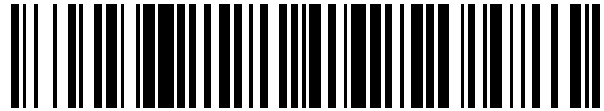


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 154**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2014 PCT/FR2014/052279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2014 E 14796166 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3047025**

54 Título: **Procedimiento de producción de virus envueltos**

30 Prioridad:

16.09.2013 FR 1358909

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

20.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FENARD, DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 154 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de virus envueltos

5 La invención se refiere a un procedimiento de producción de virus envueltos producidos por cultivo celular en medio moderadamente ácido. Los procedimientos de la invención son útiles para la producción de estas partículas para aplicaciones en investigación biomédica o biotecnológica con el fin de facilitar los rendimientos de producción, principalmente cuando se realizan a gran escala y en condiciones que respetan las buenas prácticas de fabricación (BPF).

Antecedentes tecnológicos

10 Los vectores virales envueltos, y principalmente los vectores lentivirales, tales como los derivados del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), son herramientas prometedoras en el marco de los métodos de terapia génica. Sin embargo, la producción en masa de calidad clínica de tales vectores sigue siendo un reto en la actualidad. Se han propuesto varios métodos para mejorar su producción: optimización de la transfección de los plásmidos necesarios para la producción del vector en las células hospedantes (por ejemplo, optimización del agente de transfección, de la densidad celular, de la relación de plásmidos, etc.) o de las condiciones de cultivo celular centradas en vías metabólicas celulares particulares (por ejemplo, adición de lípidos, colesterol, cloroquina, butirato de sodio, etc.) (Ansorge et al., 2010; Schweizer and Merten 2010).

McTaggard et al., *Biotechnology Progress*, Vol. 16, no. 5, Septiembre 2000, p. 859-865 describen un estudio de los efectos de los parámetros de cultivo sobre la producción de vectores retrovirales por células de empaquetamiento humanas.

20 Un documento titulado "Protocol: Lenti-Viral transfection/Transduction" (extraído de Internet del sitio http://research.jax.org/faculty/mills/protocols/lentiviral_transfection.pdf) describe un protocolo para la producción de lentivirus.

25 Morizono et al., *Virology*, vol. 355, no. 1, 10 noviembre 2006, describen el aumento de la infección de vectores lentivirales pseudotipados por medio de una envoltura de identificación Sindbis durante el tratamiento transitorio a pH bajo.

30 Los inventores tuvieron la idea de ampliar este campo y optimizar los parámetros fisicoquímicos, y están más particularmente interesados en las condiciones de pH. La neutralidad del pH del medio se considera un parámetro crítico para el cultivo de células de mamíferos. Además, un estudio ha señalado que lentivirus pseudotipados con las glicoproteínas de envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) son inestables a pH 6 en tampón de fosfato (Higashikawa and Chang 2001). En vista de estos elementos, un experto en la técnica habría considerado que la disminución del pH en los medios de cultivo tendría un impacto negativo sobre la producción de virus envueltos.

Sumario de la invención

35 La presente invención resulta de la observación de la mejora de la producción de virus envueltos cuando las células productoras de dichos virus se cultivan en un medio moderadamente ácido. De modo totalmente sorprendente, dichas condiciones moderadamente ácidas permitieron la producción de lentivirus que presentaban títulos infecciosos dos a tres veces superiores a los obtenidos en un medio neutro utilizado convencionalmente.

40 La invención tiene por tanto por objeto la utilización de condiciones moderadamente ácidas para la producción de un lentivirus. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para producir un vector lentiviral envuelto, caracterizado por que el medio de cultivo utilizado para el cultivo de las células hospedantes productoras de dicho vector es un medio moderadamente ácido de un pH comprendido entre 5,8 y 6,2, siendo el pH más particularmente 6.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere por tanto a un procedimiento para la producción de un lentivirus caracterizado por que dichos vectores se producen en condición moderadamente ácida.

45 La expresión "condición moderadamente ácida" se refiere al pH de una solución acuosa comprendido entre 5,8 y 6,2. El pH será principalmente igual a 5,8, 5,9, 6, 6,1 o 6,2. Según un modo particular de realización, el pH es aproximadamente 6. El pH elegido dependerá igualmente del poder tampón del medio utilizado, lo que el experto en la técnica podrá determinar fácilmente dado sus conocimientos generales.

50 El experto en la técnica puede modificar el pH de una solución, principalmente el pH de un medio de cultivo celular. En particular, puede introducir en dicha solución una solución de un ácido, principalmente un ácido fuerte tal como ácido clorhídrico. Si es necesario, se puede usar una solución de una base, principalmente una base fuerte tal como hidróxido de sodio, para reajustar el pH al alza para alcanzar el valor deseado.

Aparte de las condiciones moderadamente ácidas que son el objeto de la presente invención, el procedimiento de producción de lentivirus utiliza procedimientos y materiales bien conocidos en el ámbito. Los expertos en la técnica pueden hacer referencia a sus conocimientos generales en la producción de virus envueltos, en particular representados por (Ansorge et al., 2010; Schweizer and Merten 2010; Rodrigues et al., 2011).

5 En el marco de la presente solicitud, el término "virus" designa tanto un virus natural, tal como se encuentra en la naturaleza, como un virus modificado, cuyo genoma comprende modificaciones respecto al del virus parental del cual procede. Se puede tratar de un virus atenuado, que ha perdido todo o parte de su poder patógeno con relación al virus natural del que se deriva. Su genoma se modifica *in vivo* durante pases sucesivos por cultivos celulares o por un organismo vivo. El término "virus" puede referirse igualmente a un virus recombinante, cuyo genoma está modificado *in vitro* por técnicas de ingeniería genética. La modificación puede, por ejemplo, permitir inactivar al menos un gen esencial para la replicación viral (haciendo que el virus sea defectuoso para la replicación) y/o insertar un fragmento de ADN que codifica una proteína o un ARN heterólogo (principalmente no codificado por el virus natural). En este último caso, se hace referencia a un "vector viral". La inserción tiene lugar en una región apropiada del genoma viral, de manera que permita la expresión del fragmento de ADN heterólogo en una célula diana. El término "virus" se refiere igualmente a las partículas pseudo-virales, es decir, partículas virales bien sea sin glicoproteína de envoltura en su superficie, o bien sin genoma, y obtenidas por el ensamblaje espontáneo de proteínas estructurales y/o enzimáticas del virus.

Según un modo particular de realización, el virus envuelto es un vector viral. El vector viral procede principalmente de un retrovirus, en particular un lentivirus. Los vectores retrovirales producidos según la presente divulgación proceden principalmente de alfa-retrovirus (tal como VLA o ALV en inglés por *Avian Leukosis Virus*), de beta-retrovirus (tal como VTMM o MMTV en inglés por *Mouse Mammary Tumor Virus*), de gamma-retrovirus (tal como los diferentes tipos de VLM o MLV en inglés por *Murine Leukemia Virus*), de delta-retrovirus (tal como los diferentes tipos de VLTH o HTLV en inglés por *Human T-Lymphotropic Virus*), de épsilon-retrovirus (tal como VSDW o WDSV en inglés por *Walleye Dermal Sarcoma Virus*), de espumavirus (tal como VFH o HFV en inglés por *Human Foamy Virus* y VFS o SFV en inglés por *Simian Foamy Virus*), de lentivirus de primate, tales como los diferentes tipos de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH o HIV en inglés por *Human Immunodeficiency Virus*), los diferentes tipos de virus de inmunodeficiencia de simios (VIS o SIV en inglés por *Simian Immunodeficiency Virus*) o de lentivirus de mamíferos no primates, tales como el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE o EIAV en inglés por *Equine Infectious Anemia Virus*), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF o FIV en inglés por *Feline Immunodeficiency Virus*), el virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC o CAEV en inglés por *Caprine Arthritis-Encephalitis Virus*) o el virus ovino de Maedi-Visna (VVM o VMV en inglés por *Visna Maedi Virus*).

