

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 999**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2009 PCT/US2009/000577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2009 WO09097129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009 E 09706778 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2242840**

54 Título: **Producción recombinante de virus adeno-asociados usando células BHK en suspensión**

30 Prioridad:

29.01.2008 US 62819 P

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

02.04.2020

73 Titular/es:

**APPLIED GENETIC TECHNOLOGIES
CORPORATION (100.0%)
11801 Research Drive, Suite D
Alachua, FL 32615 , US**

72 Inventor/es:

**KNOP, DAVE;
THOMAS, DARBY y
VERES, GABOR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 751 999 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

Producción recombinante de virus adeno-asociados usando células BHK en suspensión

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la terapia génica basada en virus, en particular a la terapia génica basada en virus adeno-asociado recombinante (VAAr). La invención se refiere a procedimientos para producir partículas virales de VAA recombinantes utilizando células cultivadas en suspensión. Se proporcionan partículas de VAA recombinantes para utilizar en procedimientos para la administración de genes que codifican para proteínas terapéuticas, y procedimientos para utilizar las partículas de VAA recombinantes en terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

10 La presente invención busca superar algunas de las deficiencias en la técnica anterior abordando problemas que limitan la producción de vectores de VAAr en cantidades suficientes para procedimientos de terapia génica eficientes. De lo anterior resulta evidente que existe una clara necesidad de procedimientos mejorados a gran escala para la producción de VAAr infeccioso de alta titulación y los procedimientos de producción mejorados pueden incluir diferentes técnicas para hacer que la producción sea más eficiente.

15 Mediante el uso de los procedimientos y materiales descritos en la presente memoria, se puede obtener VAAr infeccioso en líneas celulares de mamífero cultivadas en suspensión, incluidas aquellas que no han sido genéticamente alteradas por ingeniería genética recombinante para una producción mejorada de VAAr.

20 En US 2007/0202587 se divulgan los procedimientos y las composiciones para la producción de virus adeno-asociados recombinantes de alta titulación en células de mamífero adherentes. Los procedimientos divulgados se basan en la coinfección de células con dos o más vectores de virus del herpes recombinantes y deficientes en la replicación que son adecuados para la alta titulación y la producción a gran escala de virus adeno-asociados recombinantes infecciosos.

Sumario de la invención

25 La presente invención busca superar algunas de las deficiencias en la técnica anterior abordando problemas que limitan la producción de VAAr en cantidades suficientes para la aplicación clínica y comercial. Debido a la cantidad de virus que se requiere para la aplicación clínica, se requiere un procedimiento eficiente y escalable de producción de virus. La presente invención proporciona un procedimiento eficiente y escalable para producir partículas virales de VAA recombinantes utilizando células cultivadas en suspensión.

30 La invención se basa, en parte, en un procedimiento novedoso para producir VAAr de alta titulación como se describe en US 2007/0202587, que es una continuación en parte del documento US2004058439, ahora Patente de EE.UU NO. 7.091.029, emitida el 15 de agosto de 2006.

35 En el procedimiento descrito en la presente memoria, las células BHK se coinfectan de forma simultánea o secuencial en varias horas con al menos dos virus del herpes simple recombinante (VHSr). Los dos VHSr son vectores diseñados para proporcionar a las células, después de la infección, todos los componentes necesarios para producir VAAr. El procedimiento no requiere el uso de células de mamífero especializadas para la expresión de productos génicos particulares. Esto es ventajoso porque la invención se puede practicar utilizando cualquier célula de mamífero generalmente adecuada para este propósito.

40 La invención se refiere a un procedimiento para producir partículas virales de VAA recombinantes en una célula BHK que crece en suspensión que comprende: coinfectar una célula BHK que crece en suspensión con (i) un primer virus del herpes simplex deficiente en la replicación que comprende un ácido nucleico que codifica para un gen rep VAA y un gen tapa VAA, cada uno de ellos unido de manera operable a un promotor; y (ii) un segundo virus del herpes simplex deficiente en la replicación recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica para un gen de interés unido de manera operable a un promotor, estando dicho ácido nucleico flanqueado por las secuencias repetidas terminales invertidas de VAA, en el que dichas células se infectan con el primer VHSr y el segundo VHSr en una proporción de 1:2 a 6:1, para una MDI combinada de entre 3 y 14, produciendo así partículas virales recombinantes de VAA en una célula BHK, en el que el número de partículas virales producidas es igual o mayor que el número de partículas virales cultivadas en un número igual de células BHK en condiciones adherentes.

45 El gen de interés puede ser un gen terapéutico o un gen reportero. En una realización, el gen de interés es un gen terapéutico.

50 En una realización específica, el gen terapéutico se selecciona del grupo que consiste en genes antiangiogénicos, alfa-1 antitripsina, retinosquisina, ácido alfa glucosidasa, RPE65, subunidad beta del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGB3), subunidad alfa del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGB3), subunidad alfa de la proteína G del cono fotorreceptor (GNAT2), pigmento retinal específico del epitelio de 65 kDa (PRE65), retinosquisis juvenil ligada a X (RS1), factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDG), factor neurotrófico derivado de células gliales (FNDG), distrofia miotónica de la proteína quinasa (DMPk), dedo de zinc tipo CCHC, proteína de unión a ácido nucleico (conocida como CNBP o ZNF9), regulador de la retinitis pigmentosa GTPasa (RRPG), α -glucosidasa

55

5 ácida (AGA), coroidermia (CHM), proteína de escolta Rab-1 (PER1), alfa-sinucleína (SNCA), factor de coagulación VIII, componente procoagulante (hemofilia A ó F8), factor de coagulación IX (componente tromboplásico plasmático, enfermedad de Navidad, hemofilia B ó F9), receptor de hidrocarburo arilo que interactúa con la proteína tipo-1 (AIPL1), inhibidor ligado a X de la proteína de apoptosis (IXPA), clarina-1 (CLRN1), genes de la neuropatía hereditaria de Leber (MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L y MT-ND6), alfa-galactosidasa A (a-Gal A) o alfa-L-iduronidasa.

En otra realización más, el gen tapa de VAA tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste en VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7, VAA -8, VAA-9 y rhVAA10

En un aspecto, la coinfección con el primer y el segundo virus del herpes simplex deficiente en la replicación puede ser simultánea.

10 A continuación, se divulgan:

- una partícula viral de VAA recombinante producida por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente;

- un procedimiento para administrar una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína terapéutica a una célula diana de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente;

15 - un kit para hacer una partícula viral recombinante en células BHK capaces de crecer en suspensión e instrucciones para su uso;

- un kit para administrar de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína terapéutica a una célula diana, e instrucciones de uso.

Descripción breve de los dibujos

20 La Figura 1 es una gráfica que muestra una comparación de la producción de VAAr por dos aislados diferentes de células BHK en suspensión. Los aislados de suspensión BHK C13-2P ($4,5 \times 10^5$ células/ml) y AC9 ($4,7 \times 10^5$ células/ml) se coinfectaron con VHSr-rep2cap2 y VHSr-GFP en una multiplicidad de infección (MDI) de 12 y 2, respectivamente. Las muestras de la producción a lo largo del tiempo se evaluaron para el nivel de producción de VAAr2-GFP mediante el ensayo de infectividad de células verdes.

25 La figura 2 es una gráfica que muestra la producción de VAAr a lo largo del tiempo. Las células se coinfectaron a $1,0 \times 10^6$ células/ml con VHSr-rep2cap2 y VHSr-GFP a una MDI de 12 y 2, respectivamente. Dos horas posteriores a la infección, las células se sedimentaron y se resuspendieron en DMEM sin SFB. Las muestras de la producción a lo largo del tiempo se evaluaron para el nivel de producción de VAAr2-GFP mediante el ensayo de infectividad de células verdes. Las barras de error representan la desviación estándar en 3 matraces.

30 La figura 3 es una gráfica que muestra la densidad celular en la infección. Las células BHKs en el intervalo de densidades celulares indicadas en un volumen total de 25 ml se coinfectaron con VHSr-rep2cap2 y VHSr-GFP a una MDI de 12 y 2, respectivamente. Dos horas posteriores a la infección, las células se sedimentaron y se resuspendieron en DMEM sin SFB. Las muestras se cosecharon por lisis *in situ* a las 22 horas posteriores a la infección y se analizó el nivel de producción de VAAr2-GFP (pi/célula - barras; pi totales en el cultivo de 25 ml - círculos abiertos) mediante el ensayo de infectividad de células verdes. Las barras de error representan la variación intraensayo.

35 La Figura 4 (A y B) son dos gráficas que muestran la producción de VAAr sobre el intervalo de MDI para VHSr-rep2cap2. La Figura 4A muestra datos acumulativos para experimentos que examinan la producción de VAAr con VHSr-rep2cap2 utilizado en coinfecciones en el intervalo indicado de MDI. Todas las coinfecciones se realizaron con VHSr-GFP utilizado a una MDI de 2 y las células se infectaron a densidades que oscilaban entre $8,13 \times 10^5$ y $3,76 \times 10^6$ células/ml. Dos horas posteriores a la infección, las células se sedimentaron y se resuspendieron en DMEM sin SFB. Las muestras se recogieron por lisis *in situ* entre 18 y 48 horas posteriores a la infección y se analizó el nivel de producción de VAAr2-GFP mediante el ensayo de infectividad de células verdes. Los números dentro de las barras representan el número de matraces analizados en la MDI indicada.

40 Las barras de error representan la variación entre ensayos. La Figura 4B muestra la producción de partículas resistentes a la ADNasa (PRA) y la producción de pi por las células BHKs con VHSr-rep2cap2 utilizado en la MDI variable. También se analizaron muestras representativas (n=2) de la gráfica A para determinar el nivel de PRA producido (línea). También se presenta la media pi/celda de esas muestras (barras). La proporción media de PRA a pi es 13.8 (+/- 3,2) a 1.

45 La Figura 5 es una gráfica que muestra la producción de VAAr sobre el intervalo de MDI para VHSr-rep2cap1. Se presentan datos acumulativos para experimentos que examinan la producción de VAAr con VHSr-rep2cap1 utilizados en coinfecciones en el intervalo indicado de MDI. Todas las coinfecciones se realizaron con VHSr-AAT utilizado a una MDI de 2 y las células se infectaron a densidades que variaban de $1,45 \times 10^6$ a $2,40 \times 10^6$ células/ml. Dos horas posteriores a la infección, las células se sedimentaron y se resuspendieron en DMEM sin SFB. Las muestras se cosecharon por lisis *in situ* entre 23 y 48 horas posteriores a la infección y se analizó el

55

nivel de producción de VAAr1-AAT mediante la partícula resistente a ADNasa, en PCR cuantitativa en tiempo real. Los números dentro de las barras representan el número de matraces analizados en la MDI indicada. Las barras de error representan la variación entre ensayos.

5 La Figura 6A es una gráfica que muestra los niveles de producción de VAAr de diferentes serotipos de cápside (1, 2, 5, 8 y 9) con diferentes transgenes (IA, AAT y GFP). Todas las coinfecciones se realizaron con VHSr-rep2capX a una MDI de 4 y VHSr-GDI a una MDI de 2 y las células se infectaron a densidades que oscilaban entre $1,2 \times 10^6$ y $2,0 \times 10^6$ células/ml. Dos horas posteriores a la infección, las células se sedimentaron y se resuspendieron en DMEM sin SFB. Las muestras se recogieron por lisis *in situ* entre 24 y 30 horas posteriores a la infección y se analizó el nivel de producción de VAArX-GDI mediante la partícula resistente a ADNasa, en PCR cuantitativa en tiempo real. Las barras de error representan la variación entre ensayos. Se analizaron muestras representativas de los experimentos en la Figura 6A para determinar la infectividad utilizando la dilución de punto final $DICT_{50}$. Las proporciones PRA/infectividad (PRA:pi) se representan en la Figura 6B. Las diferencias en la infectividad entre los tres serotipos indicados (VAAr tipos 1, 2 y 5), reflejan las diferencias en estos tipos celular en su capacidad para infectar a las células derivadas de HeLa utilizadas en el ensayo de infectividad.

La Figura 7 es una gráfica que muestra la producción de VAAr2-GFP en un Celligen Plus CSTR. A las 24 horas posteriores a la infección, la proporción PRA:pi era 10:1 y la proporción cápside:PRA era 4.4:1 (vector asociado a células). Durante el crecimiento celular, el tiempo de duplicación promedio fue de 9.6 horas.

20 La Figura 8 es una gráfica que muestra los resultados de un experimento que es una repetición de la producción de VAAr2-GFP en un Celligen Plus CSTR como se muestra en la Figura 7. La proporción PRA:pi fue 11:1 y la proporción cápside:PRA fue 6.6:1 (vector asociado a la célula).

La Figura 9 es una gráfica que muestra el crecimiento de BHKs previo a la infección en biorreactores Wave en función del tiempo para las operaciones de alimentación y de perfusión.

