

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1998.09.04	(73) Titular(es): GENZYME CORPORATION 500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142 US
(30) Prioridade(s): 1997.09.05 US 925815 1998.01.16 US 71733 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.07.16	(72) Inventor(es): EDWARD MORROW ATKINSON US VICTOR P. FUNG US PERRY C. WILKINS US RYAN K. TAKEYA US THOMAS C. REYNOLDS US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.10.21 018/2016	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE ALTO TÍTULO DE VETORES AAV RECOMBINANTES DESPROVIDOS DE ADJUVANTES**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO FORNECE MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE ALTO TÍTULO, DE PREPARAÇÕES SUBSTANCIALMENTE PURIFICADAS DE VÍRUS ADENO-ASSOCIADOS (AAV) RECOMBINANTES QUE PODEM SER USADOS COMO VETORES PARA ENTREGA GENÉTICA. NO COMEÇO DA PRODUÇÃO DE VETORES, AS CÉLULAS PRODUTORAS DE AAV DESTA INVENÇÃO TIPICAMENTE COMPREENDEM UM TRANSGENE HETERÓLOGO (I.E., NÃO-AAV) DE INTERESSE, E UM VÍRUS ADJUVANTE TAL COMO UM ADENOVÍRUS. AS PREPARAÇÕES DE VETORES AAV PRODUZIDAS SÃO GERALMENTE INCOMPETENTES PARA REPLICAÇÃO MAS SÃO CAPAZES DE MEDIAR A ENTREGA DE UM TRANSGENE DE INTERESSE (TAL COMO UM GENE TERAPÊUTICO) A UMA GRANDE VARIEDADE DE TECIDOS E CÉLULAS. AS PREPARAÇÕES DE VETORES AAV PRODUZIDAS DE ACORDO COM ESTA INVENÇÃO SÃO TAMBÉM SUBSTANCIALMENTE LIVRES DE VÍRUS ADJUVANTES ASSIM COMO DE PROTEÍNAS VÍRICAS E CELULARES ADJUVANTES E OUTROS CONTAMINANTES. TAMBÉM AQUI FORNECIDO ESTÁ UM ENSAIO QUANTITATIVO, DE ALTO RENDIMENTO, ÚTIL NA AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE VIRAL E REPLICAÇÃO, ASSIM COMO NO RASTREIO DE AGENTES QUE AFETAM A INFECCIOSIDADE VIRAL E/OU REPLICAÇÃO.

RESUMO

"MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE ALTO TÍTULO DE VETORES AAV RECOMBINANTES DESPROVIDOS DE ADJUVANTES"

Esta invenção fornece métodos e composições para a produção de alto título, de preparações substancialmente purificadas de vírus adeno-associados (AAV) recombinantes que podem ser usados como vetores para entrega genética. No começo da produção de vetores, as células produtoras de AAV desta invenção tipicamente compreendem um transgene heterólogo (i.e., não-AAV) de interesse, e um vírus adjuvante tal como um adenovírus. As preparações de vetores AAV produzidas são geralmente incompetentes para replicação mas são capazes de mediar a entrega de um transgene de interesse (tal como um gene terapêutico) a uma grande variedade de tecidos e células. As preparações de vetores AAV produzidas de acordo com esta invenção são também substancialmente livres de vírus adjuvantes assim como de proteínas víricas e celulares adjuvantes e outros contaminantes. Também aqui fornecido está um ensaio quantitativo, de alto rendimento, útil na avaliação da infecciosidade viral e replicação, assim como no rastreio de agentes que afetam a infecciosidade viral e/ou replicação.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE ALTO TÍTULO DE VETORES AAV RECOMBINANTES DESPROVIDOS DE ADJUVANTES"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se geralmente com o campo de vetores virais adeno-associados (AAV) recombinantes e preparações relacionadas que podem ser usadas para transferência genética. Mais especificamente, relaciona-se com métodos de produção de preparações de alto título de vetores AAV recombinantes que são substancialmente desprovidos de vírus adjuvantes (p.ex., adenovírus) assim como de proteínas celulares.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Vírus adeno-associados (AAV) possuem propriedades únicas que os tornam atrativos enquanto vetores para terapia genética. Vírus adeno-associados infetam uma grande variedade de tipos celulares. Contudo, eles são não-transformantes, e não estão implicados na etiologia de qualquer doença humana. A introdução de DNA nas células recetoras do hospedeiro geralmente conduz a uma persistência e expressão a longo-prazo do DNA sem afetar o normal metabolismo da célula.