Según un modo particular de realización, el vector retroviral, en particular lentiviral, está pseudotipado, es decir que comprende una glicoproteína de envoltura derivada de un virus diferente del virus del que procede la partícula retroviral, una glicoproteína de envoltura modificada o una glicoproteína de envoltura quimérica. Según un modo particular de realización, el vector retroviral está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura derivada del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) o del virus de la leucemia del gibón (GALV en inglés por *Gibbon Ape Leukemia Virus*), aunque un experto en la técnica puede considerar la utilización de otras glicoproteínas de envoltura viral (Frecha et al., 2008). Según un modo particular de realización, el vector retroviral, más particularmente lentiviral, está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura modificada, tal como GALVTR (glicoproteína de envoltura de GALV cuyo extremo C intravirión ha sido reemplazado por el extremo C de la glicoproteína de envoltura del virus de leucemia humana anatótrofo A-MLV, permitiendo así una incorporación de la glicoproteína de la envoltura muy eficaz en la partícula lentiviral) (Christodouloupoulos and Cannon 2001). Según un modo particular de realización, el vector retroviral, más particularmente lentiviral, está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura quimérica tal como la glicoproteína de la envoltura del virus del sarampión en la que ha sido insertada una proteína de fusión que codifica la región variable de las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina (scFv en inglés para *Single Chain Variable Fragment*) o una proteína con dominios de anquirina repetidos (DARPs en inglés para *Ankyrin Repeat Proteins*) para permitir la identificación específica de un receptor dado en la superficie de las células diana (Anliker et al., 2010, Munch et al., 2011).

Según un modo particular de realización, la glicoproteína de la envoltura viral utilizada para pseudotipar el vector retroviral, más particularmente lentiviral, se deriva de una glicoproteína de la envoltura de un virus que pertenece a la familia de los rhabdoviridae, principalmente el género vesiculovirus (por ejemplo, VSV-G) o al género Lyssavirus (por ejemplo, virus de la rabia, virus Mokola); a la familia de los Arenaviridae (por ejemplo, el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)); a la familia de los togaviridae, más particularmente al género alphavirus (por ejemplo, virus de Ross River (RRV), virus Sindbis, virus del bosque de Semliki (SFV), virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina occidental); a la familia de los filoviridae, más particularmente al género filovirus (por ejemplo, virus del Ébola, virus de Lassa); a la familia de los retroviridae, más particularmente al género alfa-retrovirus (por ejemplo, virus de la leucosis aviar (ALV), virus del sarcoma de Rous (RSV)), al género beta-retrovirus (por ejemplo, retrovirus de la oveja Jaagsiekte), al género gamma-retrovirus (por ejemplo, diferentes virus de la leucemia de muridos (MLV), virus endógeno del babuino natural (BAEV) o modificado (BAEVTR), virus de leucemia del gibón natural (GALV) o modificado (GALVTR)), al género delta-retrovirus (por ejemplo, virus linfotrófico T humano (HTLV-1)), al género espumavirus (por ejemplo, virus espumoso humano), al género lentivirus (por ejemplo, virus de maedi-visna (MMV)), a la familia coronaviridae, más particularmente al género coronavirus (por ejemplo, SaRS-CoV); a la familia paramyxoviridae, más particularmente al género respirovirus (por ejemplo, virus de

Sendai, virus de parainfluenza humana de tipo 3), al género henipavirus (por ejemplo, virus Nipah), al género morbillivirus (por ejemplo, virus del sarampión), a la familia flaviridae, más particularmente al género hepacivirus (por ejemplo, virus de la hepatitis C (HVC)); a la familia orthomyxoviridae, más particularmente al género virus de la gripe A (por ejemplo, virus de la gripe); a la familia baculoviridae, más particularmente al género nucleopoliedrovirus (por ejemplo, virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica*). La glicoproteína de envoltura utilizada para la pseudotipación es más particularmente una glicoproteína de envoltura modificada, por ejemplo, una proteína de envoltura fusionada a un fragmento de anticuerpo de cadena única variable ScFV, tal como una glicoproteína de envoltura del sarampión-ScFV, Tupaia-ScFV, Sindbis-ScFV; una proteína de la envoltura fusionada con dominios de anquirina repetidos, como la proteína de la envoltura del sarampión/DARPin (Measles/DARPin); o incluso una proteína de la envoltura VSV-G + nanocuerpo que presenta un enlace defectuoso (*binding-defective*)

Según un modo particular de realización, el retrovirus, más particularmente el lentivirus producido está pseudotipado con una glicoproteína VSV-G, sarampión, GALV o BAEV (si el virus es un retrovirus), GALVTR o BAEVTR (si el virus es un lentivirus) o gp64 de baculovirus.

El virus envuelto puede contener además un transgén de interés introducido en su genoma. Por supuesto, el transgén de interés dependerá del uso específico para el cual está destinado el vector viral envuelto. Ilustrativamente, citemos un transgén de interés que codifica un ARN terapéutico (por ejemplo, un transgén de interés que codifica un ARN antisentido complementario de una secuencia diana de ARN o ADN), un transgén de terapia génica que codifica una proteína defectuosa o ausente en un sujeto afectado de una patología, o un transgén utilizado para una vacunación con ADN, es decir, un transgén que codifica una proteína cuya expresión inducirá la vacunación del organismo receptor contra dicha proteína. El procedimiento según la invención, por tanto, permite producir un vector viral envuelto utilizable en terapia génica. El procedimiento según la invención es ventajosamente compatible con buenas prácticas de laboratorio y permite prever una producción a gran escala de vectores virales envueltos, principalmente vectores lentivirales, en particular vectores lentivirales pseudotipados (en particular con proteínas de envolturas) VSV-G o GALVTR).

Según un modo preferido de realización para la producción de un vector lentiviral, los siguientes cuatro elementos se introducen en la célula hospedante: un casete de expresión que comprende un gen *gagpol* lentiviral, un casete de expresión que comprende un gen *rev* lentiviral, un casete de expresión de un transgén de interés, comprendido entre un LTR-5' y un LTR-3' lentiviral, y un casete de expresión de glicoproteína(s) de envoltura.

En un modo particular de realización, el virus envuelto, principalmente un vector retroviral, más particularmente un vector lentiviral, se produce a partir de un linaje estable que expresa uno o varios elementos necesarios para la producción de un virus envuelto (Miller 2001; Rodrigues et al., 2011), como por ejemplo el linaje productor humano GPRG-EF1 α -hX₂-OPT que produce constitutivamente un vector lentiviral derivado de VIH-1 pseudotipado con la glicoproteína de envoltura VSV-G (Greene et al., 2012), o por ejemplo el linaje de producción de múridos PG13-MFG-GFP que produce constitutivamente el vector gamma-retroviral MLV pseudotipado con la glicoproteína de envoltura GALV (Merten 2004). En un modo particular de realización, el virus envuelto se produce a partir de una célula hospedante de mamífero transfectada de manera transitoria con uno o varios plásmidos que codifican los elementos necesarios para la producción del virus. Según una alternativa que permite la producción de un vector lentiviral, dichos elementos se introducen en la célula por medio de 4 plásmidos: un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *gagpol* lentiviral, un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *rev* lentiviral, un plásmido de transferencia que comprende un casete de expresión de un transgén de interés, comprendido entre un LTR-5' y un LTR-3' lentiviral, y un casete de expresión de glicoproteína(s) de envoltura.

El experto en la técnica entenderá a partir de la presente divulgación que el cultivo en un medio moderadamente ácido se lleva a cabo según la invención tan pronto como el virus se pone en producción. Es decir, la célula productora se cultiva en un medio cuyo pH es moderadamente ácido antes del contacto con las células productoras. Según un modo particular de realización, la célula se cultiva en un medio moderadamente ácido 5 a 24 horas después de la transfección, más particularmente de 10 a 20 horas después de la transfección, e incluso más particularmente de 16 a 20 horas después de la transfección.

La célula hospedante se puede seleccionar de cualquier célula que permita la producción de un virus envuelto. Según un modo particular de realización, dicha célula se elige de una célula humana (HEK293, HEK293T, HEK293FT, Te671, HT1080, CEM), una célula de múrido (NIH-3T3), una célula de mustélido (Mpf), una célula de cánido (D17) (Miller 2001, Miller and Chen 1996; Merten 2004; Rodrigues et al., 2011; Stacey and Merten 2011).