25 La Figura 10 es una gráfica que muestra los rendimientos específicos típicos de VAAr1-AAT (PRA/célula) para la producción de vectores en biorreactores desechables Wave a 1/2 L (49 horas posteriores a la infección, n=3. MDI VHSr- rep2cap1 de 12 y MDI VHSr-AAT de 2), 5/10 L (24 horas posteriores a la infección, n=4. VHSr-rep2cap1 MDI de 4 y VHSr- AAT MDI de 2), y 10/20 L (24 horas posteriores a la infección, n=6, VHSr- rep2cap1 MDI de 4 y MDI VHSr-AAT de 2) escalas de cultivo.

30 La Figura 11 es una gráfica que muestra las concentraciones de metabolitos durante una operación de producción BHKs VAAr1-AAT de un lote de 1 L alimentado, antes y después de la infección.

La Figura 12 es una gráfica que muestra las concentraciones típicas de metabolitos durante un ciclo de producción BHKs VAAr1-AAT de perfusión de 1 L, antes y después de la infección.

La Figura 13 es una gráfica que muestra el crecimiento celular típico y la viabilidad para la operación de un lote de 5 L de volumen de cultivo en un biorreactor Wave.

35 La Figura 14 es una gráfica que muestra el crecimiento celular típico, la viabilidad y las concentraciones de amonio para una operación de un lote de 10 L de cultivo en un biorreactor Wave.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la técnica a la que pertenece la presente invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en la presente memoria: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se utiliza en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" o "secuencia codificante" se refiere a una región de ADN (la región transcrita) que codifica para una proteína. Una secuencia codificante se transcribe (ADN) y se traduce (ARN) en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de una región regulatoria apropiada, como un promotor. Un gen puede comprender varios fragmentos unidos operativamente, como un promotor, una secuencia líder de 5', una secuencia codificante y una secuencia 3' no traducida, que comprende un sitio de poliadenilación. La frase "expresión de un gen" se refiere al proceso en el que un gen se transcribe en un ARN y/o se traduce en una proteína activa.

El término "gen de interés" (GDI) se refiere a una secuencia heteróloga introducida en un vector de expresión de VAA, y típicamente se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de uso terapéutico en humanos o en animales.

5 El término "virus del herpes" o "familia del herpesviridae" se refiere a la familia general de virus de ADN de doble cadena envueltos con genes relativamente grandes. La familia se replica en el núcleo de una amplia gama de huéspedes vertebrados e invertebrados, en realizaciones preferidas, huéspedes mamíferos, por ejemplo, en humanos, caballos, ganado, ratones y cerdos. Los miembros ejemplares de la familia herpesviridae incluyen citomegalovirus (CMV), virus del herpes simplex tipos 1 y 2 (VHS1 y VHS2) y varicela zoster (VZV) y virus epstein barr (VEB).

10 El término "infección" se refiere a la entrega de ADN heterólogo a una célula por un virus. El término "coinfección" como se utiliza en la presente memoria significa "infección simultánea", "infección doble", "infección múltiple" o "infección en serie" con dos o más virus. La infección de una célula productora con dos (o más) virus se denominará "coinfección". El término "transfección" se refiere a un proceso de suministro de ADN heterólogo a una célula mediante procedimientos físicos o químicos, como el ADN plasmídico, que se transfiere a la célula mediante electroporación, precipitación con fosfato de calcio u otros procedimientos bien conocidos en el técnica.

15 Los términos "VHS recombinante", "VHSr" y "vector VHSr" se refieren a formas genéticamente modificadas aisladas del virus del herpes simplex tipo 1 (VHS) que contienen genes heterógenos incorporados en el genoma viral. Por el término "VHSr-rep2cap2" o "VHSr-rep2cap1" se entiende un VHSr en el que los genes rep y tapa de VAA de los serotipos 1 ó 2 de VAA se han incorporado al genoma de VHSr. En ciertos casos, una secuencia de ADN que codifica para un gen terapéutico de interés se ha incorporado al genoma viral.

20 El término "virión de VAA" se refiere a una partícula viral completa, tal como, por ejemplo, una partícula de virión de VAA de tipo silvestre, que comprende ADN de genoma de cadena sencilla empaquetado en proteínas de cápside de VAA. La molécula de ácido nucleico de cadena sencilla es una cadena sentido o una cadena antisentido, ya que ambas cadenas son igualmente infecciosas. El término "partícula viral de VAAr" se refiere a una partícula viral VAA recombinante, es decir, una partícula que es infecciosa pero defectuosa en la replicación. Una partícula viral de VAAr comprende ADN de genoma de cadena sencilla empaquetado en proteínas de cápside de VAA.

25 El término "proteína terapéutica" como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína, que tiene un efecto terapéutico sobre una enfermedad o un trastorno a tratar. La proteína terapéutica, cuando se expresa en una cantidad efectiva (o dosis) es suficiente para prevenir, corregir y/o normalizar una respuesta fisiológica anormal. Por ejemplo, una proteína terapéutica puede ser suficiente para reducir en al menos aproximadamente un 30 por ciento, más preferiblemente en al menos un 50 por ciento, lo más preferiblemente en al menos un 90 por ciento, una característica clínicamente significativa de enfermedad o trastorno.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "transgen" se refiere a un gen o genes heterólogos, o genes recombinantes ("casete de genes") en un vector, que se transduce a una célula.

35 El uso del término "transgen" abarca tanto la introducción del gen o el casete génico con el fin de corregir un defecto genético en la célula, o de alterar las funciones de las células transducidas y/o circundantes, y la introducción del gen o casete génico en una célula productora con el fin de permitir que la célula produzca VAAr. En ciertos casos, la introducción del gen o del casete génico con el propósito de corregir un defecto genético en la célula o alterar las funciones de las células transducidas y/o circundantes puede llevarse a cabo mediante terapia génica. Por el término "vector" se entiende un plásmido recombinante o una construcción viral utilizada como vehículo para la introducción de transgenes en las células.

Antecedentes técnicos: virus adeno-asociados (VAA)

45 El virus adeno-asociado (VAA) es un parvovirus de ADN de cadena sencilla no patogénico. El VAA tiene un diámetro de cápside de aproximadamente 20 nm. Cada extremo del genoma de ADN de cadena sencilla que contiene una repetición terminal invertida (RTI), que es el único elemento de acción cis requerido para la replicación y el empaquetamiento del genoma. El genoma del VAA lleva dos genes virales: rep y tapa. El virus utiliza dos promotores y empalmes alternativos para generar cuatro proteínas necesarias para la replicación (Rep78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40). Un tercer promotor genera la transcripción de tres proteínas estructurales de la cápside viral, 1, 2 y 3 (VP1, VP2 y VP3), a través de una combinación de empalmes alternativos y codones de inicio de traducción alternativos (Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. Bioessays. 1995; 17:237-45). Las tres proteínas de la cápside comparten los mismos 533 aminoácidos del C-terminal, mientras que VP2 y VP1 contienen secuencias adicionales en el N-terminal de 65 y 202 aminoácidos, respectivamente. El virión VAA contiene un total de 60 copias de VP1, VP2 y VP3 en una proporción 1:1:20, dispuestas en una simetría icosaédrica T=1 (Rose JA, Maizel JV Jr, Inman JK, Shatkin AJ. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. J Virol. 1971; 8:766-70). El VAA requiere Adenovirus (Ad), Virus del Herpes Simplex (VHS) u otros virus como virus auxiliar para completar su ciclo de vida lítico (Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. Science. 1965; 149:754-6; Hoggan MD, Black- low NR, Rowe WP. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. Proc Natl Acad Sci USA.

1966; 55:1467-74). En ausencia del virus auxiliar, el VAA silvestre establece latencia mediante la integración con la ayuda de proteínas Rep a través de la interacción de la RTI con el cromosoma (Berns et al., 1995).

Serotipos VAA

5 Hay varios serotipos de VAA diferentes, que incluyen VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7 y VAA-8, VAA-9, y rh-VAA-10. Los estudios *in vivo* han demostrado que los diversos serotipos de VAA muestran diferentes tropismos de tejidos o células. Por ejemplo, VAA-1 y VAA-6 son dos serotipos que son eficientes para la transducción del músculo esquelético (Gao GP, Alvira MR, Wang L, et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:11854-11859; Xiao W, Chirmule N, Berta SC, et al. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol. 1999; 73:3994-4003; Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, et al. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. Mol Ther. 2000; 2:619-623). Se ha demostrado que el VAA-3 es superior para la transducción de megacariocitos (Handa A, Muramatsu S, Qiu J, Mizukami H, Brown KE. Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. J Gen Virol. 2000; 81:2077-2084). El VAA-5 y el VAA-6 infectan a las células de las vías aéreas apicales de manera eficiente (Zabner J, Seiler M, Walters R, et al. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. J Virol. 2000; 74:3852-3858; Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Los vectores del virus asociado al tipo 6 (VAA6) asociado median la transducción eficiente de las células epiteliales de las vías respiratorias en los pulmones de los ratones en comparación con la de los vectores VAA2. J Virol. 2001; 75:6615-6624.). VAA-2, VAA-4 y VAA-5 transducen diferentes tipos de células en el sistema nervioso central (Davidson BL, Stein CS, Heth JA, et al. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:3428-3432). El VAA-8 y VAA-5 pueden transducir células hepáticas mejor que VAA-2 (Gao GP, Alvira MR, Wang L, et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:11854-11859.; Mingozzi F, Schuttrumpf J, Arruda VR, et al. Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector. J Virol. 2002; 76:10497-10502). En WO99/61601 se muestra que los vectores basados en VAA5 transducen a ciertos tipos de células (células epiteliales de las vías respiratorias cultivadas, células musculares estriadas cultivadas y células endoteliales de vena umbilical humana cultivadas) con una mayor eficiencia que VAA2, mientras que tanto VAA2 como VAA5 mostraron eficiencias de transducción pobres para las líneas celulares NIH 3T3, skbr3 y t-47D. Se descubrió que el VAA-4 transduce la retina de rata de la manera más eficiente, seguido de VAA-5 y VAA-1 (Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, et al. Crosspackaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. J Virol. 2002; 76:791-801; Weber M, Rabinowitz J, Provost N, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. Mol Ther. 2003; 7:774-781).

35 Desde el desarrollo de los serotipos de VAA naturales en vectores de terapia génica, se ha centrado mucho esfuerzo en comprender el tropismo de cada serotipo para que se puedan realizar modificaciones adicionales al virus para mejorar la eficiencia de la transferencia génica. Un enfoque consiste en intercambiar dominios de una cápside de serotipo a otra, y así crear vectores híbridos con cualidades deseables de cada padre. Como la cápside viral es responsable por la unión del receptor celular, es importante comprender los dominios de la cápside viral críticos para la unión. Los estudios de mutación en la cápside viral (principalmente en VAA2) realizados antes de la disponibilidad de la estructura cristalográfica se basaron principalmente en la funcionalización de la superficie de la cápside por adsorción de restos exógenos, inserción de péptido en una posición aleatoria o mutagénesis integral a nivel de aminoácidos. Choi et al. (Curr Gene Ther. 2005 June; 5 (3):299-310), describen diferentes enfoques y consideraciones para los serotipos híbridos.

45 Es posible producir partículas de VAAr con proteínas de cápside expresadas por múltiples serotipos de VAA. Esto se logra mediante la coinfección de células productoras con un virus de expresión de VHSr y con un virus auxiliar VHSr-rep2capX en el que los productos del gen tapa se derivan de serotipos de VAA que no son, o además de, VAA2. Los vectores de VAA recombinantes se han basado generalmente en cápsides de VAA-2. Recientemente se ha demostrado que los vectores VAAr basados en cápsides de los serotipos VAA-1, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-8 ó VAA-9 difieren del VAA-2 en su tropismo.

Las cápsides de otros serotipos de VAA ofrecen ventajas en ciertas aplicaciones *in vivo* sobre los vectores de VAAr basados en la cápside de VAA-2. En primer lugar, el uso apropiado de los vectores de VAAr con serotipos particulares puede aumentar la eficiencia de la entrega de genes *in vivo* a ciertas células diana que se infectan pobremente, o que no se infectan en absoluto, por vectores basados en VAA-2. En segundo lugar, puede ser ventajoso utilizar vectores de VAAr basados en otros serotipos de VAA si la readministración del vector de VAAr se vuelve clínicamente necesaria. Se ha demostrado que la readministración del mismo vector de VAAr con la misma cápside puede ser ineficaz, posiblemente debido a la generación de anticuerpos neutralizantes generados para el vector (Xiao, et al., 1999, Halbert, et al., 1997). Este problema puede evitarse mediante la administración de una partícula de VAAr cuya cápside está compuesta por proteínas de un serotipo de VAA diferente, no afectada por la presencia de un anticuerpo neutralizante para el primer vector de VAAr (Xiao, et al., 1999). Por las razones mencionadas anteriormente, son deseables los vectores recombinantes de VAA construidos utilizando genes tapa de serotipos que incluyendo y adicionalmente a VAA-2.

Se reconocerá que la construcción de vectores de VHS recombinantes similares a VHSr pero que codifican para los genes tapa de otros serotipos de VAA (por ejemplo, VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-5 a VAA-9) se puede realizar utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria para producir VHSr. En ciertos aspectos preferidos, se prefieren los vectores de VAA recombinantes construidos utilizando genes tapa de diferentes VAA. Las ventajas significativas de la construcción de estos vectores adicionales de VHSr son la facilidad y el ahorro de tiempo, en comparación con los procedimientos alternativos utilizados para la producción a gran escala de VAAr. En particular, se evita el difícil proceso de construir nuevas líneas celulares inducibles para genes rep y tapa para cada serotipo de cápside diferente.