Existem pelo menos três propriedades desejáveis de uma preparação de um vetor AAV recombinante para uso em transferência genética, especialmente em terapia genética humana. Primeiro, é preferível que o vetor seja produzido a títulos suficientemente elevados para transduzir uma

proporção efetiva de células no tecido-alvo. A terapia genética *in vivo* tipicamente requer um elevado número de partículas virais. Por exemplo, alguns tratamentos podem requerer um excesso de 10^8 partículas, e o tratamento de fibrose cística por entrega direta às vias respiratórias pode requerer um excesso de 10^{10} partículas. Segundo, é preferível que as preparações dos vetores sejam essencialmente livres de AAV competentes para replicação (i.e., AAV fenotipicamente *wild-type* que podem ser replicados na presença de vírus adjuvantes ou funções víricas adjuvantes). Terceiro, é preferível que a preparação de vetores rAAV na sua totalidade seja essencialmente desprovida de outros vírus (tal como um vírus adjuvante usando na produção de AAV) assim como um vírus adjuvante e proteínas celulares, e outros componentes tais como lípidos e hidratos de carbono, de forma a minimizar ou eliminar qualquer risco de produção de uma resposta imune no contexto de terapia genética. Este último ponto é especialmente significativo no contexto de AAV porque AAV é um vírus "dependente de adjuvantes" que requer co-infecção com um vírus adjuvante (tipicamente adenovírus) ou outra provisão de funções víricas adjuvantes de forma a serem efetivamente replicados e empacotados durante o processo de produção de AAV; e, além do mais, tem sido observado que AAV produzem uma resposta imune no hospedeiro no contexto de aplicações em terapia genética (ver, p.ex., Byrnes et al., *Neuroscience* 66:1015, 1995; McCoy et al., *Human Gene Therapy* 6:1553, 1995; and Barr et al., *Gene Therapy* 2:151, 1995). Os métodos da presente invenção abordam estas e outras propriedades desejáveis de preparações de vetores rAAV, como abaixo descrito e ilustrado em detalhe.

Revisões gerais da virologia e genética de AAV estão disponíveis noutras fontes. O leitor pode referir-se *inter*

alia a Carter, "Handbook of Parvoviruses", Vol. I, pp. 169-228 (1989), e Berns, "Virology", pp. 1743-1764, Raven Press, (1990). O que se segue é uma breve sinopse para a conveniência do leitor. AAV é um vírus defetivo para replicação, o que significa que depende de um vírus adjuvante de forma a completar a sua replicação e o seu mecanismo de empacotamento numa célula do hospedeiro. O genoma de AAV geralmente compreende os genes associados ao empacotamento *rep* e *cap*, com outras funções necessárias a serem fornecidas *in trans* pelo vírus adjuvante da célula hospedeira.

As partículas de AAV são compostas por uma cápside proteica possuindo três proteínas de cápside, VP1, VP2 e VP3, que englobam um genoma de DNA de cadeia simples linear de ~4,6 kb. As partículas individuais empacotam apenas uma cadeia molecular de DNA, mas esta tanto pode ser a cadeia líder como a molde. Partículas contendo ambas as cadeias são infecciosas, e a replicação ocorre pela conversão da cadeia simples infecciosa parental numa forma de cadeia dupla, e subsequente amplificação, através da qual cadeias simples da progenia são deslocadas e empacotadas em cápsides. Cópias de cadeias simples ou duplas de genomas de AAV (muitas vezes referidas como "DNA provírico" ou "provírus") podem ser inseridas em plasmídeos bacterianos ou fagomídeos, e transfetadas em células infetadas por adenovírus.