Las células se cultivan en un medio adecuado para cultivar células de mamíferos y producir un virus envuelto. El medio también puede ser complementado con aditivos bien conocidos en la técnica, como antibióticos, suero (incluido el suero fetal de bovino, etc.) añadidos en concentraciones apropiadas. El medio utilizado puede comprender principalmente suero o carecer de él. Los medios de cultivo de células de mamíferos son bien conocidos en la técnica. Se pueden mencionar DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), RPMI1640 o una mezcla de diferentes medios de cultivo, incluyendo, por ejemplo, DMEM/F12, o un medio sin suero como optiMEM®, optiPRO®, optiPRO-SFM®, CD293®, Freestyle F17® (Life Technologies) o Ex-Cell® 293 (Sigma-Aldrich).

5 En los procedimientos que emplean células transfectadas transitoriamente, se puede usar cualquier agente para la transfección de plásmidos. Se puede usar especialmente fosfato de calcio o polietilimina, aunque otros agentes pueden ser considerados por el experto en la técnica (Ansorge et al., 2010). Las condiciones (principalmente la cantidad de plásmido(s), la relación entre los plásmidos, la relación entre el(los) plásmido(s) y el agente de transfección, el tipo de medio, etc.) y el tiempo de transfección pueden ser adaptados por los expertos en la técnica en función de las características del virus producido y/o del transgén introducido en el plásmido de transferencia.

El virus envuelto se recoge a continuación del líquido sobrenadante según métodos bien conocidos en el ámbito.

Según un modo particular de realización, el procedimiento según la invención comprende las siguientes etapas:

- 10 - la transfección transitoria de células HEK293T por medio de uno o varios plásmidos que codifican los elementos necesarios para la producción de dicho vector envuelto;
- el cultivo de dichas células en un medio adecuado que tiene un pH de aproximadamente 6; y
- la recogida del virus envuelto en el líquido sobrenadante del cultivo.

15 Según una variante de este modo de realización, el virus envuelto producido es un lentivirus producido después de la transfección de las células por medio de cuatro plásmidos: un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *gagpol* lentiviral, un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *rev* lentiviral, un plásmido de transferencia que comprende un casete de expresión de un transgén de interés, comprendido entre un LTR-5' y un LTR-3' lentiviral, y un plásmido que lleva un casete de expresión de glicoproteína(s) de envoltura. Según una variante, la proteína de la envoltura se deriva del virus VSV (en particular, la envoltura VSV-G) o el virus GALV (en particular la glicoproteína modificada GALVTR para los vectores lentivirales).

20

Los virus o vectores virales producidos pueden ser purificados a continuación según procedimientos muy conocidos por los expertos en la técnica (Segura et al. 2011).

25 También se describe un medio de cultivo de células de mamífero, siendo dicho medio moderadamente ácido. En particular, el medio de cultivo está a un pH comprendido entre 5,5 y 6,6, más particularmente entre 5,8 y 6,2. Más particularmente, el pH del medio de cultivo es aproximadamente 6. Según otro modo particular de realización, el medio de cultivo es DMEM moderadamente ácido, en particular de pH como se definió anteriormente. En particular, el medio de cultivo es un medio DMEM que tiene un pH comprendido entre 5,8 y 6,2, en particular un medio DMEM de pH 6. Se entiende que el medio de cultivo se caracteriza por un pH moderadamente ácido antes de cultivar las células.

30 La invención se refiere además a un estuche (o *kit*) para llevar a cabo el procedimiento para producir virus envueltos tales como se definió anteriormente, que comprende un medio de cultivo moderadamente ácido, o un medio de cultivo acompañado de una o varias soluciones útiles para llevar el pH de dicho medio a un valor moderadamente ácido, comprendiendo el estuche además:

- (a) uno o más plásmidos adecuados para la producción del lentivirus eventualmente pseudotipado; y
- 35 (b) células adecuadas para la producción de dicho virus.

El estuche de la invención está destinado a la producción de un lentivirus según la invención. Por tanto, puede comprender además instrucciones para usar los diferentes constituyentes del kit que permiten producir un lentivirus según la invención. En particular, estas instrucciones pueden indicar la manera por la cual las células destinadas a la producción se deben transfectar con los plásmidos apropiados y ser cultivadas en el medio de cultivo. En particular,

40 las instrucciones indican que las células productoras de lentivirus se deben cultivar en un medio de cultivo de pH moderadamente ácido como se ha detallado anteriormente.

La presente solicitud también se refiere a un estuche para realizar el procedimiento para la producción de virus envueltos, tal como se ha definido anteriormente, que comprende: (i) medios para realizar dicho procedimiento y (ii) instrucciones a seguir para la realización del procedimiento. Según un modo particular de realización, los medios

45 incluidos en el estuche se eligen entre uno o varios de los siguientes medios:

- (a) uno o más plásmidos adecuados para la producción del virus envuelto;
- (b) células adecuadas para la producción de dicho virus; y
- (c) un medio de cultivo moderadamente ácido, o un medio de cultivo acompañado de una o varias soluciones útiles para llevar el pH de dicho medio a un valor moderadamente ácido. Un estuche según la invención puede incluir
- 50 así principalmente los medios (a) y (b), (a) y (c), (b) y (c) o (a) y (b) y (c).

La presente solicitud también se refiere a un estuche para realizar el procedimiento según la producción de virus envueltos, tal como se ha detallado anteriormente, que comprende un medio de cultivo acompañado de una o varias soluciones útiles para llevar el pH de dicho medio a un valor moderadamente ácido.

Leyendas de las figuras

5 **Figura 1.** Producción de un vector lentiviral (LV) pseudotipado con la envoltura GALVTR (GALVTR-LV) en diversas condiciones de pH. **(a)** Los medios de cultivo (DMEM/SVF) fueron tamponados al pH indicado con ayuda de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio. El indicador de pH contenido en el medio (rojo de fenol) presenta un color que va del amarillo (pH 6) al violeta (pH 8). **(b)** Las partículas de GALVTR-LV fueron producidas a partir de células HEK293T cultivadas en medio DMEM/SVF al valor de pH indicado. Los títulos infecciosos (TU/mL) se determinaron después de la transducción de células HCT116 y la cuantificación del nivel de expresión del transgén GFP por citometría de flujo. El contenido de los líquidos sobrenadantes en partículas físicas GALVTR-LV se cuantificó por la medición cuantitativa de la cápsida p24 del VIH-1 por medio de un kit ELISA comercial. La actividad específica correspondiente a la relación entre los títulos infecciosos y la cantidad de partículas físicas (TU/ng de p24) se representa debajo de los histogramas. Los resultados representan la media de dos experimentos independientes \pm la desviación estándar. Se produjeron siete lotes de vector GALVTR-LV en medio de pH 7,2 o pH 6 y se titularon por su contenido en partículas infecciosas **(c)** o en partículas físicas **(d)**. **(e)** Se representa la actividad específica de cada líquido sobrenadante GALVTR-LV. Las barras indican el valor medio de las distribuciones.

10 **Figura 2.** Producción de un vector lentiviral VSV-G-LV en condiciones de pH neutro o ligeramente ácido. **(a)** Se produjeron seis lotes de vector VSV-G-LV a partir de células HEK293T cultivadas en medio DMEM/SVF al pH indicado. Los títulos infecciosos se determinaron como en la fig. 1b. **(b)** La cantidad de partículas físicas se determinó por medición cuantitativa de la cápsida p24 del VIH-1 por medio de un kit ELISA comercial. **(c)** Se representa la actividad específica de cada líquido sobrenadante VSV-G-LV. Las barras indican el valor medio de las distribuciones.

15 **Figura 3.** Producción de un vector gamma-retroviral GALV-MLV en condiciones de pH neutro o ligeramente ácido. Se produjeron seis lotes de vector GALV-MLV a partir de células HEK293T cultivadas en medio DMEM/SVF al pH indicado. Los títulos infecciosos se determinaron como en la fig. 1b. Las barras indican el valor medio de las distribuciones.