Antecedentes técnicos: VAA y terapia génica

La terapia génica se refiere al tratamiento de enfermedades hereditarias o adquiridas mediante la sustitución, alteración o suplementación de un gen responsable por la enfermedad. Se logra mediante la introducción de un gen o genes correctivos en una célula huésped, generalmente por medio de un vehículo o un vector. La terapia génica con VAAr es muy prometedora para el tratamiento de muchas enfermedades.

Hasta la fecha, se han realizado más de 500 ensayos clínicos de terapia génica en todo el mundo. Los esfuerzos para utilizar VAAr como vehículo para la terapia génica son prometedores para su aplicabilidad como tratamiento para enfermedades humanas. Ya se ha logrado cierto éxito preclínicamente, mediante el uso de VAA recombinante (VAAr) para la entrega y la expresión a largo plazo de genes introducidos en células de animales, incluidas las células clínicamente importantes que no se dividen en el cerebro, el hígado, el músculo esquelético y el pulmón. En algunos tejidos, se ha demostrado que los vectores de VAA se integran en el genoma de la célula diana (Hirata et al. 2000, J. of Virology 74:4612-4620).

Una ventaja adicional del VAAr es su capacidad para realizar esta función en tipos de células que no se dividen, incluyendo hepatocitos, neuronas y miocitos esqueléticos. El VAAr se ha utilizado con éxito como vehículo de terapia génica para permitir la expresión de la eritropoyetina en el músculo esquelético de ratones (Kessler et al., 1996), tirosina hidroxilasa y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos en el SNC en modelos de mono de la enfermedad de Parkinson (Kaplitt et al., 1994) y Factor IX en músculo esquelético e hígado en modelos animales de hemofilia. A nivel clínico, el vector de VAAr se ha utilizado en ensayos clínicos en humanos para administrar el gen CFTR a pacientes con fibrosis quística y el gen del Factor IX a pacientes con hemofilia (Flotte, et al., 1998, Wagner et al, 1998). Además, el VAA es un parvovirus de ADN dependiente de auxiliar, que no está asociado a enfermedades en humanos o en mamíferos (Berns and Bohensky, 1987, Advances in Virus Research, Academic Press Inc, 32:243-307). Por consiguiente, uno de los atributos más importantes de los vectores de VAA es su perfil de seguridad en los ensayos clínicos de fase I.

La terapia génica con VAA se ha llevado a cabo en varios entornos patológicos diferentes y para tratar diversas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, en un estudio de fase I, la administración de un vector VAA2-FIX en el músculo esquelético de ocho sujetos con hemofilia B resultó segura y logró la transferencia local de genes y la expresión del Factor IX durante al menos 10 meses después de la inyección del vector (Jiang et al., Mol Ther. 2006 Sep; 14(3):452-5. Epub 2006, Jul 5), un ensayo de fase I de inyección intramuscular de un gen recombinante adeno-asociado alfa 1-antitripsina (VAAr2-CB-hAAT) el vector para adultos con deficiencia de AAT se ha descrito previamente (Flotte et al., Hum Gene Ther. 2004 Jan; 15(1):93-128), y en otro ensayo clínico se ha demostrado que la terapia génica VAA-GAD del núcleo subtalámico es segura y bien tolerada por pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada (Kaplitt et al. Lancet. 2007 Jun 23; 369(9579):2097-105).

Antecedentes técnicos: producción de VAAr

Los procedimientos de producción de VAA convencionales hacen uso de procedimientos que limitan el número de VAAr que puede producir una sola célula productora. El primero de ellos es la transfección utilizando plásmidos para la entrega de ADN a las células. Es bien sabido que la transfección de plásmidos es un proceso inherentemente ineficiente que requiere altas copias genómicas y, por lo tanto, grandes cantidades de ADN (Hauswirth et al., 2000).

Los avances hacia el logro de la meta deseada de los sistemas de producción escalables que puedan producir grandes cantidades de vectores de VAAr de grado clínico se han realizado en gran medida en sistemas de producción que utilizan la transfección como un medio para entregar los elementos genéticos necesarios para la producción de VAAr en una célula. Por ejemplo, la eliminación del auxiliar de adenovirus contaminante se ha evitado reemplazando la infección por adenovirus con la transfección de plásmidos en un sistema de transfección de tres plásmidos en el que un tercer plásmido comprende secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas auxiliares de adenovirus (Xiao et al. 1998). Las mejoras en los sistemas de transfección de dos plásmidos también han simplificado el proceso de producción y han aumentado la eficiencia de producción del vector de VAAr (Grimm et al., 1998). A pesar de estos avances, generalmente se reconoce que los sistemas de transfección están limitados por su eficiencia en la absorción de ADN exógeno y en su utilidad comercial debido a dificultades de escala.

Varias estrategias para mejorar los rendimientos de VAAr de células de mamífero cultivadas se basan en el desarrollo de células productoras especializadas creadas por ingeniería genética. En un enfoque, la producción de VAAr a gran escala se ha logrado mediante el uso de líneas celulares "provirales" genéticamente producidas en las

que se puede "rescatar" un genoma de VAA insertado infectando a la célula con adenovirus auxiliar o VHS. Las líneas celulares provirales pueden rescatarse mediante una simple infección por adenovirus, lo que ofrece una mayor eficiencia en relación con los protocolos de transfección. Sin embargo, como con los procedimientos de transfección anteriores, el adenovirus se introduce en el sistema que luego debe eliminarse. Además, el rendimiento de VAAr es generalmente bajo en líneas celulares provirales (Qiao et al. 2002a).

Existen varias desventajas adicionales que limitan los enfoques que utilizan líneas celulares provirales. El proceso de clonación y selección celular en sí mismo puede ser laborioso; Además, este proceso debe llevarse a cabo para generar una línea celular única para cada gen de interés (GDI) terapéutico. Además, los clones celulares que tienen insertos de estabilidad impredecible pueden generarse a partir de líneas celulares provirales.

Un segundo enfoque basado en células para mejorar los rendimientos de VAAr de las células implica el uso de líneas celulares de "empaquetamiento" genéticamente producidas que albergan en sus genomas a los genes rep y tapa de VAA, o tanto tapa-rep y el gen-RTI de interés (Qiao et al., 2002b). En el enfoque anterior, para producir VAAr, una línea celular de empaquetamiento se infecta o transfecta con funciones del auxiliar y con los elementos VAA GDI-RTI. El último enfoque implica la infección o transfección de las células con solamente las funciones del auxiliar. Típicamente, la producción de VAAr utilizando una línea celular de empaquetamiento se inicia infectando a las células con adenovirus de tipo silvestre o adenovirus recombinante. Debido a que las células de empaquetamiento comprenden a los genes rep y tapa, no es necesario suministrar a estos elementos de manera exógena.

Aunque se ha demostrado que los rendimientos de VAAr de las líneas celulares de empaquetamiento son mayores que los obtenidos por los protocolos de rescate o transfección de líneas celulares provirales, las líneas celulares de empaquetado típicamente sufren eventos de recombinación, tales como la recombinación del vector de adenovirus con E1a eliminado con el ADN de células 293 del huésped. Por lo tanto, la infección con el adenovirus recombinante inicia tanto la producción de VAAr como la generación de adenovirus con capacidad de replicación. Además, solamente se ha logrado un éxito limitado en la creación de líneas celulares de empaquetamiento con insertos genéticos estables.

El progreso reciente en la mejora de los rendimientos de VAAr también se ha realizado utilizando enfoques basados en la entrega de funciones del auxiliar del virus del herpes simple (VHS) utilizando sistemas de amplicón VHS recombinante. Aunque inicialmente se reportaron niveles modestos de rendimiento del vector VAAr, del orden de 150-500 genomas virales (gv) por célula (Conway et al., 1997), las mejoras más recientes en los sistemas basados en amplicones VHSr han proporcionado rendimientos sustancialmente más altos de VAAr gv y partículas infecciosas (pi) por célula (Feudner et al., 2002). Los sistemas de amplicones son inherentemente deficientes en replicación; sin embargo, el uso de un vector "destruido", competente en replicación (VHScr) o deficiente en replicación VHSr aún introduce componentes inmunogénicos del VHS en los sistemas de producción de VAAr. Por lo tanto, se deben implementar ensayos apropiados para estos componentes y los correspondientes protocolos de purificación para su eliminación. Además, las reservas de amplicón son difíciles de generar en titulaciones altas, y a menudo contienen una contaminación sustancial del virus parental.

En US2007202587 se describen los elementos requeridos de los sistemas de producción de VAAr. El VAA recombinante se produce *in vitro* mediante la introducción de construcciones de genes en células conocidas como células productoras. Los sistemas conocidos para la producción de VAAr emplean tres elementos fundamentales: 1) un casete de genes que contiene a el gen de interés, 2) un casete de genes que contiene a los genes rep y tapa de VAA y 3) una fuente de proteínas del virus "auxiliar".

El primer casete de genes se construye con el gen de interés flanqueado por repeticiones terminales invertidas (RTI) de VAA. Las RTI funcionan para dirigir la integración del gen de interés en el genoma de la célula huésped y son esenciales para la encapsidación del genoma recombinante. (Hermonat and Muzyczka, 1984, Samulski, et al., 1983). El segundo casete de genes contiene a los genes rep y tapa, genes de VAA que codifican para las proteínas necesarias para la replicación y el empaquetamiento de VAAr. El gen rep codifica para cuatro proteínas (Rep 78, 68, 52 y 40) necesarias para la replicación del ADN. Los genes tapa codifican para tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) que forman la cápside del virus (Muzyczka y Berns, 2001).

El tercer elemento es necesario porque el VAA no se replica por sí solo. Las funciones del auxiliar son productos protéicos de los virus de ADN auxiliares que crean un entorno celular propicio para la replicación y el empaquetamiento eficiente de VAAr. Tradicionalmente, el adenovirus (Ad) se ha utilizado para proporcionar funciones auxiliares para VAAr, pero los herpesvirus también pueden proporcionar estas funciones como se discute a continuación.

Se puede utilizar cualquier tipo de célula como célula huésped, siempre que la célula sea capaz de soportar la replicación de un virus del herpes. Un experto en la técnica estaría familiarizado con la amplia gama de células huésped que se pueden utilizar en la producción del herpesvirus a partir de células huésped. Los ejemplos de células huésped de mamífero no modificadas genéticamente adecuadas, por ejemplo, pueden incluir, pero no se limitan a, líneas celulares tales como HEK-293 (293), Vero, RD, BHK-21, HT-1080, A549, Cos-7, ARPE-19 y MRC-5.

Una estrategia bien conocida para la entrega de todos los elementos requeridos para la producción de VAAr utiliza dos plásmidos y un virus auxiliar. Este procedimiento se basa en la transferencia de las células productoras con plásmidos que contienen casetes génicos que codifican para los productos génicos necesarios, así como la infección de las células con Ad para proporcionar las funciones del auxiliar. Este sistema emplea plásmidos con dos casetes genéticos diferentes. El primero es un plásmido proviral que codifica el ADN recombinante para ser empaquetado como VAAr. El segundo es un plásmido que codifica para los genes rep y tapa. Para introducir estos diversos elementos en las células, las células se infectan con Ad y así mismo se transfectan con los dos plásmidos. Los productos génicos proporcionados por Ad están codificados por los genes E1a, E1b, E2a, E4orf6 y Va (Samulski et al., 1998; Hauswirth et al., 2000; Muzyczka and Burns, 2001). Alternativamente, en protocolos más recientes, el paso de infección de Ad puede ser reemplazado por transfección con un "plásmido auxiliar" de adenovirus que contiene a los genes VA, E2A y E4 (Xiao, et al., 1998, Matsushita, et al., 1998).

Aunque Ad se ha utilizado convencionalmente como el virus auxiliar para la producción de VAAr, se sabe que también se pueden utilizar otros virus de ADN, tales como el virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-1). Se ha identificado el conjunto mínimo de genes VHS-1 necesarios para la replicación y el empaquetamiento de VAA2, e incluye los primeros genes UL5, UL8, UL52 y UL29 (Muzyczka and Burns, 2001). Estos genes codifican para componentes de la maquinaria de replicación del núcleo VHS-1, es decir, las proteínas helicasa, primasa, primasa accesoria y la proteína de unión al ADN de cadena sencilla (Knipe, 1989; Weller, 1991). Esta propiedad auxiliar de VAAr del VHS-1 se ha utilizado en el diseño y construcción de un vector de virus del herpes recombinante capaz de proporcionar los productos de los genes del virus auxiliar que son necesarios para la producción de VAAr (Conway et al., 1999).

