para la partícula vírica.

30 Proceso B correspondiente a la obtención del lote B. Este proceso corresponde a la recolección después del aclarado (medio de cultivo sin suero) que ha experimentado una etapa de concentración por ultrafiltración usando unidades de centrifugación listas para su uso. Este lote concentrado es el resultado del mismo proceso que el descrito en la figura 4A pero sin suero. Este tipo de lote habitualmente muestra una o más de las siguientes características: (i) títulos de vector finales entre 1×10^7 - 1×10^8 TU/ml; (ii) una recuperación en el proceso de vectores eficaces de acuerdo con la invención, a aproximadamente un 47 % en comparación con el lote A; (iii) un factor de concentración de 95 en
35 comparación con el lote A (tabla 2); (iv) una eliminación de ADN a aproximadamente un 71 % de los contaminantes iniciales en comparación con el lote A; (v) una eliminación de proteínas a aproximadamente un 56 % de contaminantes iniciales (figura 6) en comparación con el lote A; y (vi) una relación PP/TU final promedio a aproximadamente 500 o más (figura 8). Esta relación aumenta en comparación con la obtenida para el lote crudo que muestra que estos métodos de concentración dañaban las partículas víricas durante el propio proceso incluso sin suero. Este fenómeno se amplifica en presencia de suero.
40

Este producto se produce ventajosamente en comparación con los vectores basados en virus publicados previamente con un lote crudo que contiene suero. Muestra las mismas características de los descritos en la bibliografía usando ultracentrifugación (figura 5B). Las ventajas de dicho proceso es la concentración de las partículas de vector retrovírico
45 cuando se requieren títulos mayores que los proporcionados por el proceso A para transducir células. Este proceso se basa en la concentración de la recolección cruda usando una técnica de ultracentrifugación basada en unidades de centrifugación listas para su uso o en ultracentrifugación. Ambos productos producidos sin suero en el sobrenadante crudo muestran el mismo perfil de proteínas después de la carga en un gel de SDS-PAGE (figura 5B). Con suero fetal de ternero (FCS) por ejemplo, el perfil de proteínas de los vectores concentrados con dicha técnica se muestra en la
50 figura 4B y revela una mancha de bandas en que las proteínas víricas específicas son indistinguible por su tamaño o por su baja intensidad. Este resultado nos impulsó a usar este proceso B de concentración sobre lotes de vector producidos sin suero para ser capaces de comparar las consecuencias de los métodos posteriores de concentración y purificación sobre las propias partículas de vector independientemente de la presencia de suero.

55 Para la centrifugación en unidades centrales, el modo de funcionamiento es por filtración de flujo habitual usando fuerzas centrífugas para configurar la presión. Por tanto, dicha técnica no permite el control de presión que es un punto crítico para la integridad y viabilidad de los vectores. El tipo de membrana usada en esta tecnología aumenta las adsorciones no específicas en comparación con otro tipo de membrana. Por lo tanto, no se concentran solamente los vectores, sino también las impurezas. De hecho, se alcanza un bajo nivel de purificación respectivamente entre 1 y 3
60 y entre 1 y 2 para el ADN y las proteínas) (véase la figura 9 como un ejemplo). En paralelo, este proceso es bastante dañino para los vectores retrovíricos biológicamente activos como se muestra por la relación PP/TU que aumenta del proceso A (entre 200 y 350 en los experimentos de los figura 8) hasta el proceso B (hasta 650 en los experimentos de la figura 8). A pesar de dicho aumento en la relación PP/TU, estos procesos de vanguardia basados en ultracentrifugación o ultrafiltración en unidades centrales se usan en gran medida en la bibliografía. Este proceso B es
65 adecuado para transducir líneas celulares inmortalizadas cuando la M.O.I. de trabajo requerida tiene que ser elevada,

pero no está adaptado para transducir células frágiles y primarias o madre que pueden someterse a procesos de diferenciación o reprogramación con requisitos fenotípicos funcionales.

5 En este caso, se consideró que realizar la ultrafiltración sin condiciones de funcionamiento controladas basadas en la fuerza iónica, el pH y la presión no permitirían una separación eficaz incluso para proteínas que difieren en el tamaño en menos de un orden de magnitud. Este último punto es crucial y resalta que una etapa de ultrafiltración ideal no solamente concentrará las partículas de vector, sino que también las purificará eliminando los contaminantes tales como proteínas y ADN de la célula hospedadora dado el gran tamaño de los vectores lentivíricos (120 nm). Por tanto, el siguiente proceso llamado C se ha desarrollado para aumentar el título del lote A conservando al mismo tiempo la calidad y pureza del lote.

15 Proceso C correspondiente a la obtención del lote C. Este proceso corresponde a la recolección después del aclarado (medio de cultivo sin suero) que ha experimentado una etapa de concentración y diafiltración por ultrafiltración usando fibras huecas. Este tipo de lote habitualmente muestra una o más de las siguientes características: (i) un título final entre 1×10^7 - 1×10^8 TU/ml; (ii) una recuperación en el proceso de vectores eficaces de acuerdo con la invención a aproximadamente un 69 % en comparación con el lote A; (iii) un factor de concentración de aproximadamente 25, pero típicamente entre 20 y 40. (tablas 2 y 3); (iv) una eliminación de ADN a aproximadamente un 82 % de los contaminantes iniciales en comparación con el lote A (de un 70 % a un 90 %); (v) una eliminación de proteínas de hasta un 98 % de los contaminantes iniciales en comparación con el lote A (figura 9); y (vi) una relación PP/TU final promedio entre 200 y 600 (figura 8).

25 En este caso, la relación PP/TU permanece estable entre los lotes A y C, lo que muestra que el proceso para obtener el lote C no daña las partículas víricas como para el lote que resulta del proceso B correspondiente al lote B obtenido (figura 8).

30 Las ventajas de dicho proceso son combinar la concentración y la purificación de las partículas de vectores retrovíricos a partir de la recolección cruda aclarada. La técnica es menos dañina para los vectores retrovíricos que la técnica de concentración usada para el lote B. La tecnología de ultrafiltración usada en el proceso para obtener el lote C es muy diferente de la usada para obtener el lote B. De hecho, la estrategia usada en el proceso para obtener el lote C se basa en la concentración de la recolección cruda usando la técnica de ultrafiltración usando fibras huecas. El modo de funcionamiento de esta técnica es por filtración de flujo tangencial usando fuerzas de bombeo para configurar la presión. Dicha técnica permite controlar y adaptar la presión para mantener la integridad y viabilidad de los vectores, de acuerdo con los conocimientos de un experto en la materia. Por ejemplo, el sobrenadante de vector de flujo de entrada debe mantenerse a un bajo nivel y la presión a través de la membrana debe ser baja y completamente estable durante todo el proceso. El tipo de membrana usada en esta tecnología no aumenta las adsorciones no específicas en comparación con la usada para el proceso para obtener el lote B. Por lo tanto, este proceso más suave permite una alta recuperación del vector asociada con alta eliminación de impurezas. Además, la baja tensión de corte conseguida usando esta técnica, permite disminuir la relación PP/TU, a aproximadamente 300 o por debajo (véase la figura 8 como un ejemplo), a partir de la obtenida para la recolección cruda aclarada (lote A). Esta técnica menos dañina permite la fuerte eliminación de la mayoría de las impurezas (respectivamente, un 82 % y un 98 % de los contaminantes iniciales de ADN y proteínas en comparación con el lote A) y permite aumentar el nivel de purificación de 1,7 a 4 y de 1,1 a 32, respectivamente, para ADN y proteínas, en comparación con el lote B (figura 9). Por lo tanto, el buen compromiso entre la recuperación, la eliminación de impurezas y un factor de concentración beneficioso (20) hace que los vectores retrovíricos producidos por este proceso sean la herramienta ideal para transducir células delicadas como las células primarias o madre incluso cuando se necesita una M.O.I. de trabajo elevada.

50 Proceso D correspondiente a la obtención del lote D. Este proceso para obtener el lote D comprende las etapas del proceso usado para obtener el lote C potenciado por una etapa de concentración, después enriquecida opcionalmente por ultrafiltración usando unidades de centrifugación listas para su uso, un tratamiento con benzona y una purificación basada en cromatografía. Este tipo de lote habitualmente muestra una o más de las siguientes características: (i) un título final entre 1×10^7 - 1×10^8 TU/ml; (ii) una recuperación en el proceso (vector de ADN vírico purificado de acuerdo con la invención) a un 12 % en comparación con el lote A; (iii) un factor de concentración de aproximadamente 7 (entre 5 y 10) (tabla 2); (iv) una eliminación de ADN a aproximadamente un 98,8 % de los contaminantes iniciales en comparación con el lote A (de un 80 a un 99 %), (v) una eliminación de proteínas a aproximadamente un 99,9 % de los contaminantes iniciales en comparación con el lote A (de un 80 a un 99 %), (figura 6); y (vi) una relación PP/TU final promedio entre 100 y 400 (figura 8).

60 La ventaja de dicho proceso D es alcanzar los requisitos para inyecciones *in vivo* con una eliminación de proteínas de al menos un 90 % y hasta un 99,9 % y una eliminación de ADN de al menos un 90 % y hasta un 99,9 % 98,7 % de los contaminantes iniciales (figura 6). La etapa de cromatografía IEX (intercambio iónico) permite la separación entre partículas biológicamente activas y no activas para alcanzar la relación PP/TU más baja hasta ahora descrita de menos de 300 (véase la figura 8 como un ejemplo). Este proceso orientado a una alta purificación permite aumentar el nivel de purificación de 20-40 a 120-160 para proteínas (véase la figura 9 como un ejemplo). Este proceso muestra las actividades específicas más altas de todos los procesos descritos en este documento, lo que significa que la eliminación de las impurezas es la más eficaz usando este método de purificación (véase la figura 7 como un ejemplo).

Los vectores retrovéricos producidos de acuerdo con el proceso D, por lo tanto, son adecuados para inyección *in vivo* en mamíferos o animales.

5 Una centrifugación adicional usando unidades listas para su uso (como se usa en el proceso B) puede añadirse al final de los procesos C y D para aumentar el título final. Sin embargo, esta etapa de concentración adicional puede dar lugar a un aumento en la relación PP/TU ya que la unidad de centrifugación lista para su uso daña los vectores a causa de la adsorción no específica al soporte debido a la naturaleza química de la unidad.

10 Como se describe en este documento, se han producido vectores retrovéricos de acuerdo con los procesos usados para obtener los lotes A a D. Las preparaciones de lotes se han comparado para evaluar las consecuencias de la transducción sobre la toxicidad en las células, la viabilidad y la proliferación. Dichas comparaciones son importantes si los vectores retrovéricos tienen que usarse para la transducción de líneas celulares inmortalizadas o para inyección en animales *in vivo* (tabla 2 y figuras 6-9).

15 Transducción celular con vectores que muestran diferentes niveles de concentración y/o pureza. Incluso si los vectores lentivéricos fueran el medio más eficaz de suministro de un gen o un ARNhc en células animales o de mamífero, permanecen varias cuestiones como barreras para el uso de dichos vectores, incluyendo la reproducibilidad del suministro génico, la viabilidad o toxicidad celular, el control del efecto de dosis o la homogeneidad entre los resultados obtenidos en células inmortalizadas, primarias y madre. De hecho, como se describe en la figura 3, la eficacia de transferencia génica requiere el desarrollo específico para determinar la M.O.I. adaptada respecto a los objetivos del experimento y las células diana. Algunas células (U937, linfocitos primarios, células madre hematopoyéticas, THP1) requieren mayor M.O.I. que otras (293T, DA0Y, HCT116). Muy a menudo, las células primarias son menos permisivas que las células inmortalizadas, pero algunas células establecidas como THP1, Jurkat o U937 no necesitan una M.O.I. mayor de 50. Estas M.O.I. se consideran difíciles de aplicar debido a una toxicidad inducida de los vectores lentivéricos (Yamada *et al*, 2003). La transducción con vectores lentivéricos no integrantes (NILV) resalta esta cuestión debido al hecho de que requieren una elevada M.O.I. para transducir de forma eficaz las células diana, como se muestra en la figura 10. De hecho, los vectores NILV requieren una M.O.I. de 40 para transducir un 63 % de las células diana aunque el ILV transduce un 100 % de las células diana a M.O.I. 10. Además, debe usarse una M.O.I. de 150 con NILV para alcanzar el mismo nivel de expresión que con ILV a M.O.I. 5. La transducción eficaz de células madre hematopoyéticas humanas o animales también requiere elevada M.O.I. para reimplantarlas en seres humanos o animales para genoterapia o el desarrollo de modelos animales. Las células primarias también tienen que transducirse a elevada M.O.I. para expresar genes diana a un nivel conveniente para revertir un fenotipo o una enfermedad. El objetivo del presente estudio fue encontrar el equilibrio óptimo entre un nivel de expresión en células diana y la viabilidad celular resultante. Como se demuestra en este documento, reducir los contenidos de proteína y ADN en el sobrenadante de vector concentrado es una manera de proteger las células contra la detención y mortalidad celular. Esto también es una consideración importante para la reprogramación celular en iPS con ILV y NILV para evitar la interferencia de los contaminantes en el proceso de reprogramación.