20 **Figura 4.** Estudio de la estabilidad de las partículas lentivirales GALVTR-LV después de varios ciclos de congelación/descongelación. **(a)** Representación esquemática del protocolo de congelación/descongelación de los vectores. **(b)** Varios lotes de vector GALVTR-LV, producidos a pH 7,2 (negro) o pH 6 (gris), fueron expuestos a uno o dos ciclos de congelación/descongelación. Los títulos infecciosos se determinaron como en la fig. 1b. Los datos representan los diferentes títulos infecciosos obtenidos (figura de la izquierda) o han sido normalizados al 100% con respecto a la condición correspondiente a un ciclo de congelación/descongelación (figura de la derecha). Temperatura ambiente (T.A.), congelación (Congel.), descongelación (Descongel.).

25 **Figura 5.** Estudio de la estabilidad de las partículas lentivirales GALVTR-LV después de la exposición a una temperatura de 37°C. Los criotubos que contenían un mililitro de partículas GALVTR-LV, producidas a pH 7,2 o pH 6, se incubaron a 37°C durante 0 a 4 días. Luego, los títulos infecciosos se determinaron como en la fig. 1b. **(a)** Los datos se representan como los títulos infecciosos obtenidos a partir de tres experimentos independientes o **(b)** la media de los títulos infecciosos \pm la desviación estándar y normalizada al 100% respecto a la condición de control (condición correspondiente a un vector GALVTR-LV no expuesto a 37°C).

30 **Figura 6.** Estudio de los niveles de expresión de p55gag intracelular en las células HEK293T productoras cultivadas en un medio a pH neutro o ligeramente ácido. **(a)** Transferencia de Western de la expresión de p55gag en lisados de células HEK293T que producen el vector GALVTR-LV a pH 7,2 o pH 6. El nivel de expresión de p55gag está normalizado respecto al nivel de expresión de la actina. **(b)** Los histogramas representan el nivel medio de expresión de p55gag normalizado respecto al nivel de expresión de la actina en cuatro experimentos independientes \pm desviación estándar.

Ejemplos

Material y métodos

Cultivo celular

35 Células HCT116 derivadas de un carcinoma colorrectal humano (CCL-247; ATCC, Manassas, VA), células HEK293T de riñón embrionario humano (Merten et al., 2011) y células productoras de gamma-retrovirus GALV-MLV (linaje PG13-MFG-GFP) (Fenard et al., 2013) se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM + Glutamax) suplementado con 2 a 10% de suero fetal de bovino (SFB) inactivado con calor (Life Technologies, St-Aubin, Francia). El medio DMEM/SFB se tamponó a los valores de pH indicados utilizando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio y luego se esterilizó sobre un filtro (0,22 μ).

Producción de vectores virales y titulación

5 Vectores lentivirales derivados del VIH-1 se generaron por transfección transitoria con fosfato de calcio de 4 plásmidos en células HEK293T (Fenard et al., 2013): los plásmidos de expresión de gagpol (pKLGagpol) y rev (pBArev), el plásmido de transferencia que codifica la proteína fluorescente verde GFP (pCCL-eGFP) y el plásmido que codifica la glicoproteína de envoltura GALVTR (pBA.GALV/Ampho-Kana) o VSV-G (pMDG). 16 a 20 horas después de la transfección, las células HEK293T se lavaron e incubaron en medio DMEM/SFB tamponado al valor de pH indicado, comprendido entre 6 y 8. Después de 24 horas de producción, los líquidos sobrenadantes virales se recogieron, filtraron (0,45 μ) y congelaron a -80°C. Los títulos de partículas físicas se determinaron por la medición cuantitativa de la cápsida p24 del VIH-1 por medio de un kit ELISA comercial (Perkin Elmer, Courtaboeuf, Francia). Los títulos infecciosos se determinaron en células HCT116 detectando la GFP por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia), estando expresados los títulos en unidades de transducción por mililitro (TU/mL) (Fenard et al. 2013).

Exposición de los vectores virales a una temperatura de 37°C y a múltiples ciclos de congelación/descongelación

15 Se incubaron tubos de congelación de 1 mL que contenían líquido sobrenadante GALVTR-LV (vector lentiviral pseudotipado con la glicoproteína de envoltura GALVTR) producido a pH 7,2 o 6 durante el tiempo indicado a 37°C (permaneciendo cerrados los tubos con tapón de rosca). Luego, los tubos se congelaron de nuevo a -80°C y se realizaron titulaciones en células HCT116 simultáneamente para todas las condiciones con el fin de protegerlas contra las variaciones entre experimentos.

20 Para los experimentos de estabilidad en la congelación/descongelación, el primer y segundo ciclos de congelación/descongelación se realizaron en paralelo con dos muestras diferentes procedentes de la misma producción de GALVTR-LV. Este método permitió evaluar simultáneamente todos los títulos infecciosos de GALVTR-LV para evitar cualquier variabilidad entre experimentos.

Transferencia de Western y análisis

25 Las células productoras se lavaron y lisaron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, glicerol al 10%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*complete protease inhibitor cocktail*, Roche Diagnostics, Meylan, Francia). Las concentraciones de proteínas se determinaron por medio del kit *Bio-Rad DC Protein Assay kit I* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia). Se separaron las proteínas (30 μ g/pista) en gel de electroforesis SDS al 10%-poliacrilamida (PAGE), se transfirieron a membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, Francia) y se realizó una inmunotransferencia combinando un anticuerpo anti-p24 de cabra (Abd Serotec, Oxford, Reino Unido) y un anticuerpo anti-actina de ratón (clon AC-15) (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, Francia). Se utilizaron como anticuerpos secundarios un anticuerpo de burro anti-cabra acoplado a IRDye 800 y un anticuerpo de burro anti-ratón acoplado a IRDye 680 (Eurobio, Courtaboeuf, Francia). Las bandas inmunorreactivas se detectaron con el escáner Odyssey infrarrojo y se cuantificaron con el programa informático de análisis Odyssey 3.0 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Análisis estadísticos

35 Los valores de *P* se determinaron con el ensayo no paramétrico de Wilcoxon por medio del programa informático GraphPad Prism 5.

Resultados

Producción de un vector lentiviral GALVTR-LV en un medio de cultivo moderadamente ácido

40 Los vectores lentivirales (LV) pseudotipados por medio de la glicoproteína de envoltura GALVTR (GALVTR-LV) transducen muy eficazmente células madre hematopoyéticas (Sandrin et al., 2002, Jacome et al., 2009). Sin embargo, la producción a gran escala de este tipo de vectores sigue siendo un reto importante. Se evaluó la eficacia de producción de los vectores GALVTR-LV en diversos medios de cultivo de pH 6 a 8 (figura 1a). La figura 1b muestra que los títulos infecciosos obtenidos a pH 8 están considerablemente disminuidos en comparación con el pH típico de 7,2. Por el contrario, y de manera completamente sorprendente, los títulos infecciosos de GALVTR-LV producidos en un medio a pH 6 son significativamente superiores (2,3 veces) que los obtenidos a pH 7,2 (figura 1b y 1c). Es importante tener en cuenta que se ha observado en paralelo un aumento en la cantidad de antígeno p24 en los líquidos sobrenadantes de GALVTR-LV producidos a pH 6 (figuras 1b y 1d). Esta correlación positiva conduce a una actividad específica estable entre los vectores producidos a pH neutro o moderadamente ácido (figuras 1b y 1e), mientras que esta actividad específica disminuye considerablemente a pH 8 (figura 1b). El uso de condiciones moderadamente ácidas, por lo tanto, representa la condición óptima para producir grandes cantidades de vector GALVTR-LV.