Antecedentes técnicos: Células creciendo en suspensión

La Solicitud de EE.UU No. 20070172846 describe procedimientos que se han utilizado para adaptar células 293 en cultivos en suspensión. Graham adaptó a las células 293A al cultivo en suspensión (células 293N3S) mediante 3 pases en serie en ratones desnudos (Graham, J. Gen. Virol., 68(Pt 3):937-940, 1987). Se encontró que las células 293N3S en suspensión eran capaces de soportar la replicación de vectores adenovirales con E1-eliminado. Sin embargo, Gamier et al. (Gamier et al., Cytotechnology, 15(1-3):145-155, 1994) observó que las células 293N3S tenían una fase de retraso inicial relativamente larga en suspensión, una baja tasa de crecimiento y una fuerte tendencia a agruparse o formar grumos.

Un segundo procedimiento que se ha utilizado es una adaptación gradual de las células 293A al crecimiento en suspensión (Cold Spring Harbor Laboratories, células 293S). Gamier et al. (1994) reportaron el uso de células 293S para la producción de proteínas recombinantes a partir de vectores adenovirales. Los autores encontraron que las células 293S eran mucho menos grumosas en medios libres de calcio y un intercambio de medio fresco en el momento de la infección por el virus podría aumentar significativamente la producción de proteínas. Se encontró que la glucosa era el factor limitante en el cultivo sin intercambio de medios.

Los cultivos dependientes de suspensión o de no anclaje de líneas celulares continuas establecidas son los medios más ampliamente utilizados para la producción a gran escala de células y productos celulares. El cultivo en suspensión a gran escala basado en tecnología de fermentación tiene claras ventajas para la fabricación de productos de células de mamíferos. Los procesos son relativamente simples de operar y fáciles de escalar. Se pueden proporcionar condiciones homogéneas en el biorreactor que permite un monitoreo y control precisos de la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH, y asegura que se puedan tomar muestras representativas del cultivo. Los vectores del VHSr utilizados se propagan fácilmente a una titulación alta en líneas celulares permisivas tanto en matraces de cultivo de tejidos como en biorreactores, y proporcionan un protocolo de producción susceptible para aumentar los niveles de producción de virus necesarios para la producción clínica y de mercado.

El cultivo celular en biorreactores de tanque en agitación proporciona un área de superficie de cultivo específica de muy alto volumen y se ha utilizado para la producción de vacunas virales (Griffiths, 1986). Además, se ha demostrado que los biorreactores de tanque en agitación son escalables de forma industrial. Un ejemplo es el sistema de cultivo celular multiplato CELL CUBE. La capacidad de producir vectores virales infecciosos es cada vez más importante para la industria farmacéutica, especialmente en el contexto de la terapia génica.

Como se utiliza en la presente memoria, un "biorreactor" se refiere a cualquier aparato que pueda utilizarse para el propósito del cultivo de células. Las células en crecimiento de acuerdo con la presente invención en un biorreactor permiten la producción a gran escala de células completamente biológicamente activas capaces de ser infectadas por los vectores del herpes, descritos en la presente memoria.

Los biorreactores se han utilizado ampliamente para la producción de productos biológicos tanto de cultivos de células animales dependientes de suspensión como del anclaje. La mayoría de los cultivos en suspensión a gran escala se operan como lotes o lotes alimentados porque son los más sencillos de operar y de escalar. Sin embargo, están disponibles procesos continuos basados en quimiostato o principios de perfusión.

El sistema de biorreactor puede, en ciertas realizaciones, configurarse para incluir un sistema que permita el intercambio de medios. Por ejemplo, se pueden incorporar filtros en el sistema del biorreactor para permitir la

separación de las células de los medios gastados para facilitar el intercambio de medios. En algunas realizaciones de los procedimientos presentes para producir el virus del herpes, el intercambio de medios y la perfusión se llevan a cabo en un día determinado del crecimiento celular. Por ejemplo, el intercambio de medios y la perfusión pueden comenzar en el día 3 del crecimiento celular. El filtro puede ser externo al biorreactor o interno al biorreactor.

5 Enfermedades a tratar

El gen de interés puede ser cualquier gen que tenga valor terapéutico o potencial terapéutico en el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno genético. Un experto en la técnica estaría familiarizado con la amplia gama de genes que se han identificado.

10 Los genes terapéuticos implicados pueden ser aquellos que codifican para proteínas, ARN estructurales o enzimáticos, productos inhibitorios tales como ARN o ADN antisentido, o cualquier otro producto génico. La expresión es la generación de dicho producto génico o los efectos resultantes de la generación de dicho producto génico. Por lo tanto, la expresión mejorada incluye la mayor producción de cualquier gen terapéutico o el aumento del papel de este producto en la determinación de la condición de la célula, tejido, órgano u organismo.

En un aspecto, el gen terapéutico puede codificar para una o más proteínas antiangiogénicas.

15 En otro aspecto, el gen terapéutico puede ser, pero no se limita a un gen antisentido, por ejemplo, ras antisentido, myc antisentido, raf antisentido, erb antisentido, src antisentido, fins antisentido, jun antisentido, trk antisentido, ret antisentido, gsp antisentido, hst antisentido, bcl antisentido, ab1 antisentido ab1, Rb, CFTR, p16, p21, p27, p57, p73, C-CAM, APC, CTS-1, zacl, scFV ras, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, MMAC1, FCC, MCC, BRCA2, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 IL-12, GM-CSF, G-CSF, timidina quinasa, mda7, fus-1, interferón alfa, interferón .beta., interferón .gamma., ADP, p53, ABLI, BLC1, BLC6, CBFA1, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOX, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3, YES, MADH4, RB1, TP53, WT1, TNF, BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, ApoAI, ApoAIV, ApoE, Rap1A, citosina desaminasa, Fab, ScFv, BRCA2, zac1, ATM, HIC-1, DPC-4, FHIT, PTEN, ING1, NOEY1, NOEY2, OVCA1, MADR2, 53BP2, IRF-1, Rb, zac1, DB-CCR-1, rks-3, COX-1, TFPI, PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fins, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF o MCC. En aún otros aspectos, el gen recombinante es un gen que codifica para una desaturasa ACP, una hidroxilasa ACP, una glucosa piroforilasa-ADP, una ATPasa, una deshidrogenasa de alcohol, un gen antitripsina alfa 1, una amilasa, una amiloglucosidasa, una catalasa, una celulasa, una ciclooxigenasa, o una descarboxilasa, una dextrinasa, una esterasa, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, FLt01, una hialurona sintasa, una galactosidasa, una glucanasa, una glucosa oxidasa, una GTPasa, una helicasa, una hemicelulasa, una hialuronidasa, una integrasa, una invertasa, una isomerasa, una quinasa, una lactasa, una lipasa, una lipoxigenasa, una liasa, una lisozima, una pectinesterasa, una peroxidasa, una fosfatasa, una fosfolipasa, una fosforilasa, una poligalacturonasa, una proteinasa, una peptidasa, una pululanasa, una recombinasa, una transcriptasa inversa, una topoisomerasa, una xilanasas, un gen reportero, una interleucina o una citocina. En otras realizaciones de la presente invención, el gen recombinante es un gen que codifica para carbamoil sintetasa I, transcarbamilasa oritina, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, hidrolasa de fumarilacetoacetato, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, receptor de lipoproteínas de baja densidad, porfobilinógeno desaminasa, factor VIII, factor IX, cistationa .beta.-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-CoA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta.-glucosidasa, piruvato carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, ATPasa transportadora de cobre de la enfermedad de Menkes, ATPasa transportadora de cobre de la enfermedad de Wilson, citosina desaminasa, hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa, galactosa-1-fosfato uridiltranstrasa, fenilalanina hidroxilasa, glucocerbrosidasa, esfingomielinasa, .alfa.-L-iduronidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, timidina quinasa del VHS o timidina quinasa humana. Alternativamente, el gen recombinante puede codificar para hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, hormona luteinizante, hormona foliculo estimulante, gonadotropina coriónica, hormona estimulante de la tiroides, leptina, adrenocorticotropina, angiotensina I, angiotensina II, beta.-endorfina, hormona estimulante de los beta-melanocitos, colecistoquinina, endotelina I, galanina, péptido inhibidor gástrico, glucagón, insulina, lipotropinas, neurofisinas, somatostatina, calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, péptido relacionado al gen de la beta-calcitonina, factor de hipercalcemia de malignidad, proteína relacionada de la hormona paratiroidea, proteína relacionada con la hormona paratiroidea, péptido tipo glucagón, pancreastatina, péptido pancreático, péptido YY, PHM, secretina, péptido intestinal vasoactivo, oxitocina, vasopresina, vasotocina, encefalinamida, metorfinamida, hormona estimulante de alfa melanocitos, factor natriurético auricular, amilina, componente P amiloide, hormona liberadora de corticotropina, factor liberador de la hormona del crecimiento, hormona liberadora de la hormona luteinizante, neuropéptido Y, sustancia K, sustancia P u hormona liberadora de tirotopina.

Procedimientos de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para producir partículas virales de VAA recombinantes en una célula BHK que crece en suspensión que comprende: coinfectar a células BHK que crecen en suspensión con (i) un primer virus del herpes simplex recombinante, deficiente en la replicación que comprende un ácido nucleico que codifica para un

gen rep de VAA y un gen tapa de VAA cada uno operativamente vinculado a un promotor; y (ii) un segundo virus del herpes simplex recombinante deficiente en la replicación que comprende un ácido nucleico que codifica para un gen de interés operativamente vinculado a un promotor, estando dicho ácido nucleico flanqueado por las secuencias repetidas terminales invertidas del VAA, en el que las células se infectan con el primer VHSr y el segundo VHSr en una proporción de 1:2 a 6:1, para una MDI combinada de entre 3 y 14, produciendo así partículas virales recombinantes de VAA en una célula BHK, en el que el número de partículas virales producidas es igual o mayor que el número de partículas virales cultivadas en un número igual de células BHK bajo condiciones adherentes.

Se describe también una partícula viral de VAA recombinante producida en una célula de mamífero por el procedimiento descrito anteriormente. El gen tapa del VAA tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste en VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7, VAA-8, VAA-9 y rhVAA-10.

Las partículas virales recombinantes descritas en la presente memoria pueden llevar un gen terapéutico de interés, tal como: genes antiangiogénicos, alfa-1 antitripsina, retinosquisina, ácido alfa glucosidasa, RPE65, subunidad beta del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGB3), subunidad alfa del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGA-3), subunidad alfa de la proteína G del cono fotorreceptor (GNAT2), pigmento retinal específico del epitelio de 65 kDa (PRE65), retinosquiasis juvenil ligada a X (RS1), factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor neurotrófico derivado de células gliales (FNDC), distrofia miotónica de la proteína quinasa (DMPK), dedo de zinc tipo CCHC, proteína de unión a ácido nucleico (conocida como CNBP o ZNF9), regulador de la retinitis pigmentosa GTPasa (RRPG), α -glucosidasa ácida (AGA), coroidermia (CHM), proteína de escolta Rab-1 (PER1), alfa-sinucleína (SNCA), factor de coagulación VIII, componente procoagulante (hemofilia A ó F8), factor de coagulación IX (componente tromboplásmico plasmático, enfermedad de Navidad, hemofilia B ó F9), receptor de hidrocarburo arilo que interactúa con la proteína tipo-1 (AIPL1), inhibidor ligado a X de la proteína de apoptosis (IXPA), clarina-1 (CLRN1), genes de la neuropatía hereditaria de Leber (MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L y MT-ND6), alfa-galactosidasa A (a-Gal A) o alfa-L-iduronidasa.

En una realización específica de la invención, el gen terapéutico es un gen antiangiogénico, alfa-1 antitripsina, retinosquisina, ácido alfa glucosidasa, RPE65, subunidad beta del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGB3), subunidad alfa del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGA-3), subunidad alfa de la proteína G del cono fotorreceptor (GNAT2), pigmento retinal específico del epitelio de 65 kDa (PRE65), retinosquiasis juvenil ligada a X (RS1), factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor neurotrófico derivado de células gliales (FNDC), distrofia miotónica de la proteína quinasa (DMPK), dedo de zinc tipo CCHC, proteína de unión a ácido nucleico (conocida como CNBP o ZNF9), regulador de la retinitis pigmentosa GTPasa (RRPG), α -glucosidasa ácida (AGA), coroidermia (CHM), proteína de escolta Rab-1 (PER1), alfa-sinucleína (SNCA), factor de coagulación VIII, componente procoagulante (hemofilia A ó F8), factor de coagulación IX (componente tromboplásmico plasmático, enfermedad de Navidad, hemofilia B ó F9), receptor de hidrocarburo arilo que interactúa con la proteína tipo-1 (AIPL1), inhibidor ligado a X de la proteína de apoptosis (IXPA), clarina-1 (CLRN1), genes de la neuropatía hereditaria de Leber (MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L y MT-ND6), alfa-galactosidasa A (a-Gal A) o alfa-L-iduronidasa. En ciertos aspectos preferidos, el gen terapéutico de interés es un gen de inhibición de la angiogénesis (IA) o un gen de alfa 1 antitripsina (AAT).

La producción de vectores de VAAr para terapia génica se lleva a cabo *in vitro*, utilizando células de riñón de hámster cachorro (BHK) cultivadas en suspensión. La línea celular BHK desarrollada en suspensión se deriva de una adaptación de la línea celular BHK adherente. Ambas líneas celulares están disponibles comercialmente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos de la invención.