40 Este documento proporciona soluciones a estos problemas e información complementaria acerca de esta toxicidad aparente. Se han producido vectores lentivéricos con diferentes grados de concentración con una etapa de purificación adicional o no. La concentración del vector se ha alcanzado de acuerdo con las diferentes estrategias usadas basándose en tecnologías usadas habitualmente (basadas en ultracentrifugación o concentración usando unidades centrales ilustrada en la figura 4A o filtración de flujo tangencial ilustrada en la figura 5A). La ultracentrifugación o centrifugación en unidades centrales concentra los vectores lentivéricos, pero también los desechos celulares, los fragmentos de membrana y las proteínas derivadas del medio de cultivo de células productoras de virus. Los datos descritos a continuación muestran que ambos lotes B y C concentrados dan lugar a una misma eficacia de transducción pero inducen consecuencias muy diferentes del fenotipo celular.

50 Composición de vector crudo. Cuando se transfectan de forma triple células 293T para producir vectores retrovéricos o lentivéricos recombinantes en ausencia de suero, estas células detienen el crecimiento y pueden secretar en el sobrenadante proteínas de sobrecarga y elementos tóxicos. La figura 11A muestra que las células productoras de virus muestran una alta tasa de producción de LDH después de la transfección triple. Este resultado resalta la presencia en el medio de cultivo de proteínas tóxicas secretadas por la línea celular productora durante la producción de vector. Este material indeseado en la preparación cruda, pero también en el lote concentrado, puede inducir perturbaciones celulares cuando se usa para transducir células diana especialmente en células primarias delicadas y puede causar reacciones inmunogénicas en modelos animales experimentales después de administración *in vivo*. Esta composición de vector crudo se ve afectada claramente tanto por el número como por el tiempo de recolección del vector después de la transfección como se muestra en la tabla 3. El efecto LDH de la recolección del vector se aumenta cuando el sobrenadante de vector se recolecta en un intervalo de 24 h sin considerar la semivida del vector. El efecto de LDH es inferior al 30 % cuando, por ejemplo, se repiten cuatro recolecciones en intervalos de 12-16 h como se describe en la tabla 3, pero alcanza respectivamente un 80 % y un 48 % cuando las recolecciones de vector se repiten en un intervalo de 24 h. Por tanto, la recuperación de sobrenadante crudo realizada por múltiples etapas de recogida, que comprende entre 3 y 6 recogidas, a intervalos específicos proporciona un método para obtener una composición de vector vírico basado en ARN purificada, es decir, un sobrenadante crudo recuperado. Las múltiples etapas de recogida se eligen a tiempos específicos después de la transfección dependiendo de la semivida de las partículas de vector a 37 °C, que es aproximadamente 8 horas, dependiendo del tipo de célula productora y el

medio de cultivo usado (Le Doux *et al.*, 1999). Por tanto, además de la ausencia de suero durante la producción del vector, este segundo parámetro basado en el tiempo y el número de recolecciones durante la producción del vector permite producir un material de partida crudo de alta calidad que minimiza no solamente la concentración de proteínas, sino también la citotoxicidad. En este caso, se demuestra que una combinación de etapas resumidas en la figura 5A puede reducir los efectos indeseables en las células diana. Este proceso incluye medio sin suero, recolección y ultrafiltración secuenciales.

Efecto de la pureza sobre la eficacia de transducción celular. Se investigó los efectos de transducción del vector sobre células primarias, células de prepucio (ATCC-CRL-2097), varios días después de la transducción. Los cuatro lotes descritos anteriormente mencionados como lotes A, B, C y D se produjeron y usaron para transducir células dianas a M.O.I. media y elevada respectivamente de 40 y 150 para evaluar un efecto gradual del propio vector y el entorno del vector. En primer lugar, las células se comprobaron para determinar si pueden expresar el gen indicador GFP y los resultados de la expresión de GFP con los diferentes lotes se demuestran en las figuras 12A y 12B, respectivamente, cinco y once días después de la transducción. Estos datos muestran que todas las células transducidas expresan a alto nivel el gen indicador GFP con todos los lotes. Entonces, el nivel de expresión de GFP parece ser independiente del grado de purificación. Una vez que un vector entra en células diana viables, las rutas de transducción no se restringen y la expresión de transgén es eficaz. En paralelo, estas imágenes muestran que los números de células en todos los pocillos son muy diferentes incluso si se siembra en placa el mismo número de células dos días antes de la transducción.

Efecto de la pureza sobre la proliferación y viabilidad celular. Seis y once días después de la transducción, se observaron células transducidas con todos los tipos de vector. Se realizaron los mismos experimentos en células de prepucio a M.O.I. 40 y 150 para evaluar la cantidad de células resultantes en cada condición. Como se presenta en la figura 13, se observa un efecto de la pureza del vector sobre la viabilidad celular ya que el número de células transducidas con el lote B representan solamente un 6 % del número de células transducidas con el lote C en las mismas condiciones. Este resultado se confirmó usando un ensayo de MTT colorimétrico para evaluar la viabilidad de la tasa de proliferación de las células diana después de la transducción. La figura 14A muestra que la transducción de células con lote B induce un retardo del crecimiento proporcional a la M.O.I. usada. Una detención del crecimiento de un 40 % y un 70 % se observa respectivamente a M.O.I. 40 y 150. Esta detención del crecimiento puede explicar la baja cantidad de células después de la transducción con el lote B observada anteriormente. De hecho, después de 11 días de cultivo celular después de la transducción incluyendo un pase, los resultados muestran que el número de células se ve afectado en una gran proporción con el lote B tanto a M.O.I. 40 como 150 aunque a M.O.I. 40, la cantidad de células es estable cuando las células se transducen con el lote C o D. A mayor M.O.I., la cantidad de células se ve afectada a un grado menor que con el lote B. No se observó diferencia significativa entre los lotes C y D, lo que sugiere que el nivel de purificación alcanzado después de la ultrafiltración es suficiente para proteger a las células contra una detención del crecimiento celular para experimentos *in vitro*. En la figura 14B y 14C, la tasa de proliferación de células transducidas con los A, B, C y D se determinó y se confirmó que el lote C protege a las células contra la detención del crecimiento previamente observada. La transducción de células con un lote B-S muestra una detención celular amplificadas en comparación con las obtenidas cuando las células se transducen con un lote B que resalta que la combinación de la ausencia de suero y ultrafiltración es crucial.

Efecto de la pureza sobre el transcriptoma celular. Para evaluar los efectos de la transducción del vector de acuerdo con el nivel de pureza independientemente de cualquier transgén, se transdujeron células fibroblásticas de prepucio a M.O.I. 40 y 150 con lote B y C de rLV-EF1 (sin ADNc) derivado de la misma recolección cruda y cuyas características se resumen en la figura 15B. Las células se observaron 48 horas después de la transducción como se presenta en la figura 15A. Fue visible un ligero retardo del crecimiento a M.O.I. 40 con células transducidas con lote B en comparación con células no transducidas, aunque no fue apreciable ninguna diferencia del crecimiento después de la transducción con el lote C a la misma M.O.I. A M.O.I. 150, pudo observarse una fuerte detención de la proliferación con el lote B en comparación con células no transducidas, mientras que se observó un retardo del crecimiento únicamente moderado con el lote C. Para explorar los cambios subyacentes al nivel transcripcional, estas células se recogieron 54 horas después de la transducción. Se extrajo el ARN y se usó para realizar micromatrices de genoma humano completo Agilent que permite la cuantificación de casi todos los transcritos humanos. Los niveles de ARN de las células transducidas con el lote B y C de rLV-EF1 a M.O.I. 40 y 150 se compararon con ARN de células no transducidas. Después de los análisis estadísticos, se retuvieron sondas reguladas por aumento o reguladas por disminución 1,5 veces o más para cada comparación. Cruzando estos datos, pudo identificarse un conjunto de genes expresados de forma diferencial con el lote B frente a no transducidas que no se veían afectadas con el lote C frente a no transducidas para cada M.O.I. Estos dos conjuntos de genes están representados en diagramas de dispersión y gráficos de perfil en la figura 16A y B para M.O.I. 150 y en la figura 16C y D para M.O.I. 40. Como se demuestra, las variaciones en los niveles de transcrito de genes seleccionados en células transducidas con lote B frente a células no transducidas son más pronunciadas a M.O.I. 150 que a M.O.I. 40, donde las variaciones son ligeras. Estos datos muestran un impacto distinto sobre el transcriptoma de células transducidas cuando se usan diferentes niveles de pureza de los vectores.

Efecto del suero sobre el transcriptoma celular. Para evaluar los efectos de la composición del medio del vector después de la producción son suero, se produjo vector rLV-EF1 (sin ADNc) en presencia de suero al 10 % y se concentró usando el proceso B, que produce un lote B-S, cuyas características se resumen en la figura 17B. Este lote se usó para transducir células de prepucio a M.O.I. 40 y M.O.I. 150. Las células se observaron 48 horas después de

la transducción, como se muestra en la figura 17A. Es visible una detención del crecimiento después de la transducción con lote B-S en comparación con células no transducidas. Esta detención del crecimiento es más fuerte a mayor M.O.I. en comparación con M.O.I. 40. De manera destacable, pudieron observarse agregados después de transducción del lote B-S, y su volumen aumenta con la M.O.I. Estas células se recogieron 54 horas después de la transducción para extracciones de ARN e hibridaciones de micromatriz. Sorprendentemente, se apreció, durante el tratamiento con tripsina, que las células transducidas con el lote B-S eran más difíciles de desprender que las células transducidas con el lote B o C, o células no transducidas. Los niveles de ARN de las células transducidas con el lote B-S a M.O.I. moderada o mayor se compararon con el ARN de células no transducidas usando micromatrices de genoma humano completo Agilent. Después de los análisis estadísticos, se retuvieron las sondas reguladas por aumento o reguladas por disminución 1,5 veces o más para cada comparación. Para identificar las sondas asociadas con vectores producidos con suero, se seleccionaron sondas que se expresaban de forma diferencial con el lote B-S (a M.O.I. 40 y 150) frente a la condición no transducida, y que no se veían afectadas con los lotes B y C (a M.O.I. 40 y 150). El conjunto correspondiente de genes está representado en el gráfico de perfil mostrado en la figura 18. Estos datos confirman un claro impacto de la presencia de la transducción con un lote producido con suero sobre el transcriptoma de células transducidas sobre el transcriptoma de células transducidas.

Efecto de la pureza sobre el transcriptoma celular. Para evaluar los efectos de la transducción del vector de acuerdo con el nivel de pureza e independientemente de cualquier transgén, se transdujeron células fibroblásticas de prepucio a M.O.I. 40 y 150 con vector vírico sin ADNc (rLV-EF1) lote B y C derivado de la misma recolección cruda. Las células se observaron 48 horas después de la transducción como se presenta en la figura 15A. Fue visible un ligero retardo del crecimiento a M.O.I. 40 con el lote B, aunque no fue apreciable ninguna diferencia del crecimiento con el lote C a la misma M.O.I. A M.O.I. 150, pudo observarse una fuerte detención de la proliferación con el lote B, mientras que se observó un retardo del crecimiento únicamente moderado con el lote C. Para explorar los cambios subyacentes al nivel transcripcional, estas células se recogieron 54 horas después de la transducción. Se extrajo el ARN y se usó para realizar micromatrices de genoma humano completo Agilent que permite la cuantificación de casi todos los transcritos humanos. Los niveles de ARN de las células transducidas con vector vírico sin ADNc (rLV-EF1) lote B y C a M.O.I. 150 se compararon con el ARN de células no transducidas. Después de los análisis estadísticos, se retuvieron las sondas reguladas por aumento o reguladas por disminución 1,5 veces o más para cada comparación. Cruzando estos datos, un conjunto de genes expresados de forma diferencial con el lote B que no se vio afectaba con el lote C pudo identificarse para cada M.O.I., como se muestran en las figuras 16A-16D (diagrama de dispersión M.O.I. 40 y diagrama de dispersión M.O.I. 150).