Efecto de las condiciones del pH moderadamente ácido sobre la producción de vectores lentivirales pseudotipados con la proteína VSV-G y sobre vectores gamma-retrovirales MLV pseudotipados con la proteína GALV

Los resultados alentadores obtenidos con el vector GALVTR-LV llevaron a los inventores a ensayar estas mismas condiciones para la producción de un vector lentiviral pseudotipado con una glicoproteína de envoltura, utilizada muy ampliamente en este ámbito, la proteína VSV-G (vectores VSV-G-LV). La figura 3 muestra que un medio a pH 6 permite el aumento significativo de la producción de partículas VSV-G-LV infecciosas (figura 2a) y físicas (figura 2b), en un factor de 1,5 por término medio, con una actividad específica estable (figura 2c). Los efectos nocivos de un pH igual a 6 aportados por el equipo de Higashikawa (*op. cit.*) son probablemente una consecuencia del protocolo utilizado por estos autores, que produjeron las partículas retrovirales a pH neutro, las concentraron y luego las diluyeron en una solución no iónica tamponada a pH 6, lo que implica una pérdida de infectividad del líquido sobrenadante viral del 90%. Contra todo pronóstico, las partículas VSV-G-LV, producidas directamente en un medio de cultivo a pH 6 suplementado con SFB, no solo son estables, sino que igualmente, contra todo pronóstico, se producen a un nivel más alto que cuando se producen a partir de un medio de cultivo a pH 7,2, clásicamente reconocido como óptimo para este tipo de producción.

Con el fin de garantizar que la mejora observada no depende de las células HEK293T utilizadas, ni de la producción de los únicos vectores lentivirales, se evaluó el efecto del pH moderadamente ácido sobre el linaje celular PG13-MFG-GFP, productor de GALV-MLV (gamma-retrovirus MLV pseudotipado con la glicoproteína de envoltura GALV) (Merten 2004). El linaje celular PG13 original es un linaje celular de fibroblastos de muridos (NIH-3T3) transfectado de manera estable con un sistema de empaquetamiento del virus MLV (pLGPS) y una construcción que codifica la glicoproteína de envoltura GALV (pMOV-GALV) (Miller et al., 1991). Para producir de forma constitutiva los pseudotipos GALV-MLV retrovirales, el plásmido de transferencia que codifica la proteína GFP colocado bajo el control del promotor LTR del MLV (pMFG-GFP) se introdujo de manera estable en el linaje PG13. En cultivos celulares realizados en paralelo, las células PG13-MFG-GFP se incubaron en DMEM tamponado a pH 7,2 o a pH 6 y 24 a 48 horas más tarde se evaluó el contenido de partículas infecciosas en los líquidos sobrenadantes recogidos. La figura 3 muestra que la producción de partículas GALV-MLV está aumentada significativamente a un pH moderadamente ácido. Este resultado es particularmente interesante ya que muestra que el procedimiento de producción propuesto no se limita a un linaje celular humano, tal como el linaje HEK293T, y que además de estar particularmente adaptado a la producción de vectores lentivirales, no está limitado a la producción de vectores del género lentivirus, ya que otros virus envueltos pueden ser producidos de manera más eficaz por medio del protocolo de la invención.

Estabilidad de las partículas GALVTR-LV expuestas a varios ciclos de congelación/descongelación

Los líquidos sobrenadantes de vectores lentivirales recogidos se conservan generalmente a -80°C antes de la purificación. Se podría suponer que las condiciones de pH moderadamente ácido habrían tenido por efecto perjudicial aumentar la inactivación de los viriones durante el método de congelación o descongelación. Por tanto los líquidos sobrenadantes de las partículas GALVTR-LV se sometieron a uno o dos ciclos de congelación/descongelación, determinándose los títulos infecciosos en cada etapa de descongelación (figura 4a). La figura 4b muestra que las condiciones moderadamente ácidas no afectan a la infectividad de las partículas. La disminución media en los títulos infecciosos después de dos ciclos de congelación/descongelación respecto a un solo ciclo no es más que del 5% a pH 7,2, así como a pH 6. Por tanto, la infectividad no se ve afectada cuando los vectores lentivirales se congelan bajo condiciones moderadamente ácidas.

Efecto de la exposición a largo plazo de las partículas GALVTR-LV a una temperatura de 37°C

Durante la transducción lentiviral, las células diana, que en nuestro caso son células de mamíferos, se cultivan a una temperatura de 37°C. Por tanto, los inventores han investigado si la producción de vectores lentivirales a un pH ácido suave tenía un efecto perjudicial sobre su estabilidad después de una exposición más o menos larga a una temperatura de 37°C. Para ello, los tubos de congelación que contenían líquido sobrenadante de vectores GALVTR-LV producidos a pH 7,2 o a pH 6 se incubaron durante 0 a 4 días a 37°C y se vigiló la cinética de disminución de la infectividad. Como se muestra en la figura 5a, mientras que los títulos infecciosos, después de una exposición prolongada a 37°C, están considerablemente reducidos, tanto para los vectores GALVTR-LV producidos a pH 7,2 como para los vectores producidos a pH 6, la pendiente de esta disminución era menos pronunciada para los vectores GALVTR-LV producidos a pH 6. La semivida resultante para los vectores GALVTR-LV producidos a pH 6 es el doble de la observada para los vectores GALVTR-LV producidos a pH 7 (alrededor de 2 días frente a un día, véase la figura 5b). Curiosamente, este experimento ha demostrado que los líquidos sobrenadantes en bruto de los vectores GALVTR-LV son bastante resistentes (semivida de uno a 2 días) a una temperatura de 37°C en un entorno cerrado (tubo con tapón de rosca cerrado). Esto contrasta con la estabilidad en el cultivo celular que muestra una semivida de solo 6 horas (Strang et al., 2004), lo que sugiere que otros parámetros además de la temperatura, tal como el estrés oxidante, también deberían ser considerados cuando la estabilidad de los vectores lentivirales se evalúa en cultivo celular a 37°C.

Modulación del nivel de expresión intracelular de p55gag en las células productoras HEK293T cultivadas a pH moderadamente ácido.

La cantidad de proteína p24 del VIH-1 recogida en los líquidos sobrenadantes GALVTR-LV está mejorada en condiciones moderadamente ácidas (figuras 1b y 1d). Por tanto, los inventores intentaron determinar si este aumento podría ser la consecuencia de un aumento del nivel de expresión intracelular de la proteína precursora p55gag de

VIH-1 en las células productoras. En la figura 6a, un experimento de inmunotransferencia muestra un aumento de la expresión intracelular de p55gag a pH 6 respecto a pH 7,2, con una sobreexpresión media de 160% (figura 6b). Esta correlación positiva entre la sobreexpresión de p55gag intracelular y el aumento de las cantidades de proteína p24 en los líquidos sobrenadantes lentivirales sugiere que las condiciones moderadamente ácidas crean un entorno más favorable para una expresión óptima de los componentes virales.

Referencias bibliográficas

- Anliker, B., T. Abel, S. Kneissl, J. Hlavaty, A. Caputi, J. Brynza, et al. (2010). "Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors." *Nat. Methods* 7(11):929-935.
- Ansorge, S., O. Henry and A. Kamen (2010). "Recent progress in lentiviral vector mass production." *Biochem. Eng. J.* 48(3): 362-377.
- Christodouloupoulos, I. and P. M. Cannon (2001). "Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors." *J. Virol.* 75(9): 4129-4138.
- Fenard, D., D. Ingraio, A. Seye, J. Buisset, S. Genries, S. Martin, et al. (2013). "Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells." *Mol Ther Nucleic Acids* 2: e90.
- Frecha, C., J. Szecsi, F. L. Cosset and E. Verhoeven (2008). "Strategies for targeting lentiviral vectors." *Curr. Gene Ther.* 8(6): 449-460.
- Greene, M. R., T. Lockey, P. K. Mehta, Y. S. Kim, P. W. Eldridge, J. T. Gray, et al. (2012). "Transduction of human CD34+ repopulating cells with a self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 produced at clinical scale by a stable cell line." *Hum Gene Ther Methods* 23(5): 297-308.
- Higashikawa, F. and L. Chang (2001). "Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors." *Virology* 280(1): 124-131.
- Jacome, A., S. Navarro, P. Rio, R. M. Yanez, A. Gonzalez-Murillo, M. L. Lozano, et al. (2009). "Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients." *Mol. Ther.* 17(6): 1083-1092.
- Merten, O. W. (2004). "State-of-the-art of the production of retroviral vectors." *J. Gene Med.* 6 Suppl 1: S105-124.
- Merten, O. W., S. Charrier, N. Laroudie, S. Fauchille, C. Dugue, C. Jenny, et al. (2011). "Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application." *Hum. Gene Ther.* 22(3): 343-356.
- Miller, A. D. (2001). "Production of retroviral vectors." *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Chapter 12: Unit 12 15.
- Miller, A. D., J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson and M. V. Eiden (1991). "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus." *J Virol* 65(5): 2220-2224.
- Miller AD, Chen F. (1996) Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J. Virol.* 70: 5564-5571.
- Munch, R. C., M. D. Muhlebach, T. Schaser, S. Kneissl, C. Jost, A. Pluckthun, et al. (2011). "DARPin: an efficient targeting domain for lentiviral vectors." *Mol. Ther.* 19(4): 686-693.
- Rodrigues, A. F., P. M. Alves and A. S. Coroadinha (2011). Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. *Viral Gene Therapy*. K. Xu, InTech. Chapter 2: 15-40.
- Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, et al. (2002). "Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates." *Blood* 100(3): 823-832.
- Schweizer, M. and O. W. Merten (2010). "Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors." *Curr. Gene Ther.* 10(6): 474-486.
- Segura, M. M., A. A. Kamen and A. Garnier (2011). "Overview of current scalable methods for purification of viral vectors." *Methods Mol Biol* 737: 89-116.
- Stacey GN, Merten O-W (2011) Chapter 3: Hosts cells and cell banking. In: Merten O-W, Al-Rubeai M (eds.): *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, in the series of: *Methods in Molecular Biology* 737, Humana Press, New York, NY, pp 45-88.