La invención se realizó utilizando los siguientes procedimientos. Los procedimientos descritos en la presente memoria se describen en la solicitud PCT presentada el 8 de agosto de 2007 (No. de solicitud aún no asignado), titulada Recombinant AAV Production in Mammalian Cells, la cual reclama el beneficio de la Solicitud de EE.UU No. 11/503.775, titulada Recombinant AAV Production in Mammalian Cells, presentada el 14 de agosto de 2007, la cual es una continuación en parte de la Solicitud de EE.UU No. de serie 10/252.182, titulada High Titer Recombinant AAV Production, presentada el 23 de septiembre, 2002, ahora Patente de EE. UU. No. 7.091.029, emitida el 15 de agosto de 2006.

Procedimiento de coinfección por VHSr

El procedimiento de coinfección por VHSr para la producción de virus recombinantes adeno-asociados (VAAr) emplea dos vectores del virus del herpes simplex recombinante deficiente en ICP27 tipo 1 (VHSr-1), uno con los genes VAA rep y tapa (VHSr-rep2tapaX, con "tapaX" se refiere a cualquiera de los serotipos de VAA), y el segundo con el casete del gen de interés (GDI) flanqueado por repeticiones terminales invertidas (RTI) de VAA. Aunque el sistema se desarrolló con el serotipo 2 de VAA rep, tapa e RTI, así como con el gen de la proteína fluorescente verde humanizado (GFP) como transgen, el sistema puede emplearse con diferentes transgenes y elementos de serotipo/pseudotipo.

Las células de mamífero se infectan con los vectores VHSr, proporcionando todos los componentes de VAAr de acción cis y trans, así como las funciones del auxiliar necesarias para la infección por VAAr productiva. Las células se infectan con una mezcla de VHSr-rep2tapaX y VHSr-GDI. Las células se cosechan y se lisan para liberar VAAr-GDI, y el stock de vectores resultante se titula mediante los diversos procedimientos descritos a continuación.

5 Lisis DOC

En la cosecha, las células y los medios se separan por centrifugación. Los medios se dejan de lado mientras se extrae el sedimento celular con un tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM) que contiene desoxicolato (DOC) al 0.5% (p/v) utilizando 2 a 3 ciclos de congelación-descongelación, lo cual extrae a el VAAr asociado a las células. En algunos casos, los medios y el lisado de VAAr asociado a las células se recombinan.

10 Lisis *in situ*

Un procedimiento alternativo para cosechar VAAr es por lisis *in situ*. En el momento de la cosecha, se añade MgCl₂ a una concentración final de 1 mM, se agrega Triton X-100 al 10% (v/v) a una concentración final de 1% (v/v), y se agrega Benzonase a una concentración final de 50 unidades/ml. Esta mezcla se sacude o se agita a 37° C durante 2 horas.

15 PCR cuantitativa en tiempo real para determinar el rendimiento de PRA

El ensayo de partículas resistentes a ADNasa (PRA) emplea cebadores oligonucleotídicos específicos de secuencia y una sonda de hibridación con doble marcaje para la detección y cuantificación de la secuencia de ADN amplificada utilizando tecnología de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR). La secuencia diana se amplifica en presencia de una sonda fluorogénica que se hibrida con el ADN y emite una fluorescencia dependiente de la copia. La titulación de la PRA (PRA/ml) se calcula mediante la comparación directa de las unidades de fluorescencia relativa (UFR) del artículo de prueba con la señal fluorescente generada a partir de diluciones de plásmidos conocidas que llevan la misma secuencia de ADN. Los datos generados a partir de este ensayo reflejan la cantidad de secuencias de ADN viral empaquetadas, y no son indicativos de la integridad de la secuencia o de la infectividad de las partículas.

25 Ensayo de infectividad de células verdes para determinar el rendimiento de partículas infecciosas (solamente VAAr-GFP)

La titulación de partículas infecciosas (pi) se realiza en stocks de VAAr-GFP utilizando un ensayo de células verdes. Las células C12 (una línea derivada de HeLa que expresa los genes Rep y Tapa de VAA2 – véase las referencias a continuación) están infectadas con diluciones en serie de VAAr-GFP más concentraciones saturantes de adenovirus (para proporcionar funciones auxiliares para la replicación de VAA). Después de dos o tres días de incubación, se cuenta el número de células verdes fluorescentes (cada célula que representa un evento infeccioso) y se utiliza para calcular la titulación de pi/ml de la muestra de virus.

Clark KR et al. describe la producción recombinante de adenovirus en Hum. Gene Ther. 1995. 6:1329-1341 y Gene Ther. 1996. 3:1124-1132.

35 DICT₅₀ para determinar la infectividad de VAAr

La infectividad de las partículas de VAAr que albergan un gen de interés (VAAr-GDI) se determinó utilizando una dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50% (DICT₅₀). Ocho réplicas de VAAr se diluyeron en serie en presencia de adenovirus humano tipo 5 y se utilizaron para infectar células HeLaRC32 (una línea celular derivada de HeLa que expresa rep y tapa de VAA2, comprada de ATCC) en una placa de 96 pocillos. A los tres días posteriores a la infección, se añadió un tampón de lisis (concentraciones finales de Tris-HCl 1 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, 0.25% (p/v) de desoxicolato, 0.45% (v/v) Tween-20, 0.1% (p/v) se añadió dodecil sulfato de sodio, 0.3 mg/ml de Proteinasa K) a cada pocillo y luego se incubó a 37°C durante 1 h, a 55°C durante 2 h, y a 95°C durante 30 min. El lisado de cada pocillo (alícuota de 2.5 µl) se analizó en el ensayo de PRA qPCR descrito anteriormente. Los pocillos con valores de Ct inferiores al valor de la cantidad más baja de plásmido de la curva estándar se puntuaron como positivos. La infectividad de DICT₅₀ por ml (DICT₅₀/ml) se calculó basándose en la ecuación de Karber utilizando las proporciones de pocillos positivos a diluciones en serie de 10 veces.

Líneas celulares y virus

La producción de vectores de VAAr para terapia génica se lleva a cabo *in vitro*, utilizando líneas celulares productoras adecuadas tales como células BHK cultivadas en suspensión. Otras líneas celulares adecuadas para su uso en la invención incluyen HEK-293 (293), Vero, RD, BHK-21, HT-1080, A549, Cos-7, ARPE-19 y MRC-5.

Las líneas celulares de mamíferos se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Hyclone) que contiene 2 - 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Hyclone) a menos que se indique lo contrario. El cultivo celular y la propagación del virus se realizaron a 37°C, 5% de CO₂ para los intervalos indicados.

Densidad de siembra celular

Las reservas de suspensión de la célula huésped, tales como la reserva de células de suspensión BHK, se pueden utilizar para sembrar matraces giratorios, matraces agitadores, biorreactores u otros cultivos a diversas densidades de siembra. Se puede lograr un crecimiento celular satisfactorio con una amplia gama de densidades de siembra celular. Para un crecimiento celular óptimo, se recomienda que la densidad de siembra celular sea al menos aproximadamente, a lo sumo aproximadamente, aproximadamente o superior a 2×10^5 células/ml e incluye, pero no se limita a densidades celulares de al menos aproximadamente, a lo sumo aproximadamente, o aproximadamente 5×10^5 células/ml, incluidos todos los valores o intervalos entre ellos.

Temperatura del cultivo

Las células pueden cultivarse a temperaturas que incluyen, pero no están limitadas a, al menos aproximadamente, a lo sumo aproximadamente, o aproximadamente 32 grados Centígrados, 33 grados Centígrados, 34 grados Centígrados, 35 grados Centígrados, 37 grados Centígrados, 38 grados Centígrados, 39 grados Centígrados o 40 grados Centígrados, incluidos todos los valores intermedios. En ciertos aspectos de la invención, la temperatura de incubación para el crecimiento de las células en suspensión BHK será de 37 grados Centígrados.

Porcentaje de CO₂

Las células pueden cultivarse en matraces giratorios dentro de incubadoras o en biorreactores que tienen una atmósfera de al menos aproximadamente, a lo sumo máximo aproximadamente, o aproximadamente 0, 5, 10, 15 o 20% de CO₂. En ciertas realizaciones preferidas, el crecimiento celular se logró a porcentajes de CO₂ de 5% de CO₂. Típicamente, el crecimiento de las células en suspensión requiere CO₂ en el ambiente de cultivo y debe mantenerse entre 4 y 6 por ciento o en cualquier valor o intervalo entre ellos.

Crecimiento celular en matraz giratorio o en biorreactor

En ciertas realizaciones, se puede utilizar un matraz giratorio y sembrar con células en suspensión a una densidad de siembra celular apropiada como se describe en la presente memoria. En otras ciertas realizaciones, se puede utilizar un biorreactor tal y como un biorreactor desechable Wave o un biorreactor de tanque en agitación continua y sembrar con células en suspensión a una densidad de siembra de células apropiada. Las células crecen dentro del matraz giratorio o biorreactor.

Cuando las células alcanzan una densidad entre 9×10^5 y $2,5 \times 10^6$ células/ml, los nutrientes pueden reponerse y los subproductos de desecho pueden eliminarse mediante intercambio de medios, dilución o perfusión (entrada y eliminación continua de medios). Alternativamente, las células pueden mantenerse a la densidad más alta para hacer crecer a las células a la densidad deseada para la producción de VAAr, ya sea en un matraz giratorio o en un biorreactor. En consecuencia, se espera una alta concentración celular, en ciertas realizaciones preferidas, para mejorar la productividad volumétrica de la producción de VAA recombinante.

El biorreactor puede contener cualquier volumen de medio, por ejemplo, un biorreactor de 10 L Wave puede contener hasta 5 L de volumen de trabajo. En ciertas realizaciones, el biorreactor puede ajustarse para oscilar a una velocidad y ángulo particulares. En ciertas otras realizaciones, el biorreactor puede incluir un dispositivo para controlar la tensión de oxígeno disuelto, tal como una sonda desechable de tensión de oxígeno disuelto (TOD). El biorreactor también puede incluir un dispositivo para controlar la temperatura en los medios. Otras realizaciones incluyen un dispositivo para medir y ajustar el pH del cultivo, tal como un mezclador de gas que puede ajustar el porcentaje de gas CO₂ suministrado a los medios. El biorreactor puede o no ser un biorreactor desechable.

Multiplicidad de infección (MDI)

Las células pueden infectarse con virus del herpes recombinante a una MDI combinada de entre 3 y 14 unidades formadoras de placa por célula (ufp/célula). Se observa un rendimiento de virus relativamente consistente con una MDI combinada a 6 ufp/célula o más. Los datos sugieren que las MDI combinadas entre 6 y 14 ufp/célula parecen ser el intervalo óptimo para la producción de VAAr en un cultivo de BHK en suspensión.

En realizaciones preferidas, la invención requiere coinfección de células con un vector VHSr deficiente en la replicación que proporciona funciones auxiliares para la producción de VAAr. La invención proporciona un sistema simplificado basado en VHSr para la producción de VAAr que utiliza dos o más vectores de VHSr deficientes en respuesta, incluido uno para la entrega de las funcionalidades rep y tapa de VAAr y uno para la administración del gen terapéutico (el gen de interés). Ventajosamente, la disponibilidad de vectores de VHSr defectuosos de replicación separados de la invención como se describe, hace posible modular las funcionalidades rep y tapa relativas al gen de interés, variando la MDI de coinfección. La relación óptima es 2:1, pero la producción de VAAr puede ocurrir con proporciones de 1:2 a 6:1 de VHSr-rep2tapaX y VHSr-GDI, respectivamente.

Densidad celular de infección

Las células se pueden cultivar a diversas concentraciones que incluyen, pero no se limitan a, al menos aproximadamente, a lo sumo aproximadamente, o aproximadamente 1×10^6 a 4×10^6 células/ml. Las células pueden entonces infectarse con el virus del herpes recombinante a una MDI predeterminada.

Nivel de nutrientes del medio

En ciertas realizaciones de la invención, las condiciones de infección comprenden el intercambio de medios en o aproximadamente de, pero no limitado a, las 2 horas posteriores a la infección. Los medios frescos son preferibles, pero no se limitan a, el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Hyclone) que carece de SFB.

5 Construcción y producción de vectores VHSr-1

Se construyó rHS V-rep2tapa2 (originalmente denominada d27.1-rc) como se describió previamente. Brevemente, VHSr-rep2tapa2 se construyó por recombinación homóloga de un casete de genes rep y tapa de VAA2 en el locus tk del vector d27.1 VHSr-1, eliminado por ICP27 en el que los genes rep y tapa de VAA2 están bajo el control de sus promotores nativos (p5, p19 y p40). El vector VHSr-rep2tapa1 se construyó como se describió anteriormente utilizando tapa1. En este procedimiento, se puede utilizar cualquier combinación de rep y tap.

El vector VHSr-VAA2/GFP (denominado VHSr-GFP) se construyó mediante recombinación homóloga de un casete del gen de resistencia a la neomicina hGFP impulsado por el promotor CMV, flanqueado por los RTI de VAA2, en el locus tk del vector d27.1 como se describió anteriormente.