El procesamiento posterior de las estructuras macromoleculares complejas como virus y vectores es actualmente uno de los retos principales en el campo, especialmente cuando se requiere una elevada M.O.I. con células resistentes o usando vectores lentivíricos no integrantes. En estos casos, hay únicamente dos posibilidades para alcanzar una elevada M.O.I. para un número dado de células diana: el volumen del sobrenadante crudo añadido a las células diana se aumenta cuando es posible, o el sobrenadante del vector se concentra. Muy a menudo, los científicos evitan usar una elevada M.O.I. principalmente porque se enfrentan a la integración de demasiados números de copias de vector en el ADN genómico diana. El efecto de los contaminantes suministrados por las células productoras en las células diana no es realmente predecible dependiendo de las células diana. Habitualmente, los usuarios atribuyen la toxicidad observada más al propio vector que a los contaminantes presentes en el medio que contiene vector.

Se investigó la aplicabilidad de una combinación de etapas para obtener vectores retrovíricos y lentivíricos de alta calidad. Las condiciones funcionales adecuadas se ensayaron inicialmente y se optimizaron teniendo como objetivos la recuperación del vector y, también, la calidad del producto en término de efectos sobre las células diana. La producción del vector sin suero muestra el mismo nivel de producción en crudo sin dañar el título, pero da lugar a alguna toxicidad en las células productoras como se muestra en la figura 11. También se validó la ultrafiltración como un buen proceso para la concentración y purificación parcial de sobrenadantes retrovíricos. Como se muestra, la ultrafiltración en unidades centrales o ultracentrifugación es un proceso ineficaz no solamente para la concentración de sobrenadante de vector crudo, sino también para la concentración de vectores purificados después de una ultrafiltración o una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. De hecho, para aumentar el título del vector ambos lotes C y D se sometieron a una centrifugación en unidades centrales y se observó un aumento en la relación de PP/TU que muestra que afecta a la infectividad retrovírica probablemente debido a adsorción no específica de los vectores a las membranas. El proceso de ultrafiltración seleccionado en esta ocasión y descrito como el proceso C, se basa en la concentración de la recolección cruda usando la técnica de ultrafiltración usando fibras huecas. El modo de funcionamiento de esta técnica es por filtración de flujo tangencial usando fuerzas de bombeo para configurar la presión. Dicha técnica permite vigilar y controlar la presión, que es un punto importante para mantener la integridad y viabilidad de los vectores. El tipo de membrana usada en esta tecnología no aumenta las adsorciones no específicas en comparación con la usada para el proceso B. Sorprendentemente, se determinó que las presiones de trabajo, la temperatura y el flujo son los puntos clave de un proceso satisfactorio de ultrafiltración. En una realización de la invención, el flujo comprende entre 400 y 600 ml/min y la TMP (presión a través de a membrana) es entre 41,36 y 62,05 kPa (6 y 9 psi).

Por tanto, la concentración y purificación de los vectores lentivíricos para transducir células diana incluye un parámetro crucial diferente al aumento de escala y la seguridad: la viabilidad y el estado celular después de la transducción celular. El sobrenadante del vector debe considerarse como la mezcla de los propios vectores y los contaminantes

celulares tales como proteínas y ADN de la célula hospedadora que pueden inducir efectos dañinos en las células diana. En este documento se incluyen otros parámetros para definir un vector con capacidad de transducción de células diana sin afectar a la viabilidad y la proliferación celular:

- 5 (i) una relación PP/TU promedio entre 300 y 900 para un lote crudo. Un aumento en esta relación durante la etapa de concentración es un indicador de daño al vector y predice la existencia de desechos de los vectores que podrían interferir con la transducción y la viabilidad de las células diana;
- 10 (ii) la eliminación del ADN después de la concentración a aproximadamente un 82 % de los contaminantes iniciales y siempre entre un 70 % y un 99 % en comparación con el lote A; y
- (iii) la eliminación de las proteínas después de la concentración hasta un 90 % de los contaminantes iniciales en comparación con el lote A producido en medio sin suero.

15 Los productos identificados como vectores que muestran características requeridas para aplicaciones clínicas (Merten *et al.*, 2010) son diferentes de los productos A, C y D basados en el uso de suero en el medio de cultivo de las células productoras que induce una composición diferente del producto del proceso A. De hecho, la composición de proteínas y la relación PP/TU son respectivamente 25 y 5 veces mayores en sus condiciones antes de la concentración que en el lote A. Ambos parámetros tienen un efecto sobre los procesos posteriores de concentración/purificación ya que la

20 concentración final de proteínas es 150 veces mayor en sus condiciones, después de la concentración, que en nuestros lotes C y D. Otro análisis de lotes dedicados a ensayos de genoterapia clínica se han descrito en la bibliografía, pero no se estableció vinculación entre la PP/TU y los contenidos de contaminantes y su efecto sobre las células diana en términos de viabilidad y proliferación.

25 Los productos de los lotes C y D pueden alcanzar una alta eficacia de expresión en un 100 % de las células transducidas con menos de un 30 % de toxicidad a M.O.I. media y menos de un 40 % a M.O.I. elevada, aunque el producto B da lugar a dos veces menos proliferación celular que el lote C en las mismas condiciones de cultivo. (Figuras 13 y 14). Los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con el lote A son equivalentes a los obtenidos con el lote B probablemente debido al gran volumen requerido para alcanzar estas M.O.I. con un lote crudo.

30 La eliminación de proteínas y ADN están representadas en este documento por las actividades específicas de ADN y proteínas respectivas que son idealmente mayores de 10^7 TU/ μ g de ADN y 10^9 TU/mg de proteínas para evitar una pérdida de viabilidad o proliferación de las células diana. Por tanto, hay que centrarse en la eliminación de proteínas de las células hospedadoras. Aunque el proceso B, correspondiente a la obtención del lote B, permite únicamente un

35 56 % de eliminación de las proteínas hospedadoras, el proceso C elimina un 98 % de las proteínas iniciales, por ejemplo. Por tanto, incluso si las proteínas de la célula hospedadora parecen pasar a través de todas las membranas, la mala eliminación de las proteínas puede deberse a una adsorción no específica en la membrana seguida de obstrucción de la membrana. Dichas proteínas contaminantes entonces se encuentran en la fracción de recuperación con los vectores.

40 Los resultados descritos en este documento pueden explicar la renuencia de los científicos a usar una M.O.I. elevada con lotes B de vector habituales debido a toxicidad celular frecuentemente observada, especialmente cuando se usan células primarias o madre. Sin embargo, a veces una M.O.I. baja o media no es suficiente para dar lugar a una eficacia de transducción de alto nivel como se demuestra en las figuras 3A y 3B para células madre hematopoyéticas, por

45 ejemplo. Las primeras etapas de la ruta de transducción pueden restringirse en algunas células diana que dan lugar a un bajo número de copias del vector integrado y, por tanto, requieren una M.O.I. elevada y un lote C o D adaptado.

Esta toxicidad elimina una subpoblación de células diana o inhibe la diferenciación celular después de transducción celular. La presente invención muestra que estos inconvenientes cruciales pueden superarse usando no solamente vectores concentrados, sino también purificados. Claramente, la ultracentrifugación y la centrifugación en unidades listas para su uso (lote B) no son convenientes ya que inducen efectos dañinos en las células diana. El uso de un

50 proceso basado en ultrafiltración (lote C) requiere un desarrollo técnico preliminar, pero permite un lote de alta calidad adecuado para la integridad y proliferación celular. Además, esta técnica se puede cambiar de escala fácilmente para una producción a gran escala. Como se demuestra en este documento, los contaminantes del medio ejercen un efecto

55 sobre las células delicadas primarias. Este aspecto puede considerarse también para hacer líneas celulares inmortalizadas cuando se usan vectores del lote C en ensayo funcional para validación de dianas génicas o para el cribado de fármacos. Las células transducidas seleccionadas resistentes a un lote de vector concentrado, pero no suficientemente purificado no representan una población celular normal respecto a los aspectos fisiológicos o metabólicos. Otro problema real radica en la ausencia de reproducibilidad de la función génica o el efecto de fármaco

60 observado en células inmortalizadas genéticamente modificadas y modelos primarias incluso cuando se realizaba la transducción con la misma herramienta lentivírica.

Por lo tanto, los productos divulgados en este documento se validan mediante una relación entre el vector en términos de unidades de transducción y partículas físicas y la importancia de la composición del medio que limita el efecto sobre

65 la proliferación y viabilidad de células primarias y madre, o sobre el metabolismo de dichas células, permitiendo de este modo estudios reproductivos de función génica y diferenciación celular.

Los resultados de acuerdo con este invención muestran el efecto crucial del vector y su medio en las células diana para genoterapia, la validación de la diana génica tanto *in vitro* como *in vivo*, el cribado de fármacos o teragnósticos y en cada campo que tienen en cuenta la integridad celular para explorar el efecto génico o molecular o una combinación de ambos.

Referencias

10 Aloia RC, Tian H, Jensen FC. 1993. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (11):5181-5.

Andreadis ST, Roth CM, Le Doux JM, Morgan JR, Yarmush ML. 1999. Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy. *Biotechnol Prog* 15(1):1-11.

15 Baekelandt V, Eggermont K, Michiels M, Nuttin B, Debyser Z. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther.* noviembre de 2003; 10(23):1933-40.

20 Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*. 2010; 27(1):53-62.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

25 Clapham P, Nagy K and Weiss RA (1984). Pseudotypes of human T-cell leukemia virus types 1 and 2: neutralization by patients' sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2886-2889.

Coroadinha AS, Ribeiro J, Roldao A, Cruz PE, Alves PM, Merten OW, Carrondo MJ. 2006. Effect of medium sugar source on the production of retroviral vectors for gene therapy. *Biotechnol Bioeng* 94(2):24-36.

30 Cooper AR, Patel S, Shantha Senadheera S, Plath K, Kohn DB, Hollisa RP. Highly efficient large-scale lentiviral vector concentration by tandem tangential flow filtration. *Journal of Virological Methods*, Volumen 177, tema 1, octubre de 2011, 1-9.

35 Grzenia DL, Carlson JO, Wickramasinghe. Tangential flow filtration for virus purification. *J. Membrane Science*, 321 (2008) 373-380.

Le Doux JM, Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML 1999. Kinetics of retrovirus production and decay. *Biotech. Bioeng.* 63, 654-662.

40 Manganini M, Serafini M, Bambacioni F, Casati C, Erba E (2002). A human immunodeficiency virus type 1 pol gene-derived sequence (cPPT/CTS) increases the efficiency of transduction of human nondividing monocytes and T lymphocytes by lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 13: 1793-1807.

45 Merten OW, Charrier S, Laroudie N, Fauchille S, Dugué C, Jenny C, Audit M, Zanta-Boussif MA, Chautard H, Radrizzani M, Vallanti G, Naldini L, Noguez-Hellin P, Galy A. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical *ex vivo* gene therapy application. *Hum Gene Ther.* marzo de 2011; 22(3):343-56.

50 Miguel Sena-esteves, Jessica Tebbets, Sabine Steffens, Timothy Crombleholme, Alan W. Flake. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *Journal of Virological Methods* 122 (2004) 131-139.

O'Keeffe RS, Johnston MD, Slater NK. 1999. The affinity adsorptive recovery of an infectious herpes simplex virus vaccine. *Biotechnol Bioeng* 62(5):537-45.

55 Ott DE. 1997. Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol* 7(3):167-80.

Reiser, J. Production and concentration of pseudo-typed HIV-1 based gene transfer vectors. *Gene Ther* 7: 910-913.

60 RimaiL, Salmee I, Hart D, Liebes L, Rich MA, McCormick JJ. 1975. Electrophoretic mobilities of RNA tumor viruses. Studies by Doppler-shifted light scattering spectroscopy. *Biochemistry* 14(21):4621-7.

Rodrigues T, Carvalho A, Carmo M, Carrondo MJT, Alves PM, Cruz PE. Scaleable purification process for gene therapy retroviral vectors. *J. Gene Medicine*, 9 (2007) 233-243.