Strang, B. L., Y. Ikeda, F. L. Cosset, M. K. Collins and Y. Takeuchi (2004). "Characterization of HIV-1 vectors with gammaretrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells." *Gene Ther.* 11(7): 591-598.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de un lentivirus, eventualmente pseudotipado, caracterizado por que las células hospedantes productoras de dicho lentivirus se cultivan en un medio tamponado moderadamente ácido, estando el pH del medio comprendido entre 5,8 y 6,2, siendo el pH más particularmente 6.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el lentivirus está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura derivada de un virus perteneciente a una familia elegida entre rhabdoviridae, arenaviridae, togaviridae, filoviridae, retroviridae, coronaviridae, paramyxoviridae, flaviridae, orthomyxoviridae o baculoviridae.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el lentivirus está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura elegida entre la glicoproteína de envoltura derivada del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), virus de la rabia, virus Mokola, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus de Ross River (RRV), virus Sindbis, virus del bosque de Semliki (SFV), virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina occidental, virus del Ébola, virus de Lassa, virus de la leucosis aviar (ALV), virus del sarcoma de Rous (RSV), retrovirus de oveja Jaagsiekte, virus de la leucemia de múridos (MLV), virus endógeno de babuino modificado (BAEVTR), virus de la leucemia del gibón natural modificado (GALVTR), virus linfotrófico T humano (HTLV-1), virus espumoso humano, virus maedi-visna (MMV), SaRS-CoV, virus de Sendai, virus de la parainfluenza humana de tipo 3, virus Nipah, virus del sarampión, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la gripe o virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica*.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el lentivirus está pseudotipado con una proteína de envoltura elegida entre la proteína de envoltura VSV-G o la proteína de envoltura GALVTR.
- 20 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula hospedante se elige entre una célula HEK293, HEK293T, HEK293FT, Te671, CEM, NIH-3T3, Mpf o D17.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula hospedante está transfectada de forma estable o transitoria con uno o varios plásmidos que codifican los elementos necesarios para la producción del lentivirus.
- 25 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el lentivirus contiene además en su genoma un transgén de interés.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
 - 30 - la transfección transitoria de células HEK293T por medio de uno o varios plásmidos que codifican los elementos necesarios para la producción de dicho lentivirus, eventualmente pseudotipado;
 - el cultivo de dichas células en un medio adecuado cuyo pH es 6; y
 - la recogida del lentivirus, eventualmente pseudotipado, en el líquido sobrenadante del cultivo.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que las células se transfectan por medio de cuatro plásmidos: un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *gagpol* lentiviral, un plásmido que lleva un casete de expresión que comprende un gen *rev* lentiviral, un plásmido de transferencia que comprende un casete de expresión de un transgén de interés, comprendido entre un LTR-5' y un LTR-3' lentiviral, y un plásmido que lleva un casete de expresión de glicoproteína(s) de envoltura.
- 35 10. Estuche para llevar a cabo el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende (i) un medio de cultivo moderadamente ácido de pH comprendido entre 5,8 y 6,2, más particularmente de pH 6, o (ii) un medio de cultivo acompañado de una o más solución(es) útil(es) para llevar el pH de dicho medio a un valor moderadamente ácido comprendido entre 5,8 y 6,2, siendo el pH más particularmente 6, comprendiendo el estuche además:
 - 40 (a) uno o más plásmidos adecuados para la producción del lentivirus eventualmente pseudotipado; y
 - (b) células adecuadas para la producción de dicho virus, comprendiendo eventualmente dicho estuche instrucciones para la realización del procedimiento de producción de un lentivirus eventualmente pseudotipado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
 - 45