En ciertas realizaciones, puede ser útil emplear sistemas de selección que impiden el crecimiento de células indeseables. Esto se puede lograr en virtud de la transformación permanente de una línea celular con un marcador seleccionable o mediante la transducción o infección de una línea celular con un vector viral que codifica para un marcador seleccionable. En cualquier situación, el cultivo de la célula transformada/transducida con un fármaco apropiado o compuesto selectivo, dará como resultado la mejora, en la población celular, de aquellas células que portan el marcador.

Los vectores VHSr-rep2tapaX y VHSr-GDI se propagaron en la línea celular complementaria ICP27 V27. V27 es un derivado de línea celular Vero que expresa ICP27 que alberga aproximadamente una copia del gen ICP27 por equivalente de genoma haploide. Los pasos de infección se realizaron en ausencia de suero. Los stocks de vectores se propagaron sembrando matraces T225 con 3×10^7 células V27, o en fábricas de células de 10 pilas con $1,5 \times 10^9$ células V27, seguido de infectar 24 h después de la siembra con VHSr-rep2tapaX o VHSr-GDI en una MDI de 0.15. Los vectores de VHSr se cosecharon a las 72 horas posteriores a la infección (h.p.i.) separando las células infectadas de los medios por centrifugación (10 min, 4°C, 1100 g). El sobrenadante se deja de lado mientras que el sedimento celular se trata con NaCl 0.6 M en una solución salina tamponada con fosfato 1X, pH 6.5, durante 30 minutos a 37°C. Las células luego se vuelven a sedimentar por centrifugación como se mencionó anteriormente. Este segundo sobrenadante se recombina con el primer sobrenadante (con el sedimento celular desechado), formulado con 5% (v/v) de glicerol estéril y se almacena a -80°C. Las reservas de vectores de VHSr-1 se utilizaron para la producción de VAAR sin manipulación adicional.

Ejemplo 2: BHK en suspensión (BHKs) propagación y caracterización celular, y producción de VAAR2 en células BHK en suspensión.

Producción de VAAR en dos clones de BHKs

Numerosas líneas celulares son capaces de producir altos rendimientos específicos de virus recombinantes adeno-asociados (VAAR) que utilizan el procedimiento de coinfección VHSr, como se describe en la Solicitud de EE.UU No. 11/503.775, que es una continuación en parte de la Solicitud de EE.UU. No. de serie 10/252.182, ahora patente de EE. UU. número 7,091,029, emitida el 15 de agosto de 2006. El clon 13 de células de riñón de hámster cachorro (BHK-21) y las células de riñón embrionario humano (HEK 293) producen los niveles más altos de VAAR particularmente en comparación a los procedimientos tradicionales de producción de VAAR (como se describe en el documento US2007202587 mencionado anteriormente). Se requieren grandes cantidades de vector VAA recombinante para la aplicación clínica, sin embargo, la naturaleza adherente de estas células es un impedimento para la producción a gran escala. Por lo tanto, las células que crecen en suspensión ofrecen una ventaja económica y de proceso para la producción de VAAR. En este ejemplo, se analizaron dos aislados independientes de células BHK-21 seleccionadas para crecer en suspensión para la producción de VAAR utilizando el procedimiento de coinfección de VHSr. Las células se cultivaron en matraces giratorios de acuerdo con las pautas recomendadas (mantenimiento entre 2×10^5 y $1,3 \times 10^6$ células/ml) y se infectaron con VHSr-rep2tapa2 y VHSr-GFP en una multiplicidad de infección (MDI) de 12 y 2. Comenzando 24 horas posteriores a la infección (hpi), se tomaron muestras de los cultivos infectados a intervalos de 24 horas. Las células se procesaron utilizando el procedimiento de lisis DOC (véase Procedimientos). Los rendimientos específicos de partículas infecciosas (pi) por célula (pi/célula) se determinaron mediante el ensayo de infectividad de células verdes. El rendimiento combinado de VAAR2-GFP asociado a las células y liberado (medio) para cada aislado de suspensión BHK (BHKs) en cada punto de tiempo se presenta en la **Figura 1**. Los aislamientos C13-2P y AC9 produjeron niveles de VAAR similares a las líneas celulares adherentes examinadas previamente 3800 y 1200 pi/célula por 48 hpi, respectivamente, descritas en el documento US2007202587, titulado Recombinant AAV Production in Mammalian Cells, presentado el 14 de agosto de 2007, que es una continuación en parte de la Solicitud de EE. UU. 10/252.182, titulada High Titer Recombinant AAV Production, presentada el 23 de septiembre de 2002, ahora Patente de EE.UU No. 7.091.029, emitida el 15 de agosto de 2006.

Crecimiento de células BHK en suspensión

Se seleccionó el clon C13-2P (denominado en este momento "BHKs") para experimentos adicionales debido al alto nivel de producción de VAAr. El crecimiento de estas células se caracterizó aún más. Las células se mantienen entre 2×10^5 y $1,3 \times 10^6$ células/ml en DMEM complementado con 10% de SFB. Numerosos viales de células BHKs se han descongelado. Específicamente, 33 viales que representan 6 bancos de células han sido descongelados y propagados con un tiempo de duplicación promedio de 11,9 +/- 1,9 horas (una variación del 16.3%). En comparación, las células 293 adherentes tienen un tiempo de duplicación de ~22-24 horas. Por lo tanto, la duplicación más rápida de las células BHKs proporciona la ventaja de una amplificación más rápida para el aumento en escala.

10 **Ejemplo 3. Producción de VAAr a lo largo del tiempo**

El tiempo de cosecha óptimo de la producción de VAAr en células 293 adherentes es de 48-72 hpi. Debido a la tasa de crecimiento más rápida de las células BHKs, queríamos volver a examinar el intervalo de tiempo óptimo para la producción de VAAr en la plataforma de suspensión. El experimento que se muestra en la **Figura 2** demostró que los niveles de producción de VAAr son similares cuando se cosechan entre 24 y 69 horas posteriores a la infección (hpi). La capacidad de lograr rendimientos de VAAr similares a las 24 hpi como en tiempos posteriores ofrece las ventajas de tiempos de fabricación más cortos y flexibilidad en los horarios de fabricación.

15 **Ejemplo 4. Densidad celular en la infección.**

Los primeros experimentos con BHKs que examinan los niveles de producción de VAAr se realizaron con las células infectadas a densidades entre $4,5 \times 10^1$ y 1×10^6 células/ml, densidades que se encuentran dentro del intervalo utilizado para el mantenimiento rutinario de las células.

Sin embargo, los inventores encontraron que se podían alcanzar fácilmente densidades más altas. Este ejemplo abordó si los rendimientos específicos de VAAr podrían mantenerse sobre la coinfección de VHSr cuando las células están en una densidad más alta. Se examinaron las densidades celulares entre $1,6 \times 10^6$ y $3,8 \times 10^6$ células/ml, a una escala de 25 ml, para la producción de VAAr. Los resultados en la **Figura 3** demostraron que aumentar la densidad celular BHKs en el momento de la infección no perjudica los rendimientos específicos (por rendimiento celular) de VAAr. La productividad volumétrica (PRA/L) es directamente proporcional a la densidad celular BHKs con un rendimiento específico constante, por lo tanto, PRA/lote total se puede aumentar aumentando la densidad celular mientras se minimiza el volumen final requerido para lograr cantidades clínicamente relevantes del vector terapéutico.

25 **Ejemplo 5. Multiplicidad de infección**

El procedimiento de coinfección con VHSr produce niveles óptimos de VAAr recombinante en células adherentes cuando se utilizan VHSr-rep2tapaX y VHSr-GDI a MDI de 12 y 2, respectivamente. Los niveles de producción caen precipitadamente a medida que cae la MDI de VHSr-rep2tapaX. El uso de una MDI de 12 para VHSr-rep2tapaX se traduce en cantidades muy grandes de virus recombinante requeridas cuando se considera la fabricación a gran escala de VAAr. Este ejemplo abordó si la MDI de VHSr-rep2tapaX en coinfecciones en células BHKs, a diferencia de las células 293, podría reducirse sin una pérdida significativa del rendimiento específico. Los resultados en la **Figura 4** son los datos acumulativos de varios experimentos que examinan los niveles de producción de VAAr cuando VHSr-rep2tapa2 se utiliza con una MDI de 4 a 12 (con la MDI de VHSr-GDI manteniéndose constante en 2).

Los resultados en la **Figura 5** son los datos acumulativos de varios experimentos que examinan los niveles de producción de VAAr cuando se utiliza VHSr-rep2tapal con una MDI de 1 a 12. La producción de VAAr1-AAT en células BHKs también fue insensible a la MDI de VHSr-rep2tapal de 12, 8 y 4; sin embargo, los rendimientos de VAAr1-AAT cayeron de acuerdo con otras reducciones en la MDI de VHSr-AAT a 2 y 1.

En conjunto, estos resultados demuestran que se puede lograr una producción comparable de VAAr en una amplia gama de MDI para VHSr-rep2tapaX.

30 **Ejemplo 6. Aplicabilidad del sistema a diferentes serotipos de VAAr y diferentes transgenes.**

En ciertas realizaciones de la invención, un segundo herpesvirus recombinante comprende un gen de interés y un promotor unido operativamente a dicho gen de interés. El gen de interés puede ser un gen terapéutico que sea útil para aplicaciones de terapia génica. Este ejemplo demuestra que el sistema BHKs para producir vectores VAAr puede utilizarse para una variedad de serotipos de VAA, así como para diferentes transgenes y escalas de producción. La **Figura 6A** muestra los rendimientos de diferentes serotipos y transgenes utilizados en el sistema BHKs. La **Figura 6B** muestra las relaciones PRA a infectividad de muestras representativas de la **Figura 6A**. Las diferencias entre los serotipos reflejan su variación de infectividad in vitro en el tipo de célula utilizado para el ensayo de infectividad.

35 **Ejemplo 7. Producción de VAAr en células BHK en suspensión en biorreactores.**

Inicialmente, la producción de BHKs VAAr2-GFP se escaló a reactores de tanque en agitación continua (RTAC) Celligen Plus en DMEM suplementado con 5% de SFB. El punto de ajuste de pH fue de 7.2, el punto de ajuste de oxígeno disuelto (O.D.) fue de 50% de saturación de aire, y el punto de ajuste de agitación, utilizando impulsores marinos, fue de 100 rpm, en un volumen de trabajo de 3.5 L, recipiente de vidrio con camisa de volumen total de 5.0 L equipado con filtros giratorios para la retención celular. Los reactores se sembraron entre $1,3-2,5 \times 10^5$ células/ml y crecieron a $1,2-1,4 \times 10^6$ células/ml y se coinfectaron con VHSr-rep2tapa2 (MDI de 12) y VHSr-GFP (MDI de 2) para producir VAAr2-GFP. La **Figura 7** muestra los resultados. Los medios se intercambiaron 2 hpi por DMEM que carecía de SFB, mediante filtración de flujo tangencial utilizando un dispositivo de filtro de fibra hueca para la retención de células. La operación se repitió (como se describió anteriormente) y la **Figura 8** muestra resultados similares.

La producción de VAAr también se escaló a 1 L/2 L (volumen de trabajo/volumen total) en biorreactores desechables Wave. El punto de ajuste del pH fue de 7.2, la tasa de agitación fue de 20 rocas/min, el ángulo de balanceo fue de 7° y el flujo de gas total varió entre 0,1 y 0,3 L/min. Los biorreactores se sembraron con un volumen inicial de 1,0 L a una densidad de $1,0-2,5 \times 10^5$ células/ml. Las células se cultivaron en lotes alimentados (operación 1, 2, 3) o perfusión (operación 4, 5) para evitar el agotamiento de nutrientes, y el crecimiento celular previo a la infección en función del tiempo en biorreactores desechables Wave 1L/2L se muestra en la **Figura 9**. El tiempo de duplicación promedio fue de 13,5 h. Las operaciones de lotes alimentados tenían un bolo de DMEM 5X agregado a 25-52 hps, y la alimentación de operaciones de perfusión con DMEM inició 29-42 hps, para prevenir el agotamiento de nutrientes según sea necesario. Las operaciones 1, 2 y 3 se coinfectaron con VHSr-rep2tapal (MDI de 12) y VHSr-AAT (MDI de 2) para producir VAAr1-AAT, y dieron como resultado una productividad específica de 75.600 PRA/célula. Los resultados se muestran en la **Figura 10** (punto de datos de escala de 1 L, n=3). La operación 5 se coinfectó con los mismos vectores, pero a una MDI de 4 y 2, respectivamente, según los datos del matraz que mostraron que la producción de VAAr1-AAT era insensible a la MDI de VHSr-rep2tapa1 entre 4 y 12 y resultó en 19,252 PRA/célula por 24 hpi. Las densidades celulares máximas para las series de alimentación por lotes fueron entre $1,6 \times 10^6$ y $2,3 \times 10^6$ células/ml, mientras que las series de perfusión alcanzaron una densidad máxima de $1,2 \times 10^7$ células/ml a un volumen no constante, antes de la infección, como se muestra en la **Figura 9**. El intercambio de medio previo a la infección se realizó mediante centrifugación para operaciones de lotes alimentados. La **Figura 11** muestra las concentraciones típicas de metabolitos para operaciones alimentadas con 1 L Wave. La **Figura 12** muestra las concentraciones de metabolitos para una operación de perfusión típica de 1 L.