65

- Rodrigues T, Carrondo MJT, Alves PM, Cruz PE. 2007. Purification of retroviral vectors for clinical application: Biological implications and technological challenges. *J Biotechnol* 127(3): 520-41.
- 5 Salmeen I, Rimai L, Liebes L, Rich MA, McCormick JJ. 1975. Hydrodynamic diameters of RNA tumor viruses. Studies by laser beat frequency light scattering spectroscopy of avian myeloblastosis and Rauscher murine leukemia viruses. *Biochemistry* 14(1):134-41.
- 10 Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*. 1 de febrero de 1997; 89(3):776-9.
- 15 Slepushkin V, Chang N, Cohen R, Gan Y, Jiang B, Deausen E, Berlinger D, Binder G, Andre C, Humeau L, Dropulic B. Large scale purification of a lentiviral vector by size exclusion chromatography or mustang Q ion exchange capsule. *Bioprocessing Journal* septiembre/octubre (2003) 89-95.
- Sven Ansorge, Olivier Henry, Amine Kamen. Recent progress in lentiviral vector mass production. *Biochemical Engineering Journal* 48 (2010) 362-377.
- 20 Trubey CM, Chertova E, Coren LV, Hilburn JM, Hixson CV, Nagashima K, Lifson JD, ott DE. 2003. Quantification of HLA class II protein incorporated into human immunodeficiency type 1 virions purified by anti CD-45 immunoaffinity depletion of microvesicles. *J Virol* 77(23):12699-709.
- 25 Trubey CM, Chertova E, Coren LV, Hilburn JM, Hixson CV, Nagashima K, Lifson JD, ott DE. 2003. Quantification of HLA class II protein incorporated into human immunodeficiency type 1 virions purified by anti CD-45 immunoaffinity depletion of microvesicles. *J Virol* 77(23):12699-709.
- Van Reis R, Zydney A. Membrane separations in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. abril de 2001; 12(2):208-11.
- 30 Verhoeyen E, Cosset FL. 2004. Surface-engineering of lentiviral vectors. *J Gene Med* 6 Supl. 1:S83-94.
- Yee JK, Friedmann T, Burns JC. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43 Pt A: 99-112.
- 35 Yamada K, McCarty DM, Madden VJ, Walsh CE. Lentivirus vector purification using anion exchange HPLC leads to improved gene transfer. *Biotechniques*. mayo de 2003; 34(5):1074-8, 1080.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol* 73: 2886-2892.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de partículas retrovíricas basadas en ARN, que comprende:

- 5 (i) transfección de una célula productora, modificada para eliminaciones complementarias en el genoma vírico de ARN sobre el que se basa el vector vírico, y cultivo de las células productoras en condiciones adecuadas para permitir la producción de partículas de vector vírico, en el que dicho cultivo después de la transfección se realiza en medio sin suero;
- 10 (ii) recogida del sobrenadante que contiene dichas partículas de vector vírico basado en ARN, realizándose la recogida de dicho sobrenadante durante las 72 h después de la transfección de las células productoras, por múltiples etapas comprendidas entre 3 y 6, a intervalos regulares de tiempo específicos dependiendo de la semivida de la partícula de vector a 37 °C en el medio de la célula productora

15 de modo que las partículas de vector se protegen de la degradación en el medio celular y la lisis de las células productoras está limitada; comprendiendo dicho método ninguna etapa de inducción con butirato de sodio.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la recogida del sobrenadante va seguida de aclarado por centrifugación.

20 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además una etapa de ultrafiltración tangencial y diafiltración, realizándose preferiblemente la ultrafiltración en cartuchos de fibra hueca de polisulfona.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una etapa de cromatografía de intercambio iónico.

25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho intervalo de tiempo supone aproximadamente dos veces dicha semivida de las partículas de vector.

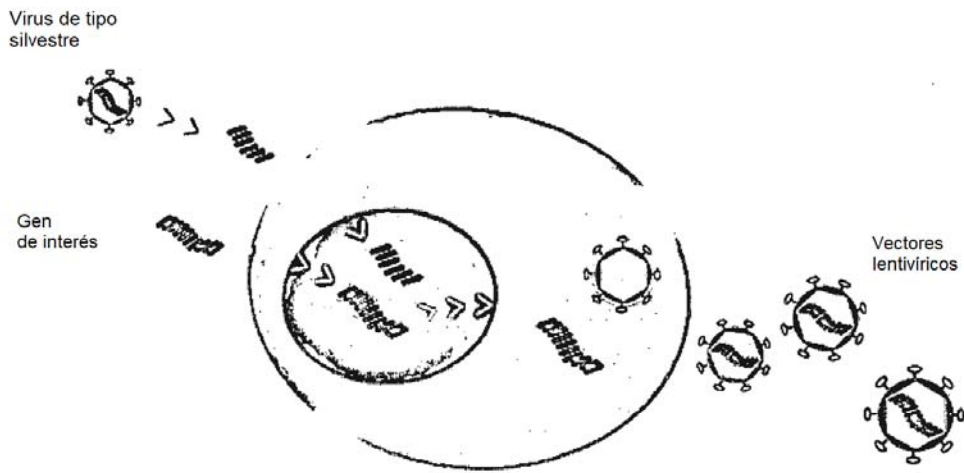
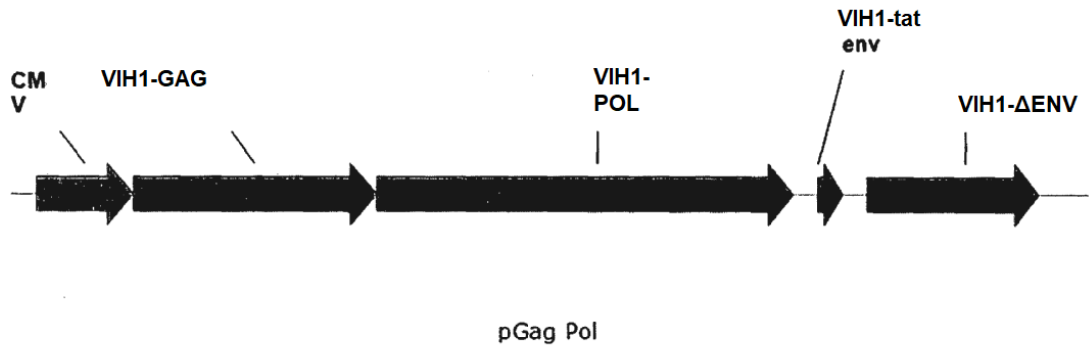
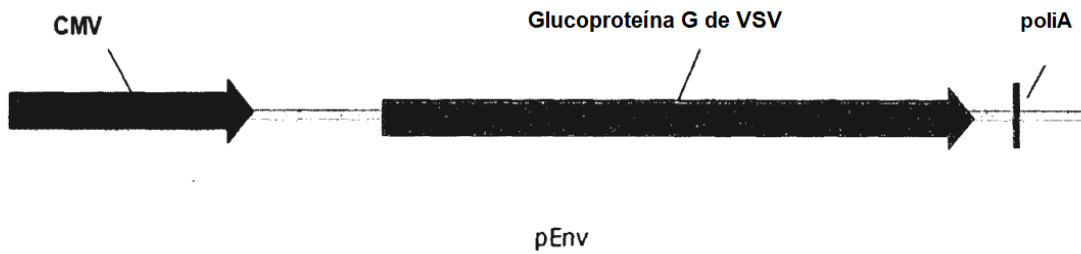


Figura 1



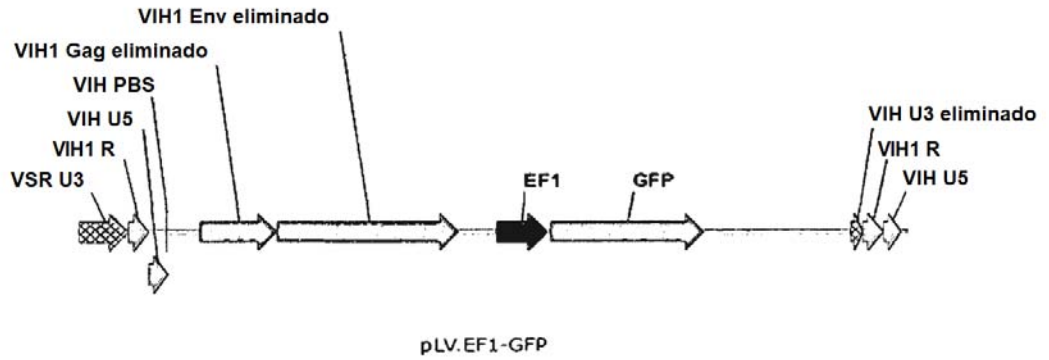
CARACTERÍSTICAS	Longitud (pb)	
promotor	602	/marcador=CMV
CDS	1502	/marcador=VIH1_gag
CDS	2737	/marcador=VIH1-pol
CDS	1173	/marcador=VIH1-env eliminado
unión de proteína	204	/marcador=VIH1_RRE

Figura 2A



CARACTERÍSTICAS	Longitud (pb)	
Promotor	677	/marcador=CMV
CDS	1642	/marcador=VSV_glucoproteína\G
Señal de poliA	768	/marcador=HBB2

Figura 2B



Plásmido de expresión de transgén sin ADNc

CARACTERÍSTICAS	Longitud (pb)
región de repetición	230
Característica	119
CDS	362
Promotor	236
CDS	719
Característica	18
región de repetición	55
región de repetición	95
región de repetición	85

/marcador=VSR_U3
/marcador=señal de empaquetamiento
/marcador=VIH1_gag eliminado
/marcador=EF1_promotor
/marcador=EGFP
/marcador=Sitio de Unión a Cebador PBS
/marcador=VIH_U3 eliminado
/marcador=VIH_R
/marcador=VIH_U5