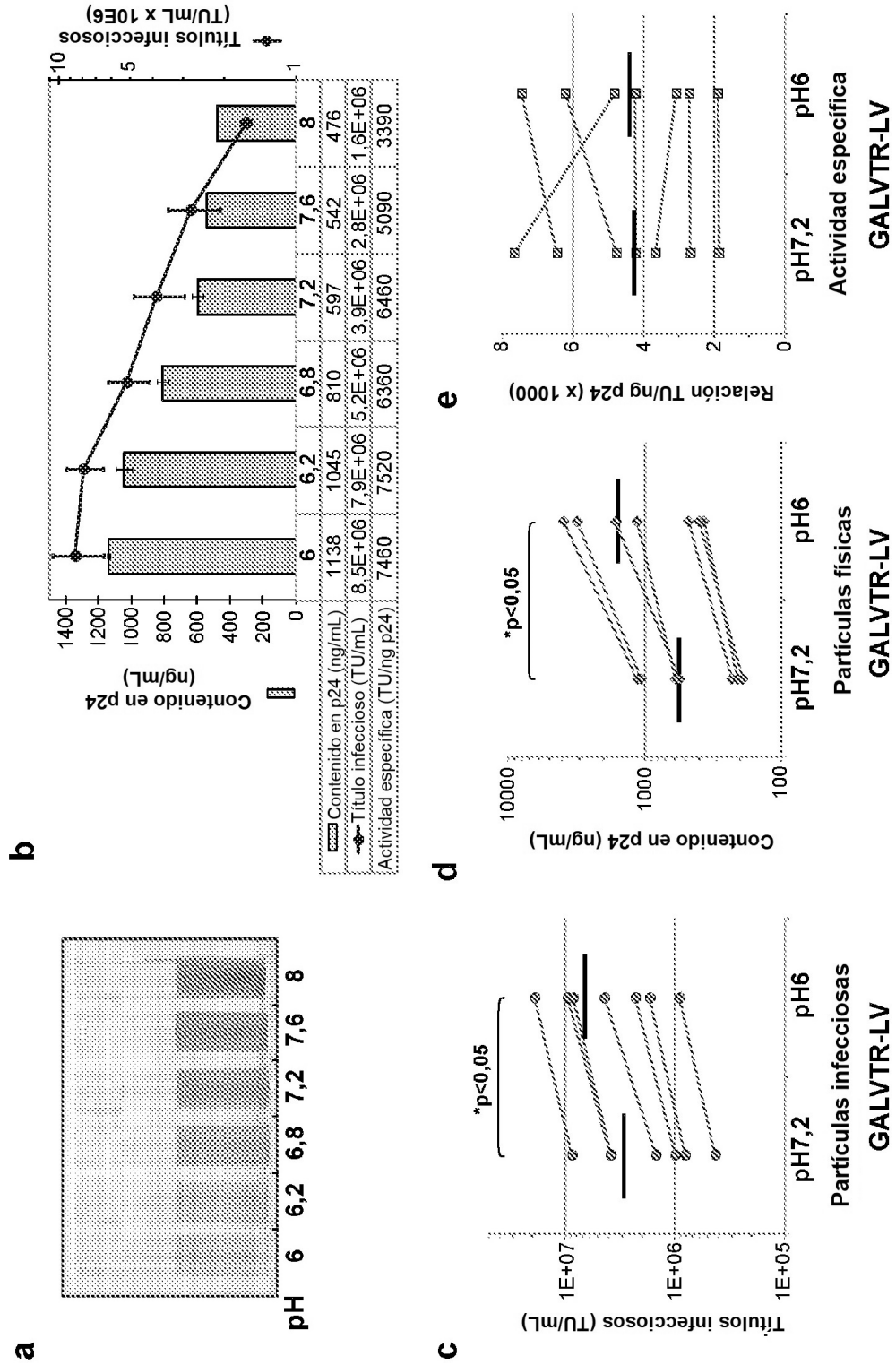


Figura 1

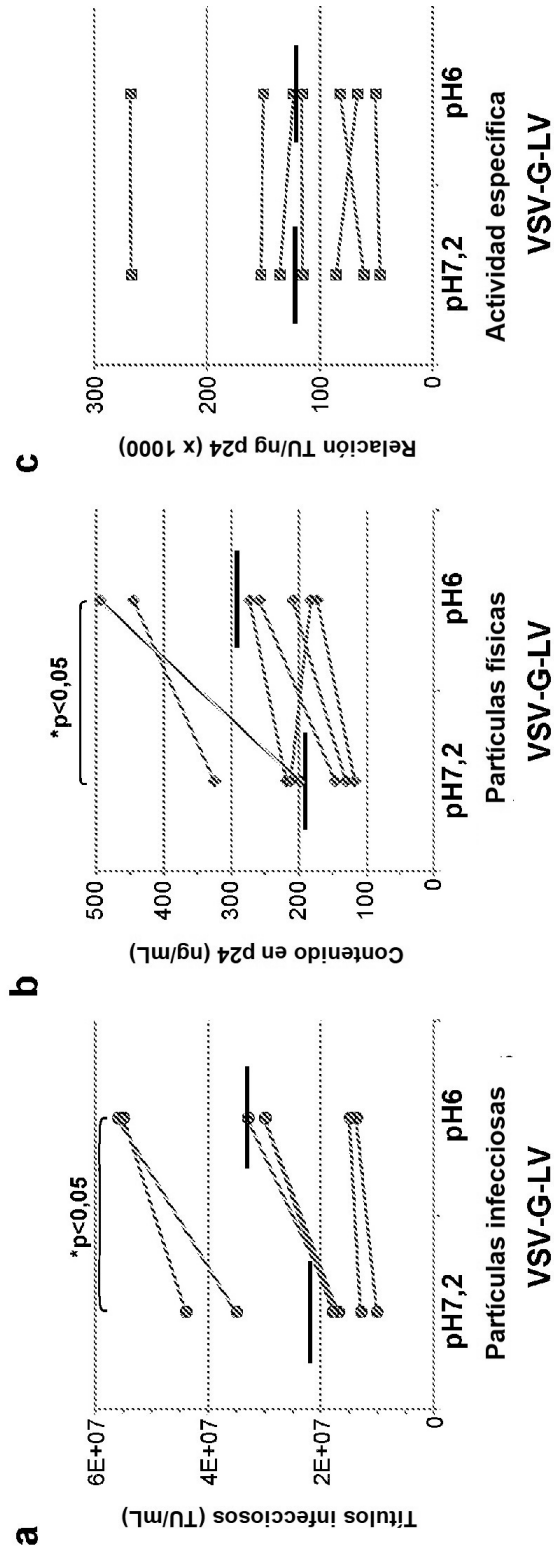


Figura 2

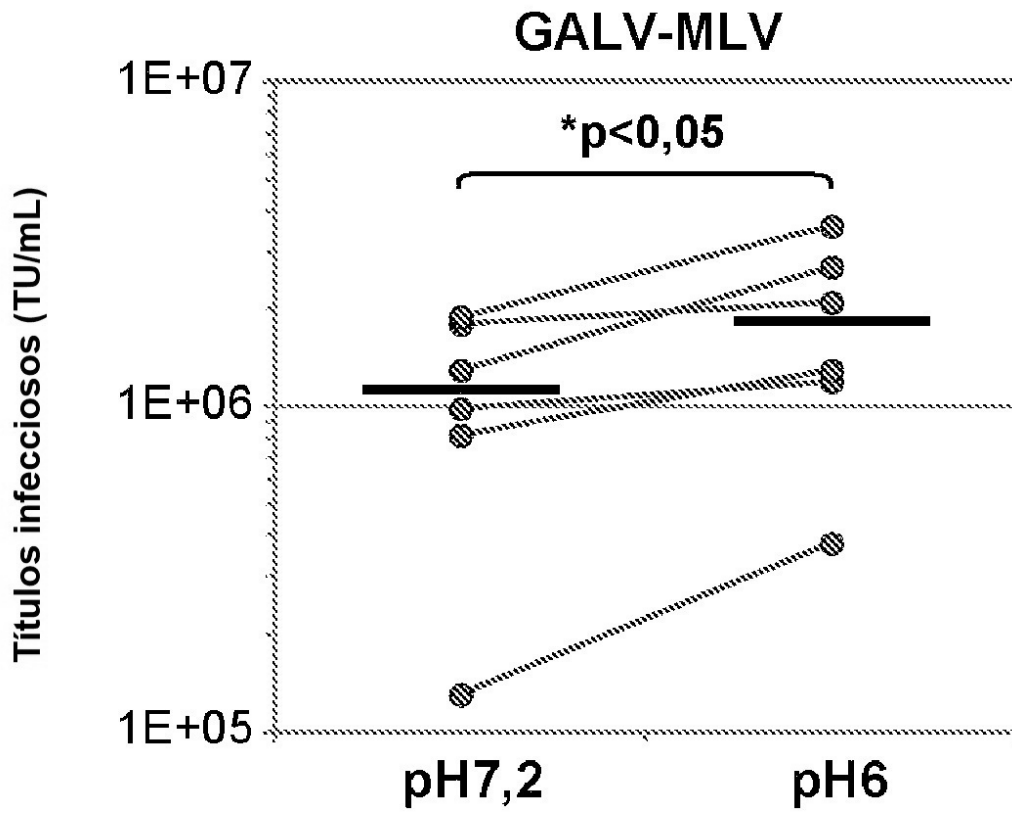


Figura 3

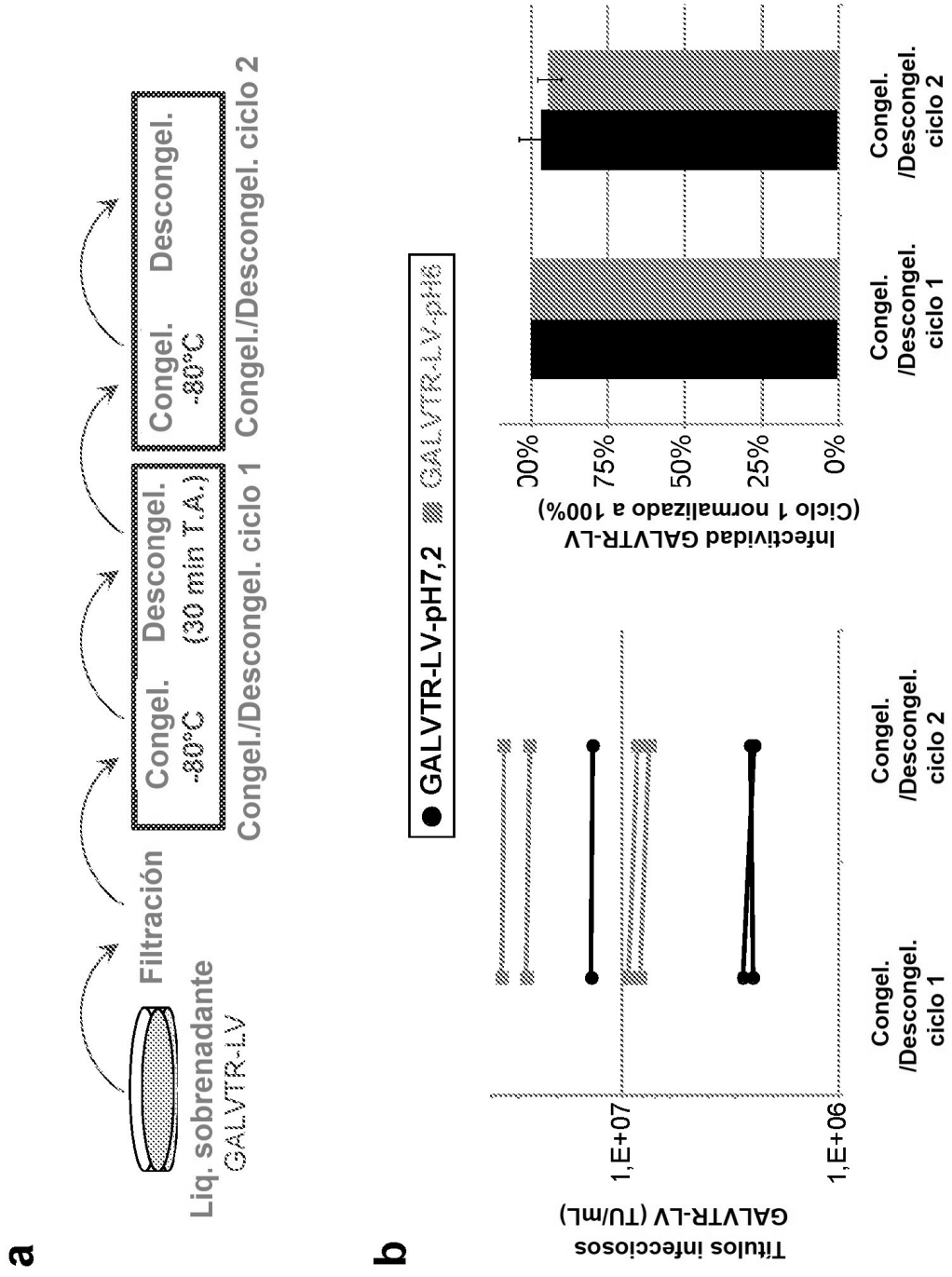