La producción por lotes de BHKs VAAr también se escaló a volúmenes de cultivo de 5 y 10 L en 10 L/20 L (volumen de trabajo/volumen total) en biorreactores Wave utilizando VHSr-rep2tapal a una MDI de 4 y un VHSr-AAT a una MDI de 2. Las células se cultivaron como en cultivos de biorreactor Wave de 1 L, con (10 L) o sin intercambio de medio (5 L y 10 L). Los cultivos de intercambio de medio crecieron a densidades celulares terminales más altas ya que los nutrientes se reponían. Las densidades de células terminales con intercambio de medio durante el crecimiento alcanzaron $3,1 \times 10^6$ células/ml antes de la infección, mientras que $2,3 \times 10^6$ células/ml se lograron sin intercambio de medio durante el crecimiento. La **Figura 13** muestra un cultivo típico de biorreactor desechable Wave de 5 L sin intercambio de medio que dio como resultado una densidad celular previa a la infección de $2,3 \times 10^6$ células/ml. La **Figura 10** muestra la producción de VAAr1-AAT para 5 L de volumen de cultivo (punto de datos 2, n=4) y 10 L (punto de datos 3, n=6) en operaciones del biorreactor Wave, y demuestra que la productividad específica (PRA/célula) se mantuvo durante la escala de 1 L a 10 L de producción de VAAr en células adaptadas a la suspensión. La **Figura 14** es una gráfica que muestra el crecimiento típico de células BHKs en la escala de volumen de cultivo de 10 L en una operación de biorreactor Wave que da como resultado tiempos de duplicación promedio de 13,1 h. La **Figura 14** demuestra que las tasas de crecimiento de las células en el matraz giratorio y en el biorreactor Wave 1 L se escalaron con éxito a volúmenes de producción de biorreactor Wave de 10 L mientras se mantenían tasas de crecimiento similares sin inhibición de la acumulación de amonio (Christie, A. and Butler, M.; 1999, The adaptation of BHK cells to a non-ammoniogenic glutamate-based culture medium. *Biotechnol Bioeng* 64, 298-309).

En conjunto, los resultados presentados en la presente memoria describen un procedimiento escalable para producir partículas virales de VAA recombinantes en una célula de mamífero capaz de crecer en suspensión.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de partículas virales de VAA recombinantes en una célula BHK que crece en suspensión, que comprende:

5 coinfectar una célula BHK que crece en suspensión con (i) un primer virus del herpes simplex recombinante, deficiente en la replicación que comprende un ácido nucleico que codifica para un gen rep de VAA y un gen tapa de VAA cada uno operativamente vinculado a un promotor; y (ii) un segundo virus del herpes simplex recombinante deficiente en la replicación que comprende un ácido nucleico que codifica para un gen de interés operativamente vinculado a un promotor, estando dicho ácido nucleico flanqueado por las secuencias repetidas terminales invertidas del VAA,

10 en el que las células se infectan con el primer VHSr y el segundo VHSr en una proporción de 1:2 a 6:1, para una MDI combinada de entre 3 y 14, produciendo así partículas virales recombinantes de VAA en una célula BHK,

 en el que el número de partículas virales producidas es igual o mayor que el número de partículas virales cultivadas en un número igual de células BHK bajo condiciones adherentes.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el gen de interés es un gen terapéutico.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el gen terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un gen antiangiogénico, alfa-1 antitripsina, retinosquisina, ácido alfa glucosidasa, RPE65, subunidad beta del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGB3), subunidad alfa del cono fotorreceptor cGMP- canal cerrado (CNGA-3), subunidad alfa de la proteína G del cono fotorreceptor (GNAT2), pigmento retinal específico del epitelio de 65 kDa (PRE65), retinosquiasis juvenil ligada a X (RS1), factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor neurotrófico derivado de células gliales (FNDC), distrofia miotónica de la proteína quinasa (DMPK), dedo de zinc tipo CCHC, proteína de unión a ácido nucleico (conocida como CNBP o ZNF9), regulador de la retinitis pigmentosa GTPasa (RRPG), α -glucosidasa ácida (AGA), coroidermia (CHM), proteína de escolta Rab-1 (PER1), alfa-sinucleína (SNCA), factor de coagulación VIII , componente procoagulante (hemofilia A ó F8), factor de coagulación IX (componente trombotrófico plasmático, enfermedad de Navidad, hemofilia B ó F9), receptor de hidrocarburo arilo que interactúa con la proteína tipo-1 (AIPL1), inhibidor ligado a X de la proteína de apoptosis (IXPA), clarina-1 (CLRN1), genes de la neuropatía hereditaria de Leber (MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L y MT-ND6), alfa-galactosidasa A (a-Gal A) o alfa-L-iduronidasa

25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el gen tapa de VAA tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste en VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7, y VAA-8, VAA-9 y rh- VAA- 10.