Figura 2c

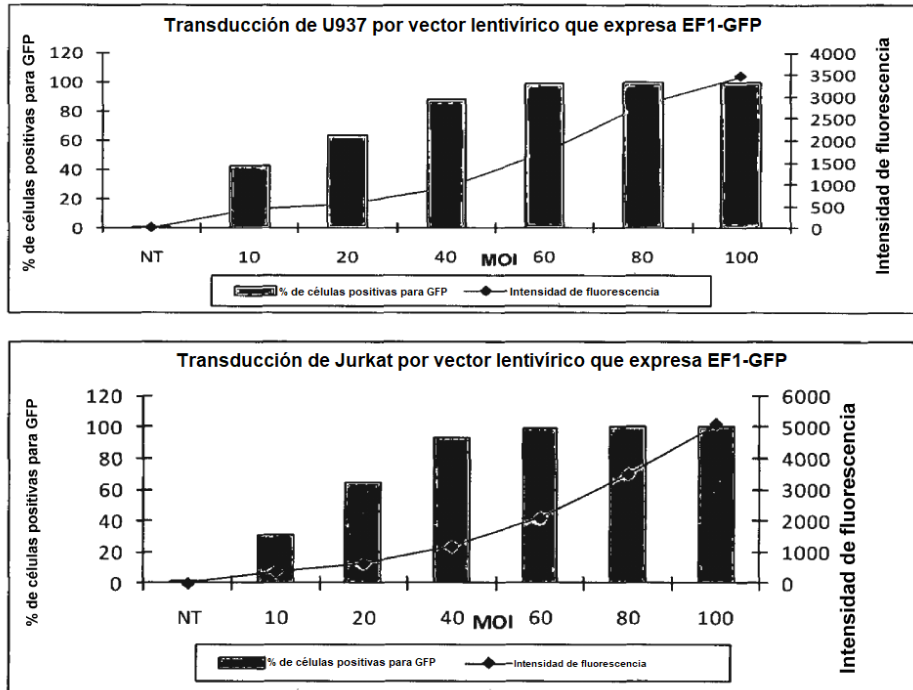


Figura 3A

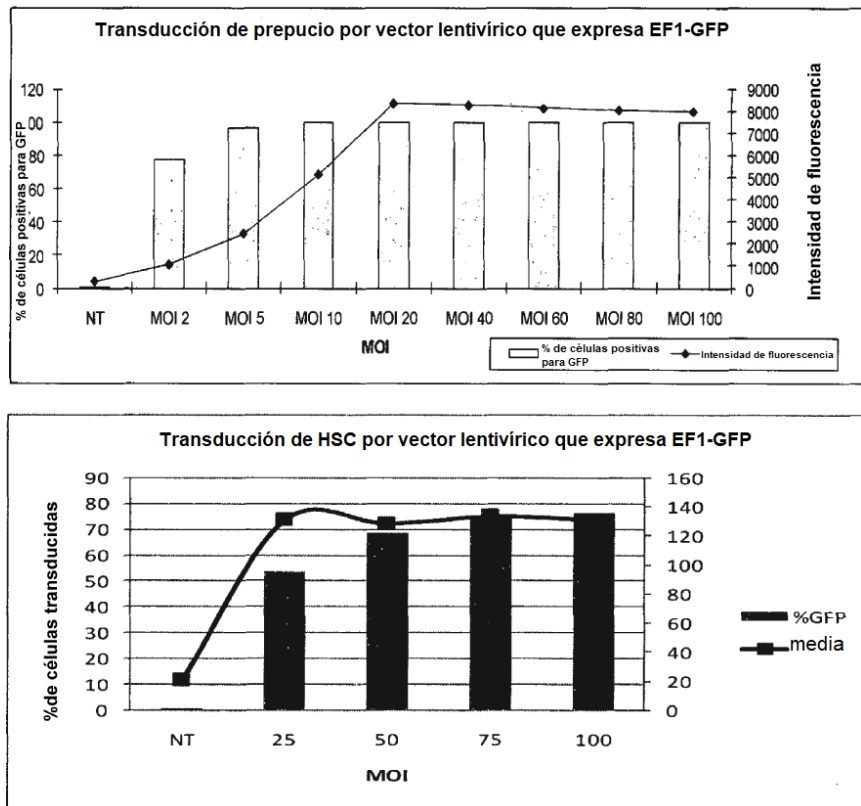


Figura 3B



Figura 4A

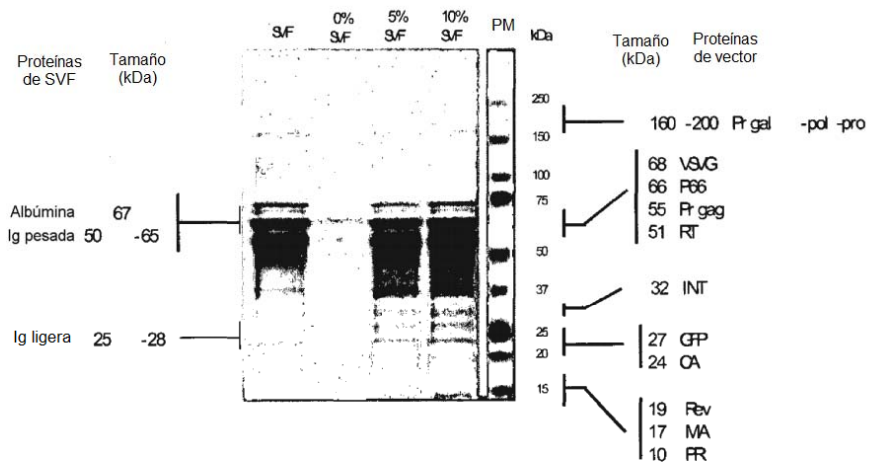


Figura 4B

% SVF	Título (TU/ml)(1)	PP/TU (2)	TU/prot tot (TU/mg) (3)
10%	1,20E+06	192	3,90E+05
5%	8,00E+05	263	3,90E+05
0%	1,80E+06	161	1,90E+06