Figura 4

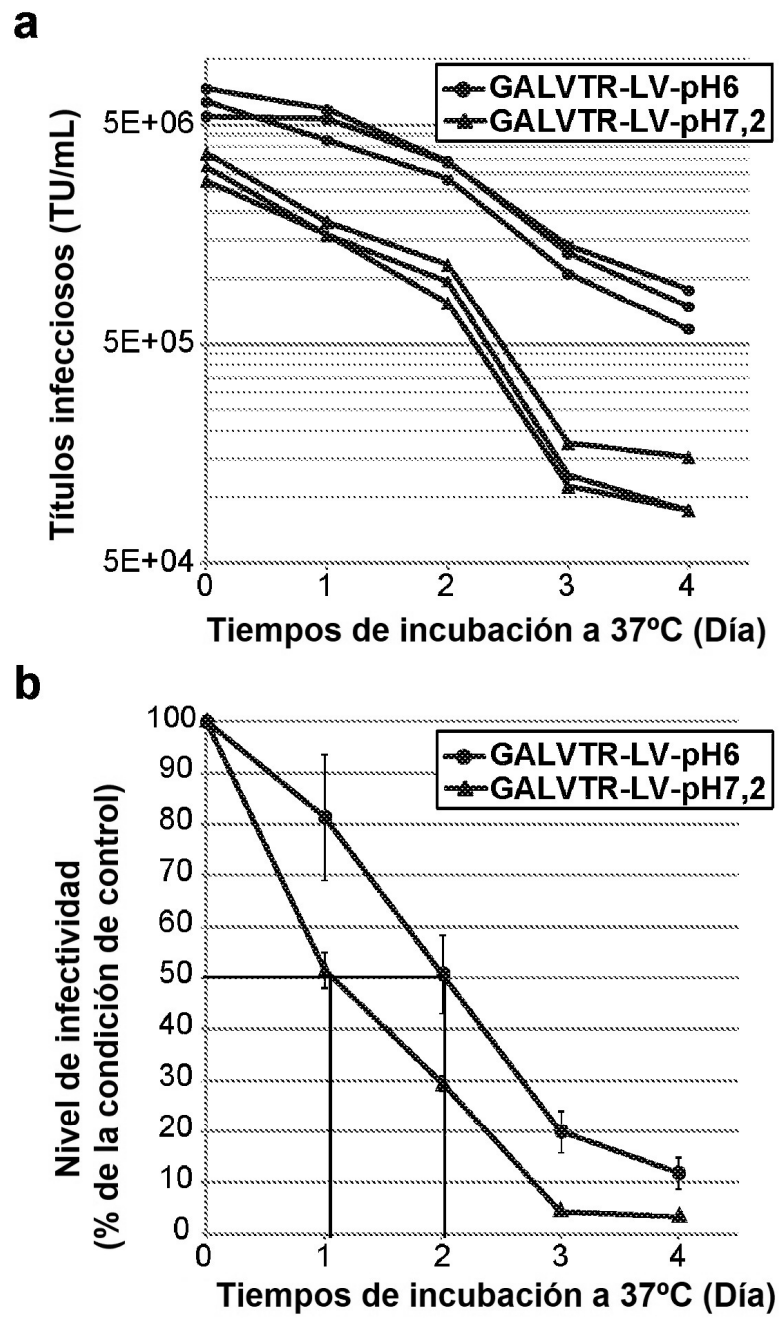
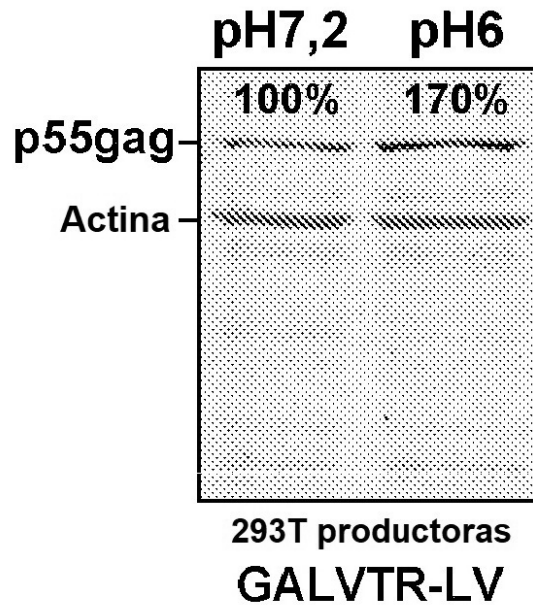


Figura 5

a



b

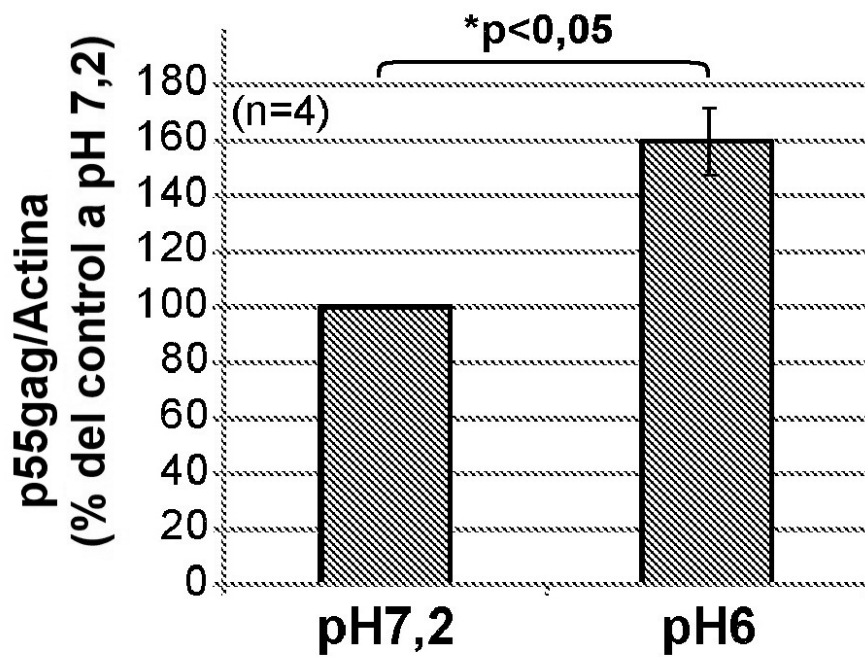


Figura 6