30

Figura 1

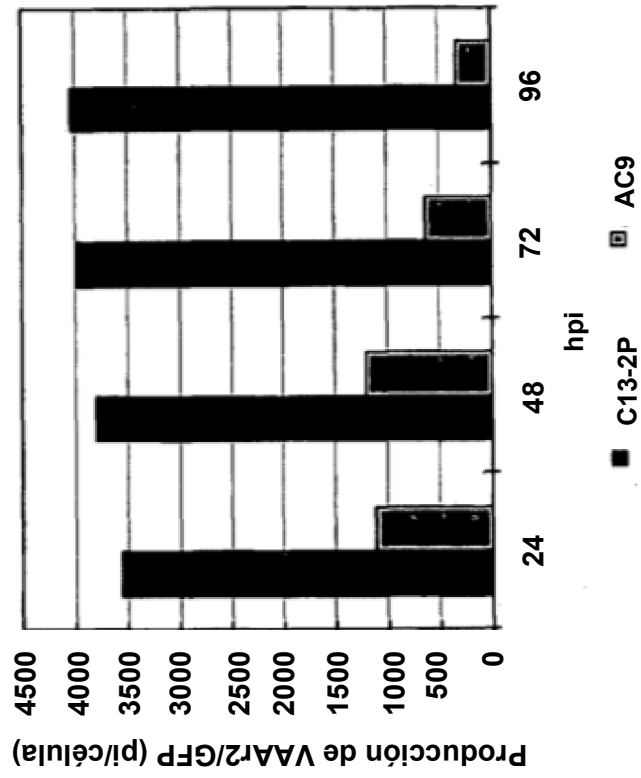


Figura 2

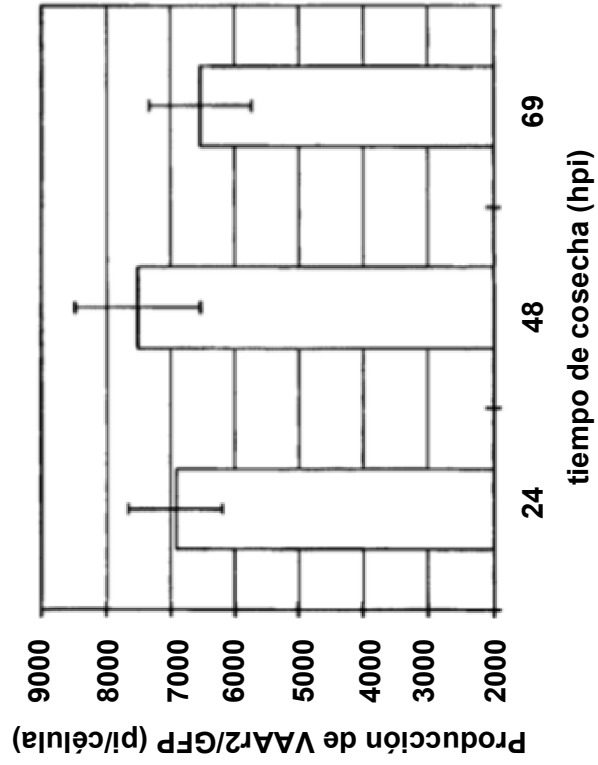


Figura 3

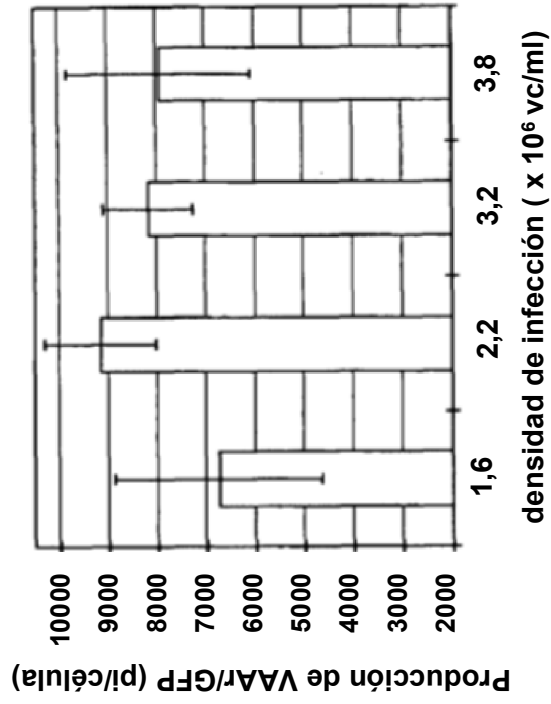


Figura 4

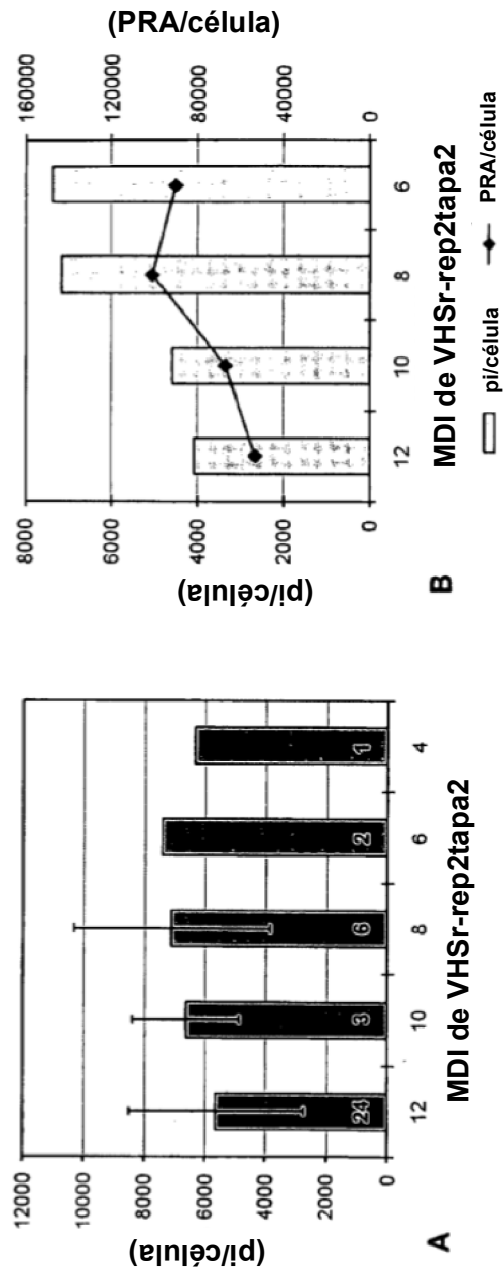


Figura 5

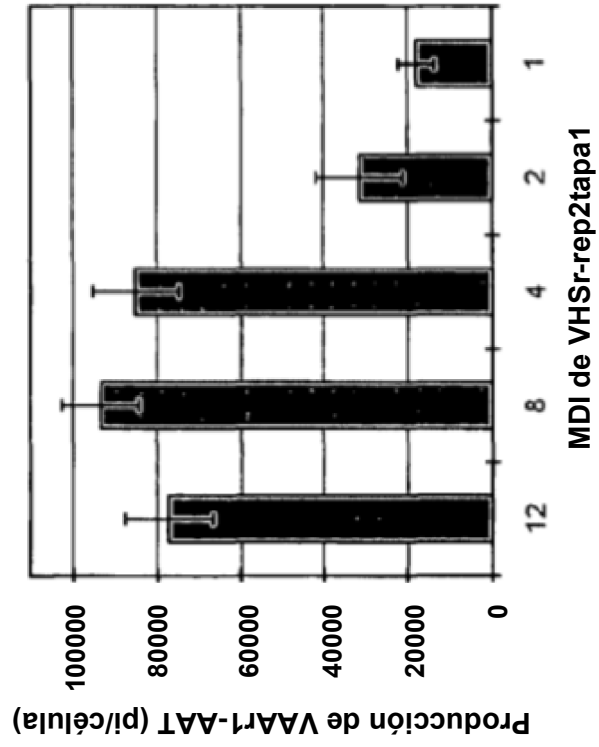


Figura 6

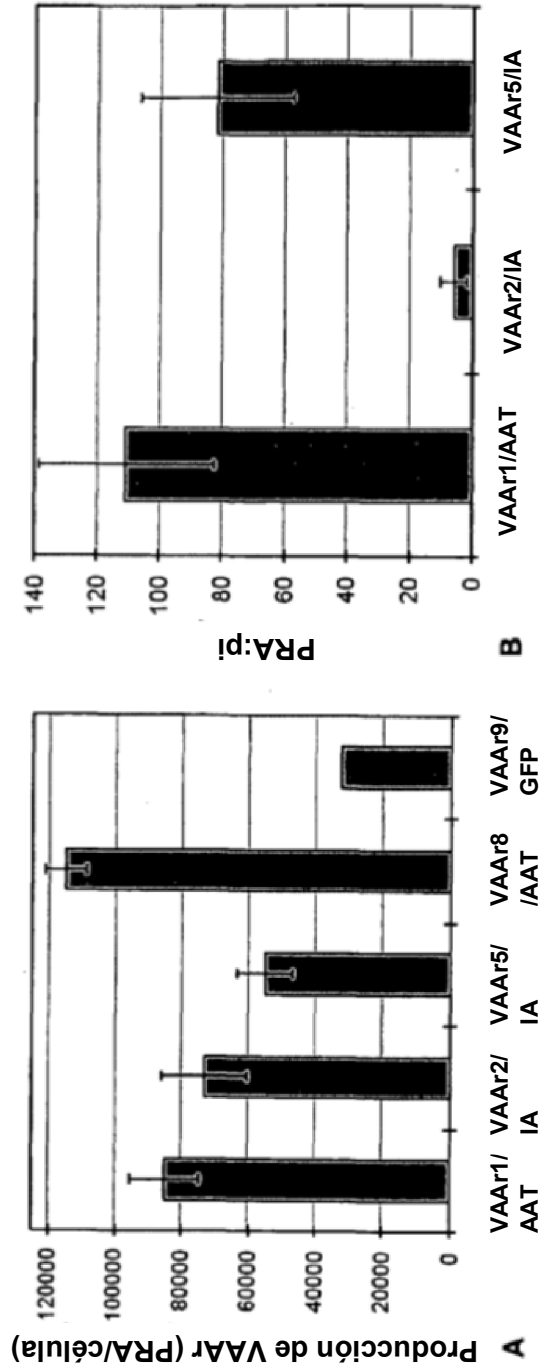


Figura 7

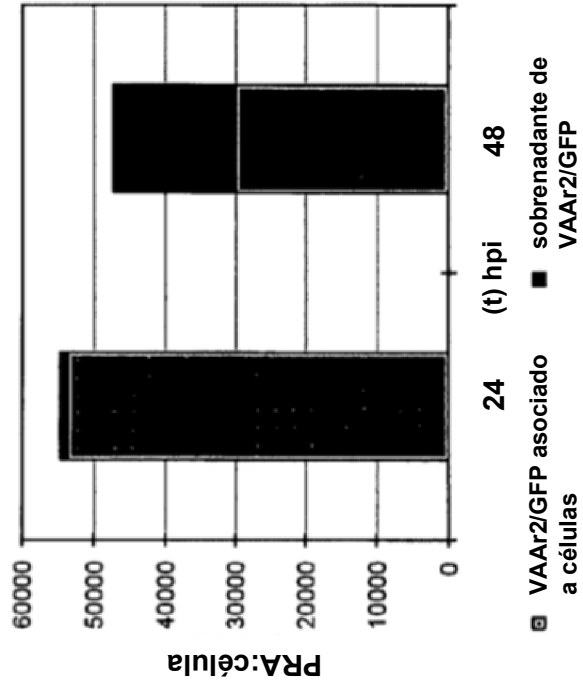


Figura 8

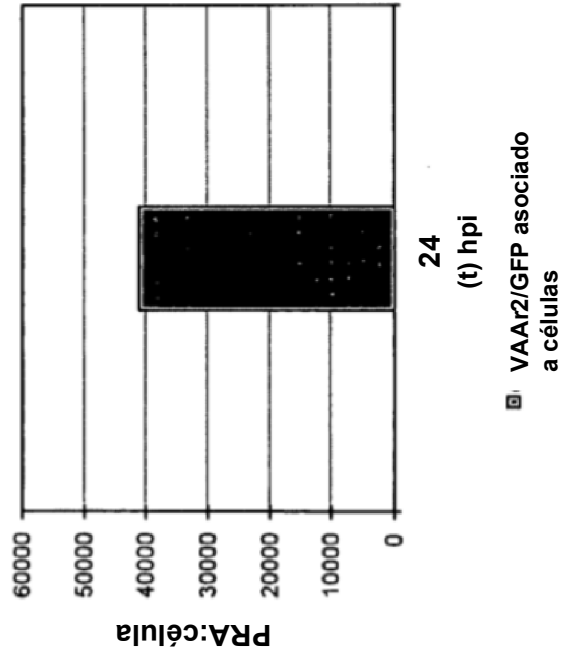


Figura 9

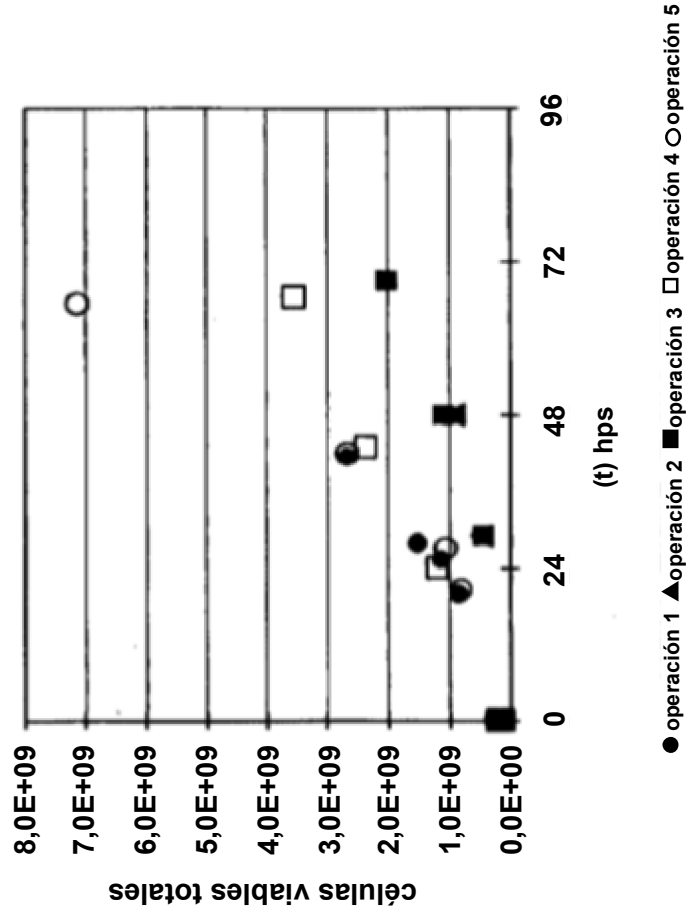


Figura 10

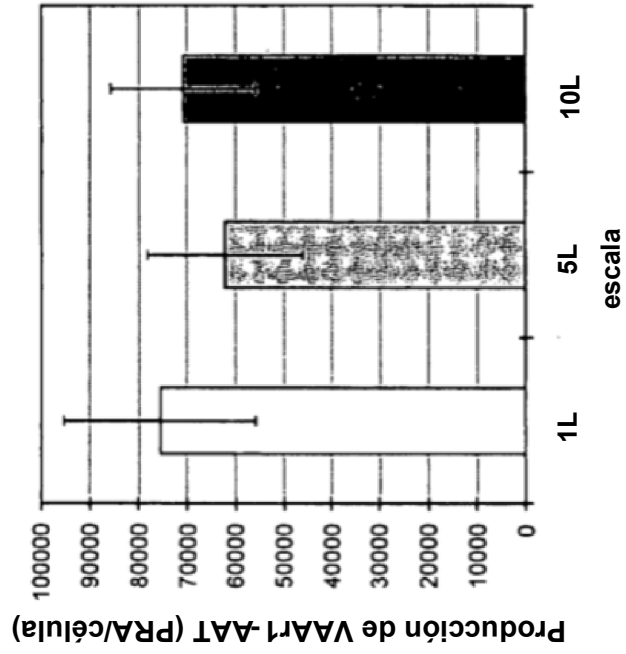


Figura 11

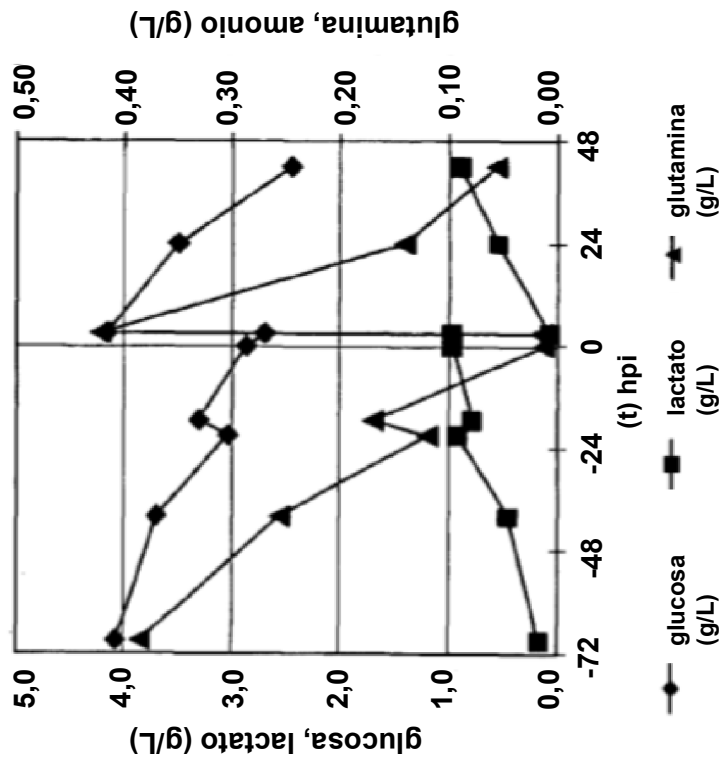


Figura 12

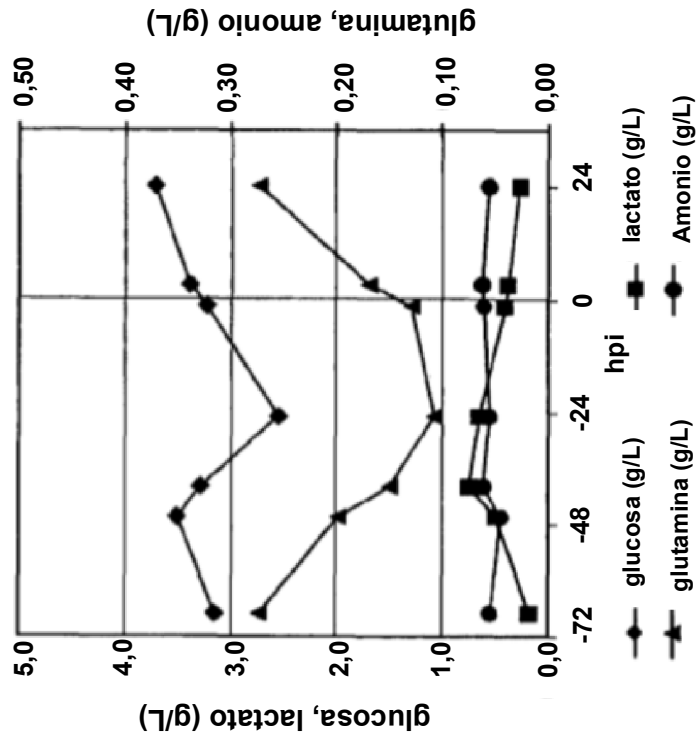


Figura 13

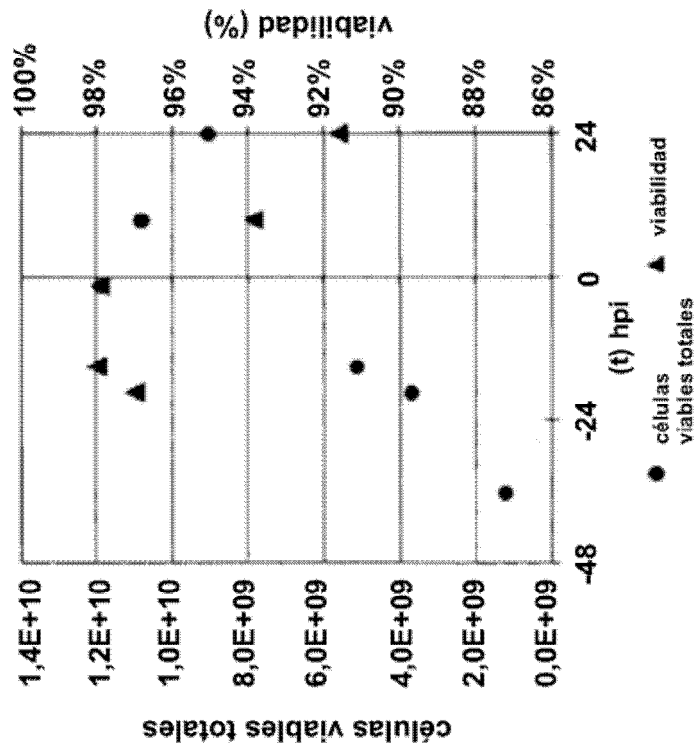


Figura 14