Figura 4C

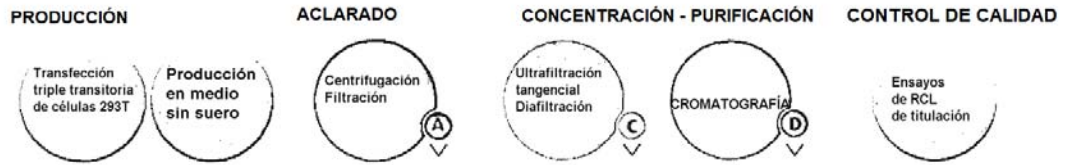


Figura 5A

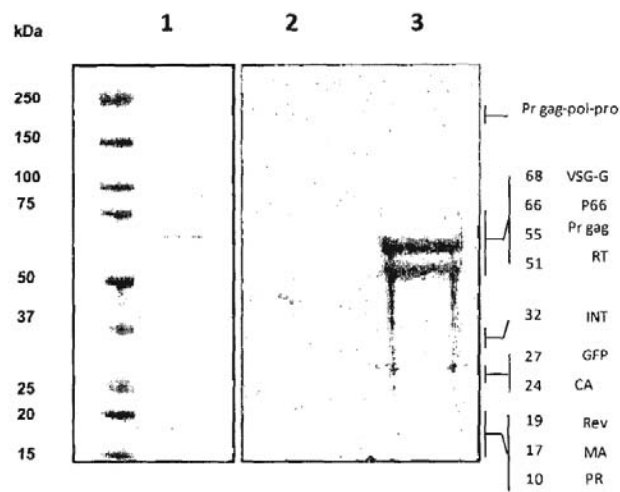


Figura 5B

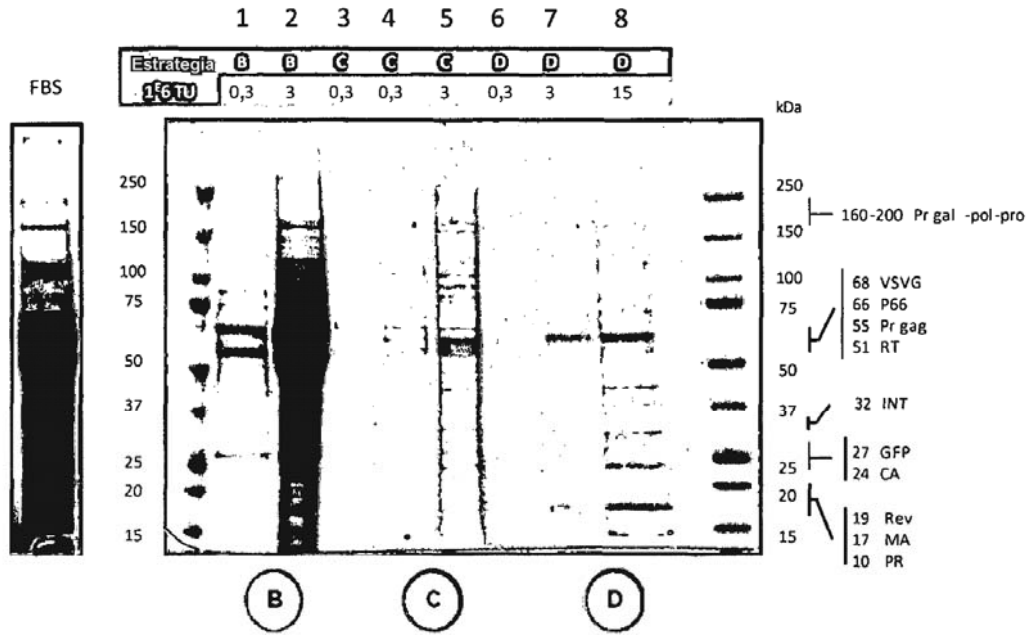


Figura 5C

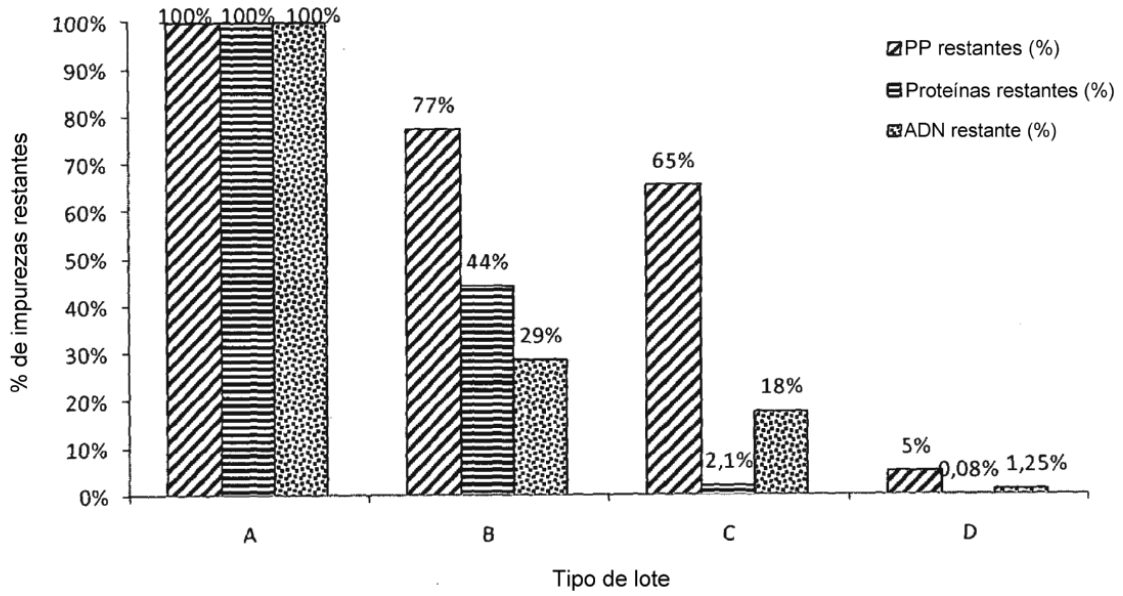


Figura 6

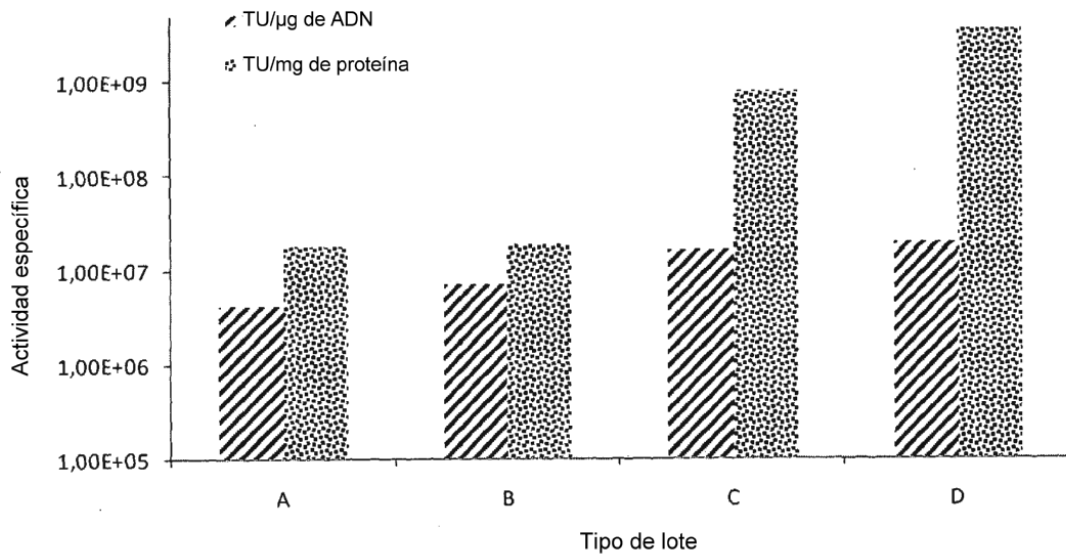


Figura 7

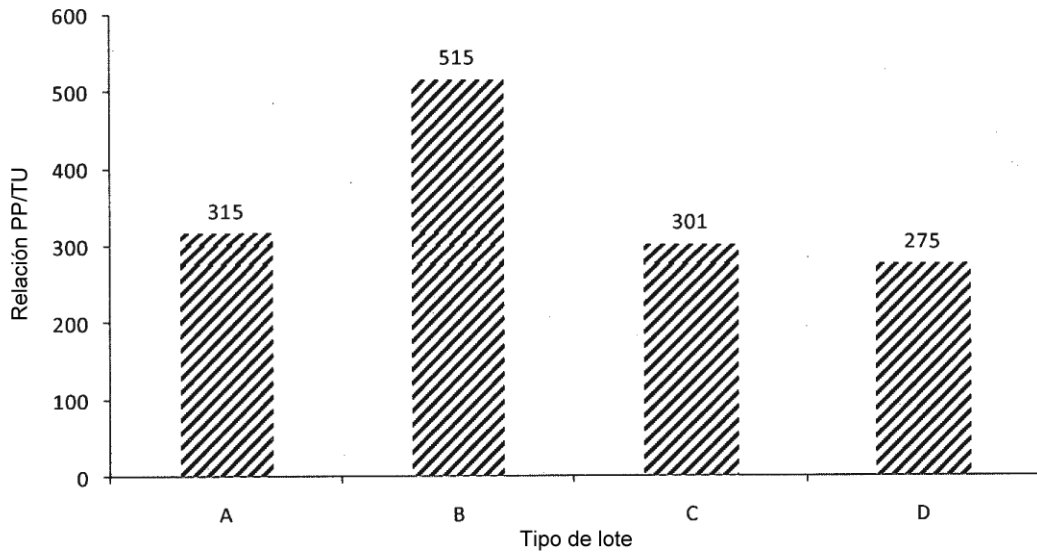


Figura 8

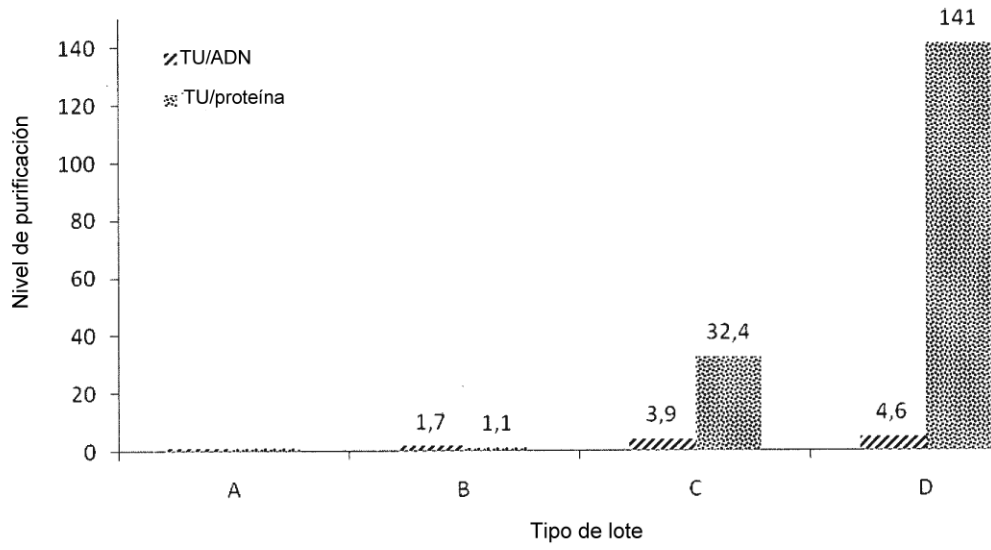


Figura 9

Figura 10

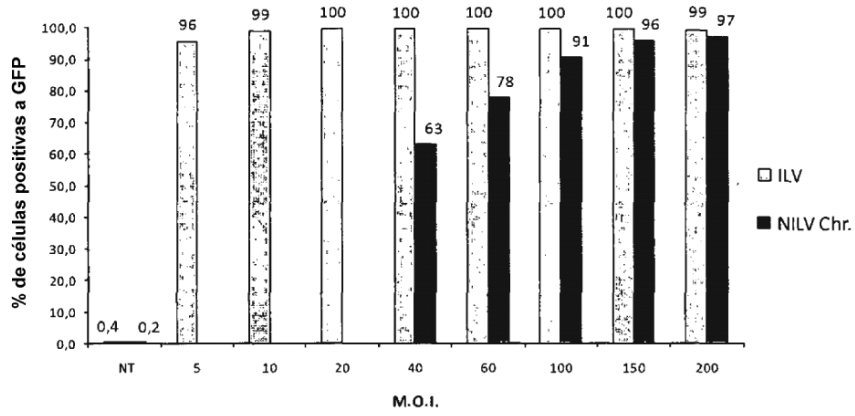


Figura 10A

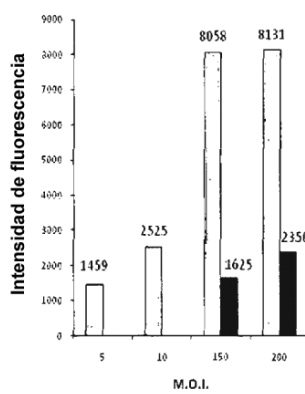
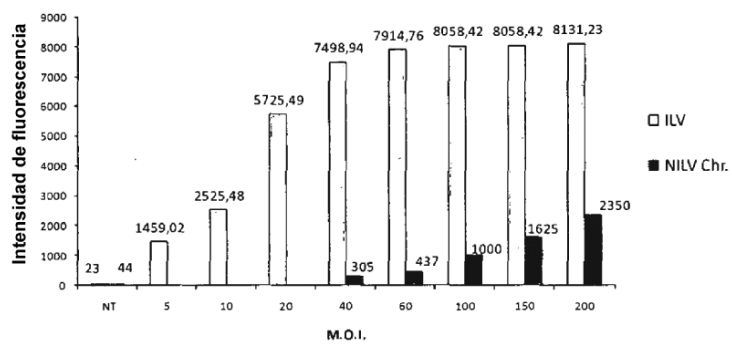


Figura 10B

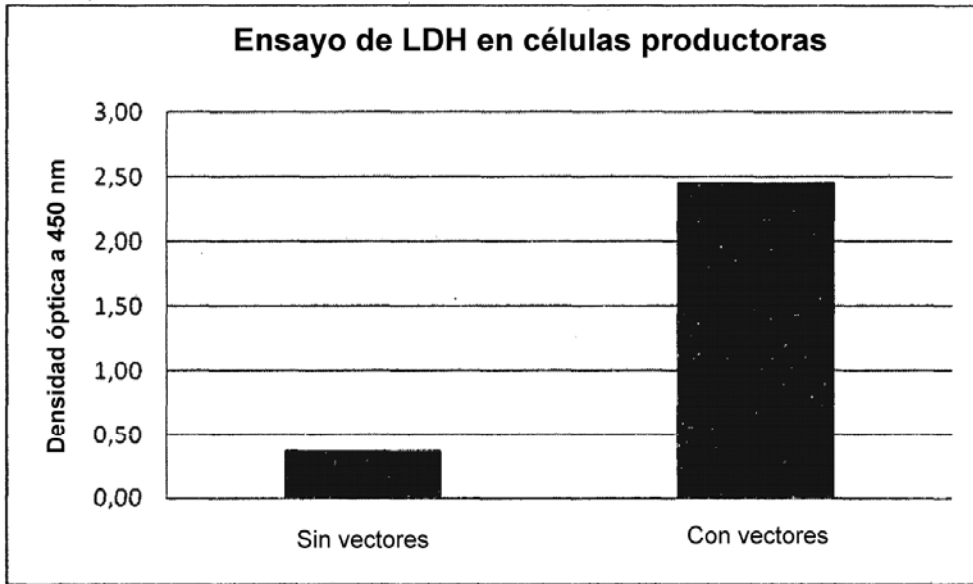


Figura 11

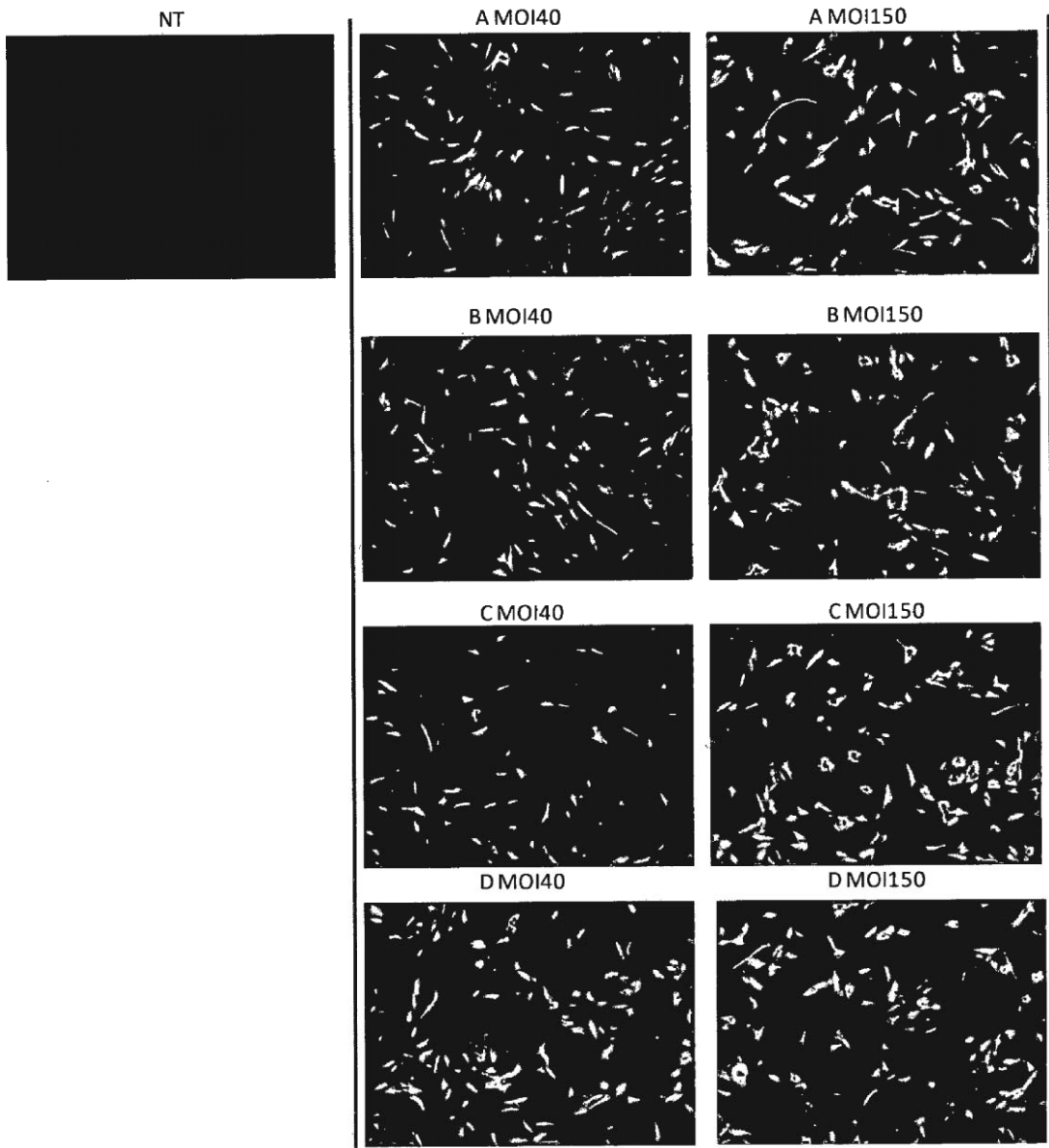


Figura 12A

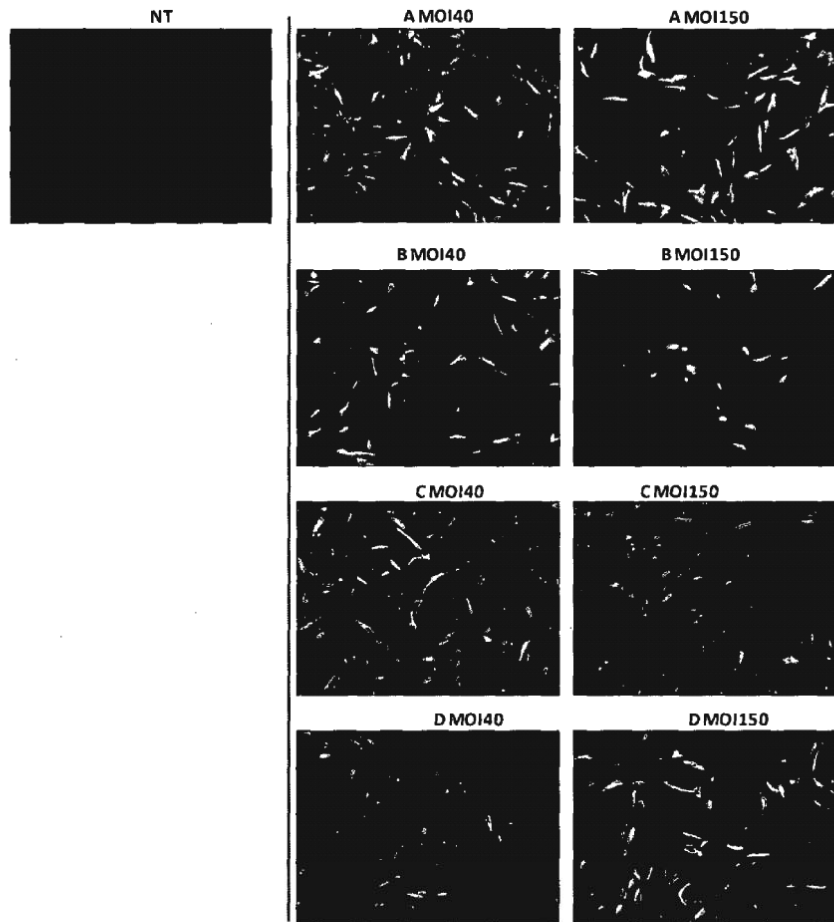


Figura 12B

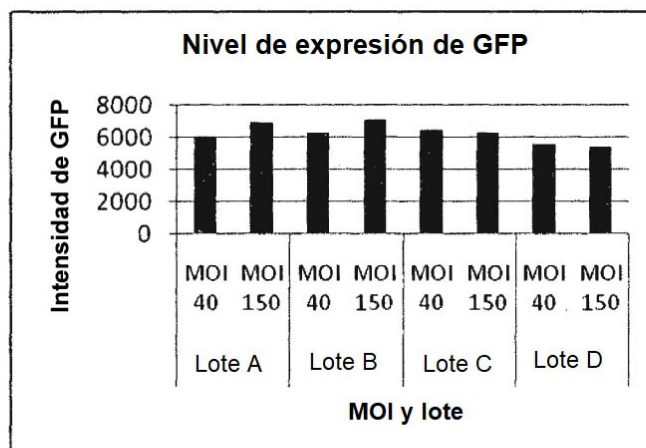


Figura 12C

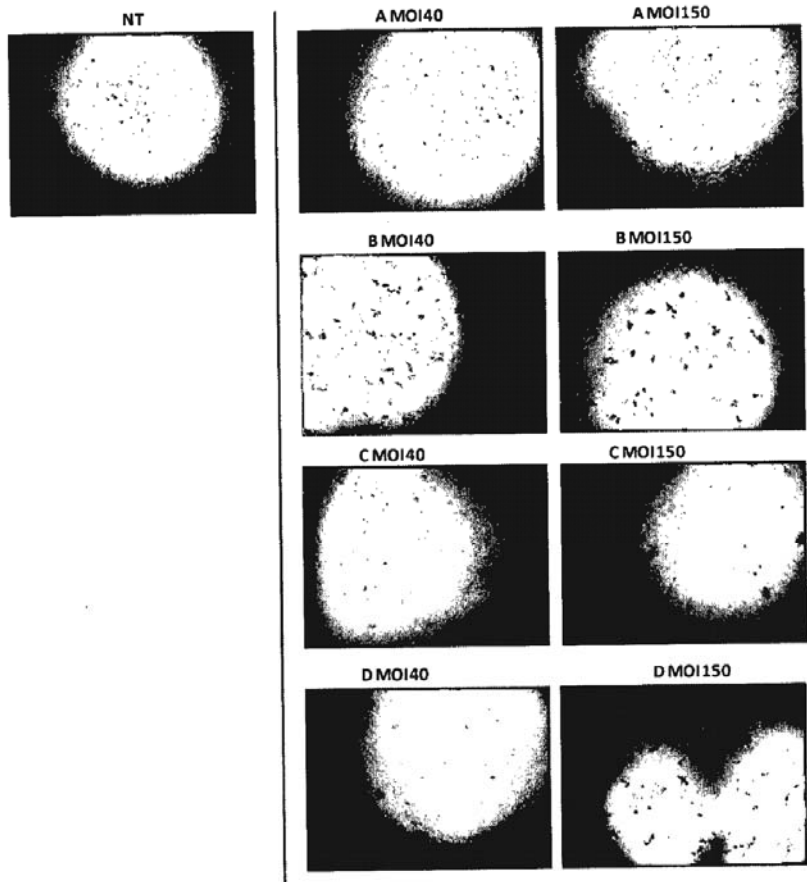
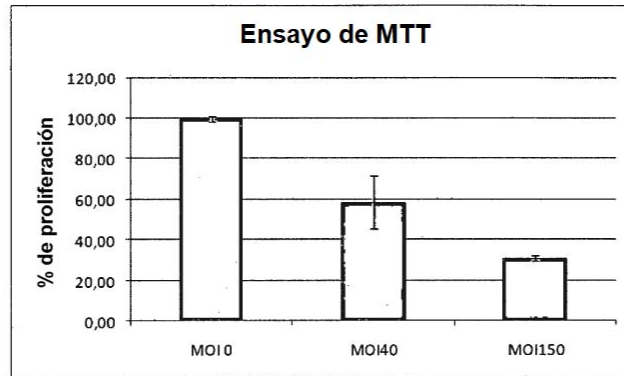


Figura 13



	MOI 0	MOI 40	MOI 150
una vez	98,03	44,24	32,46
duplicado	100,75	55,63	29,63
triplicado	100,24	75,83	30,73
media	99,67	58,57	30,94
DT	1,18	13,06	1,17

Figura 14A

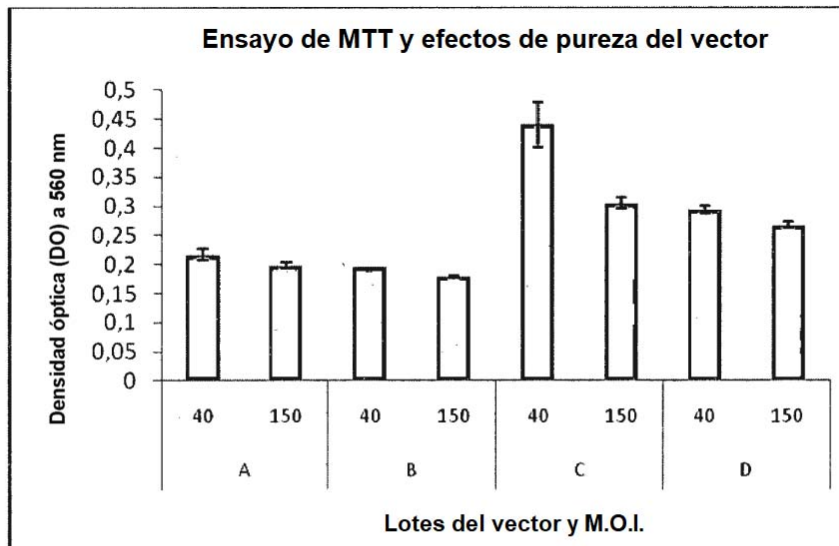


Figura 14B

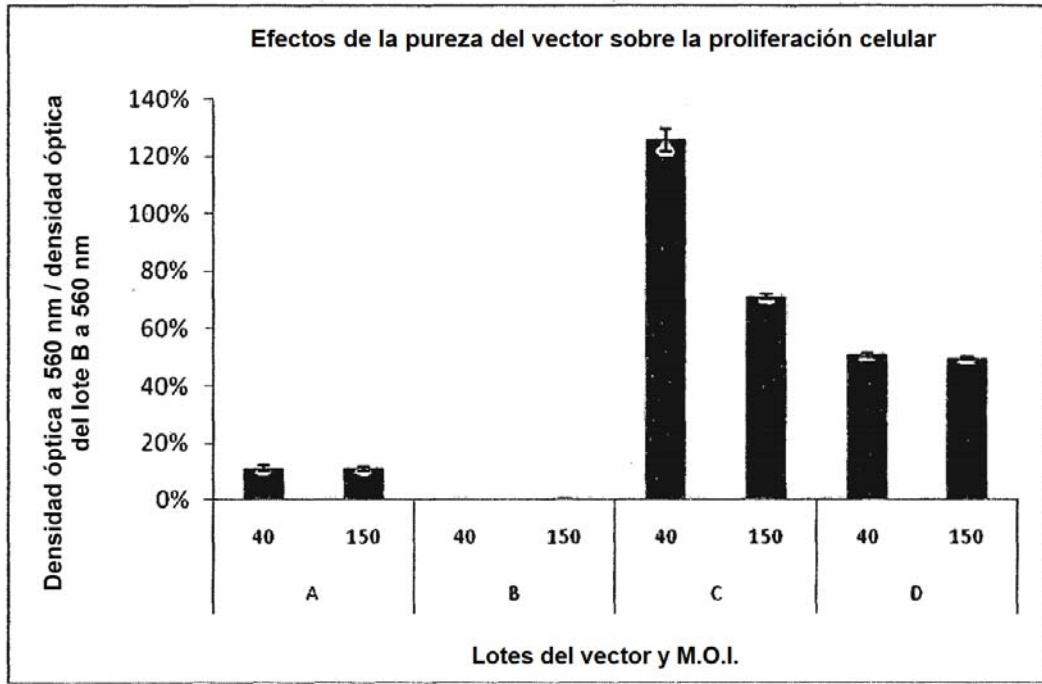


Figura 14C

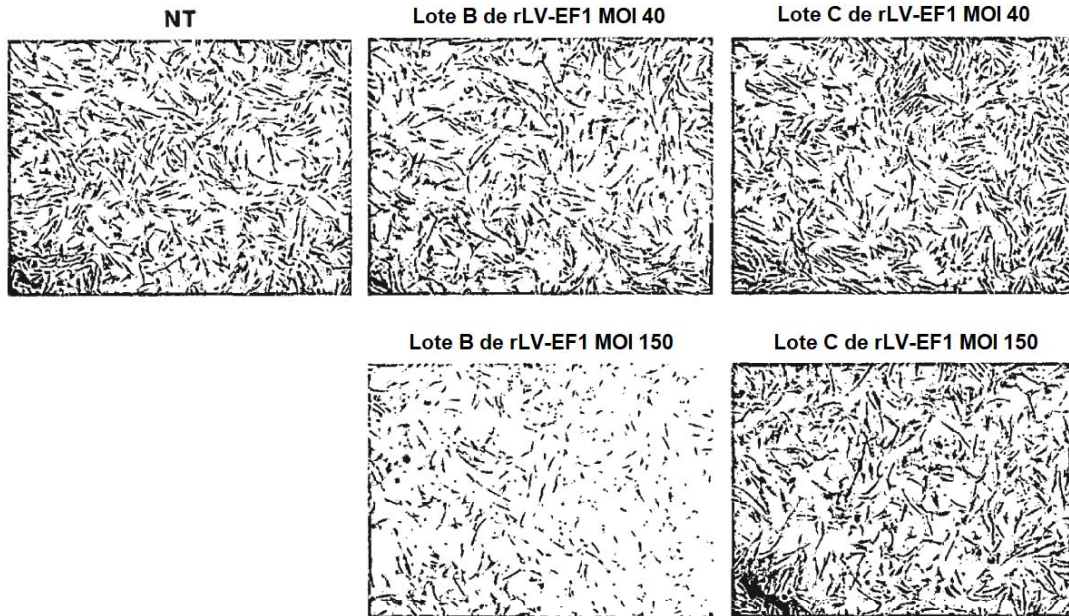


Figura 15A

	Título (TU/ml) (1)	TU/ADN total (TU/μg) (2)	TU/proteínas totales (TU/mg) (3)	PP/TU (4)
Lote B de rLV-EF1	4,7E+08	9,1E+06	4,3E+07	104
Lote C de rLV-EF1	8,9E+09	2,0E+07	3,7E+08	67

Figura 15B

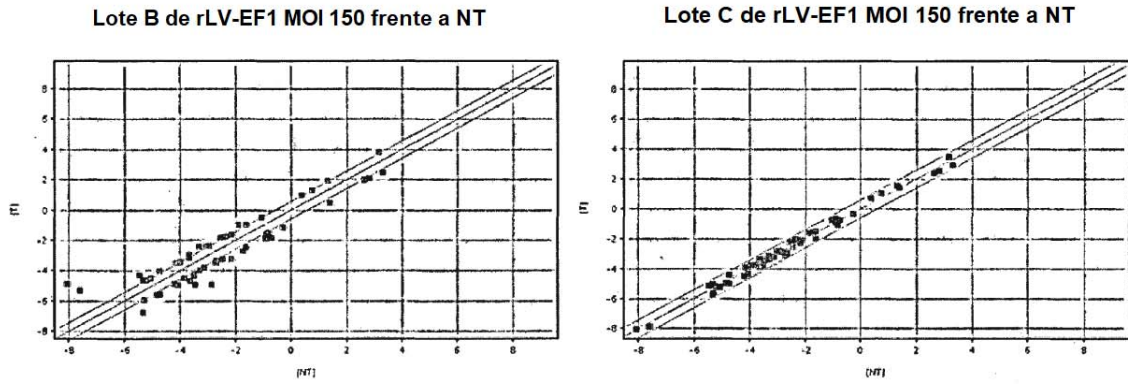


Figura 16A

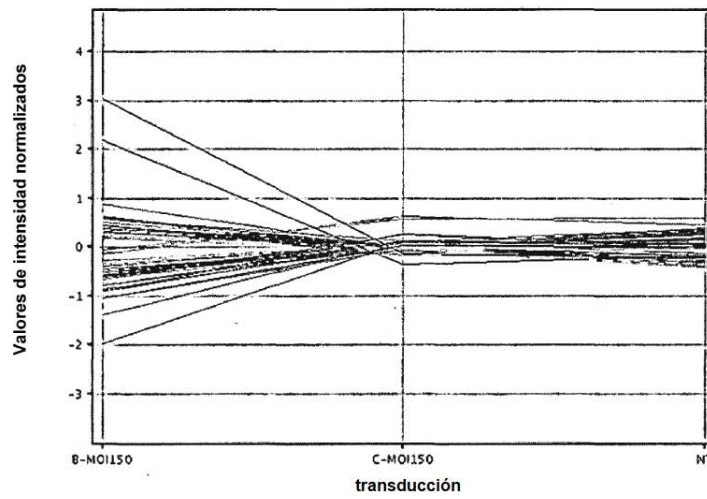


Figura 16B

Lote B de rLV-EF1 MOI 40 frente a NT

Lote C de rLV-EF1 MOI 40 frente a NT

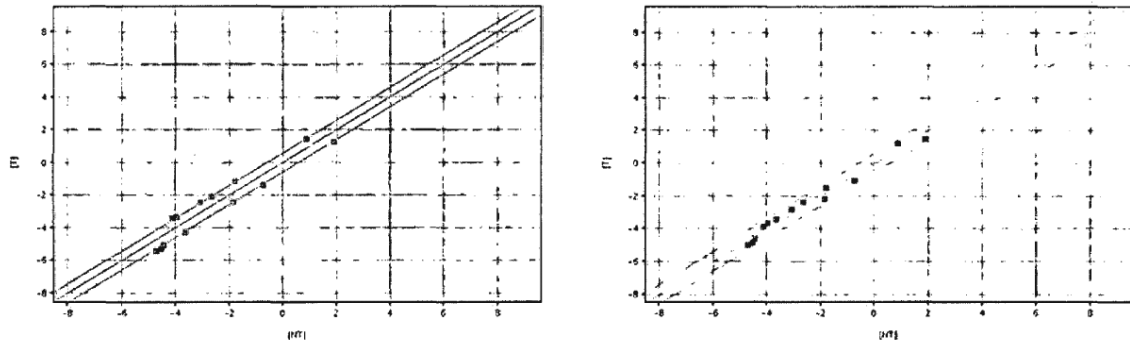


Figura 16C

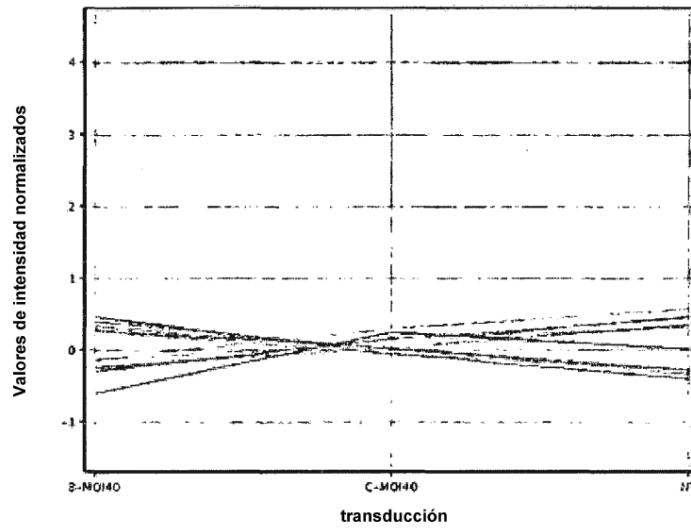


Figura 16D

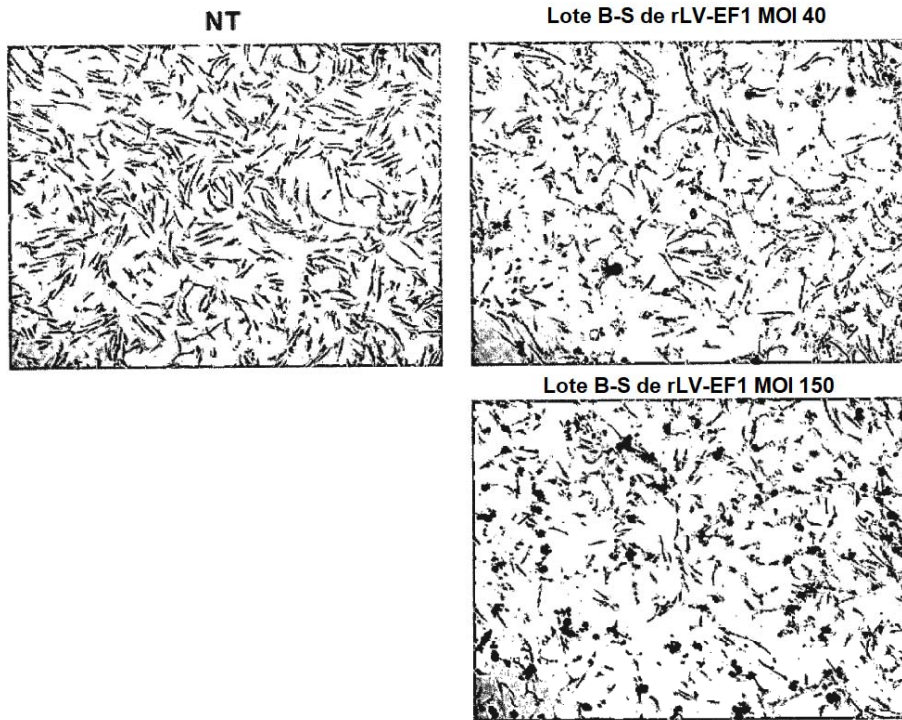


Figura 17A

	Titulo (TU/ml) (1)	TU/ADN total (TU/ μ g) (2)	TU/proteínas totales (TU/mg) (3)	PP/TU (4)
Lote B-S de rLV-EF1	3,3E+07	4,7E+05	1,1E+05	1017

Figura 17B

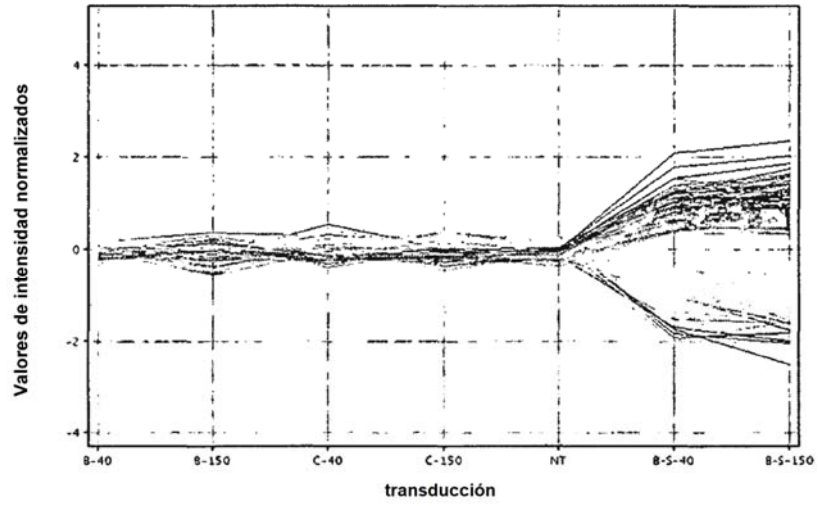


Figura 18

Proceso	A	B	C	D
Título (TU/ml)	1×10^6	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$
Recuperación en el proceso (%)	100%	45-55%	55-70%	10-20%
Factor de concentración	N/A	90-110	20-40	5-20
Eliminación de proteínas (%)	N/A	55-65%	hasta 98%	hasta 99,9%
Eliminación de ADN (%)	N/A	60-75%	70-90%	hasta 98,8%
Relación PP/TU	200-900	hasta 600	200-600	100-400
Aplicaciones	Líneas celulares inmortalizadas	Líneas celulares inmortalizadas	Células primarias y madre	Inyección <i>in vivo</i>

Tabla 1

	Lote Vectalys	A	B	C	D
	Volumen (ml)	5200	1,3	171	40
Unidad de transducción	Título (TU/ml)	2,46E+06	2,33E+08	4,86E+07	1,74E+07
	TU total	1,3E+10	3,0E+08	8,3E+09	6,9E+08
	Recuperación (%)	100%	47%	69%	6%
	Rendimiento de la etapa (%)	100%	47%	69%	24%
Partículas físicas	Título de p24 (PP/ml)	7,75E+08	1,20E+11	1,46E+10	4,77E+09
	PP total	4,03E+12	1,56E+11	2,50E+12	1,91E+11
	Recuperación (%)	100%	77%	65%	5%
ADN residual	[ADN] (ng/ml)	589,6	33845,33	3010,44	909,03
	ADN total (µg)	3066	44	515	36
	Recuperación (%)	100%	29%	18%	1,25%
	Rendimiento de la eliminación (%)	100%	71%	82%	68%
Proteína total	[Proteína] (mg/ml)	0,14	12,4	0,061	0,01
	Proteína total (mg)	728	16,1	10,4	0,4
	Recuperación (%)	100%	44%	2,1%	0,08%
	Rendimiento de la eliminación (%)	100%	56%	98%	97%
Actividad específica	TU/µg de ADN	4,17E+06	6,88E+06	1,61E+07	1,91E+07
	TU/mg de proteína	1,76E+07	1,88E+07	7,96E+08	3,47E+09
		5,70E+00	5,33E+00	1,26E-01	2,88E-02
	PP/TU	315	515	301	275
Nivel de purificación	TU/ADN	1	1,7	3,9	4,6
	TU/proteína	1	1,1	32,4	141
	PP/TU	1	1,6	1	0,9

Tabla 2

Unidad de transducción	Sin inducción con butirato de sodio		Con inducción con butirato de sodio		Sin inducción con butirato de sodio		Sin inducción con butirato de sodio								
	40	48	64	72	96	64	88	64	88						
Tiempos de recolección después de la transfección (H)	40	48	64	72	96	64	88	64	88						
Tiempos de recolección después de eliminación del medio (H)	16	24	40	48	64	40	64	40	64						
Tiempo de producción/recolección (H)	16	8	16	8	16	40	24	40	24						
Condiciones	Sin inducción con butirato de sodio		Con inducción con butirato de sodio		Sin inducción con butirato de sodio		Sin inducción con butirato de sodio								
Recolección	R1-32h	R2-48h	R3-56h	R4-72h	R5-96h	R1-64h	R2-88h	R1-64h	R2-88h						
Volumen (ml)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5						
Título (TU/ml)	1,40E+07	8,80E+06	8,80E+06	3,30E+06	3,60E+06	2,30E+07	3,50E+06	4,50E+06	2,30E+06						
TU/Producción	2,62E+08		2,71E+08		1,10E+08		1,10E+08		1,37E+08						
ADN total	[ADN] (µg/ml)	0,48	0,57	1,36	1,12	1,74	3,819	3,364	3,878	2,155	2,127	2,44	3,36	9,03	5,39
LDH	ADN promedio	1,05		1,05		3,07		3,07		2,90		2,90		7,21	
	% de citotoxicidad	7,8%	5,7%	25,4%	16,4%	N/A	40,7%	18,3%	41,8%	22,2%	NA	81,9%	48,4%	97,4%	52,4%
Actividad específica	TU/µg de ADN	3,28E+07	1,53E+07	6,45E+06	2,94E+06	5,53E+05	6,02E+06	1,04E+06	1,16E+06	1,07E+06	1,32E+06	4,51E+06	1,07E+06	1,66E+06	1,72E+05
	PP/TU	119	40	100	63	48	118	77	102	43	40,3571429	262	141	90	5,1817

Tabla 3