Por meio de ilustração, o genoma linear do serótipo AAV2 é terminado em ambas as extremidades por uma sequência de repetição terminal invertida (ITR). Entre as ITRs encontram-se três promotores de transcrição p5, p19 e p40 que são usados para expressar os genes *rep* e *cap* (Laughlin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5567-5571). As

sequências ITR são necessárias em *cis* e são suficientes para fornecer uma origem funcional de replicação, integração no genoma da célula, e eficiente excisão e resgate dos cromossomos das células do hospedeiro e plasmídeos recombinantes. Os produtos genéticos *red* e *cap* fornecem funções para replicação e empacotamento do genoma viral, respectivamente, e são suficientes para eles estarem presentes em *trans*.

O gene *rep* é expresso a partir de dois promotores, p5 e p19, e produz quatro proteínas designadas de Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40. Apenas Rep78 e Rep68 são requeridos para a replicação de DNA de cadeia dupla de AAV, mas Rep52 e Rep40 aparentam ser necessários para a progenia, acumulação de DNA de cadeia simples (Chejanovsky et al., *Virology* 173:120, 1989). Rep68 e Rep78 ligam-se especificamente à conformação *hairpin* do ITR de AAV e possuem várias atividades enzimáticas necessárias para efetivar a replicação na sequência de terminação AAV. Rep78 e Rep68, também exibem atividade regulatória pleiotrópica incluindo regulação positiva e negativa de genes de AAV e expressão de alguns promotores heterólogos, assim como efeitos inibitórios no crescimento celular. O gene *cap* codifica as proteínas da cápside VP1, VP2 e VP3. Estas proteínas partilham uma sequência comum de sobreposição, mas VP1 e VP2 contêm adicionalmente sequências terminais amino transcritas do promotor p40 através do uso de códons de iniciação alternativos. Todas as três proteínas são requeridas para a produção efetiva da cápside.

Os genomas de AAV foram introduzidos em plasmídeos bacterianos por procedimentos tais como adição de caudas (tailing) guanina-citosina (GC) (Samulski et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2077-2081), adição de

agentes de ligação sintéticos contendo locais de clivagem para endonucleases de restrição (Laughlin et al., 1983, *Gene*, 23:65-73) sejam eles por ligação a extremidades coesivas, ou por ligação a extremidades abruptas (Senapathy & Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666). A transfeção de tais plasmídeos recombinantes de AAV em células mamárias com um vírus adjuvante apropriado resulta no resgate e excisão de um genoma de AAV livre de qualquer sequência de plasmídeo, replicação do genoma resgatado e produção de partículas de AAV infecciosas da progenia.

Vetores de AAV recombinantes compreendendo um polinucleótido heterólogo de interesse terapêutico podem ser construídos através da substituição de porções da sequência codificante de AAV em plasmídeos bacterianos com o polinucleótido heterólogo. Princípios gerais da construção de vetores rAAV são também revisados noutras fontes. Ver, p.ex., Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 3:533-539; e Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbiol. and Immunol.*, 158:97-129). Os ITRs de AAV são geralmente retidos, uma vez que o empacotamento dos vetores requer que estes estejam presentes em *cis*. Contudo, outros elementos do genoma de AAV, em particular, um ou mais dos genes associados ao empacotamento, podem estar omissos. O vetor plasmídico pode ser empacotado numa partícula AAV através do fornecimento de genes associados ao empacotamento omitidos em *trans* via uma fonte alternativa.

Numa abordagem, a sequência compreendida entre os ITRs de AAV (a sequência do vetor rAAV) e os genes de AAV associados ao empacotamento a serem fornecidos em *trans*, são introduzidos na célula hospedeira em plasmídeos bacterianos separados. Exemplos desta abordagem são descritos em Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072

(1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); e Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828) descreveram um plasmídeo associado ao empacotamento designado por Paav/Ad, que consiste em regiões codificantes para *Rep* e *Cap* compreendidas por ITRs de adenovírus. Células epiteliais da via respiratória humana de um paciente com fibrose cística foram transduzidas com um vetor AAV preparado usando o plasmídeo pAAV/Ad associado ao empacotamento e um plasmídeo compreendendo um gene marcador seletivo *neo* expresso via promotor p5 AAV (Flotte et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349, 1992).

Uma segunda abordagem é fornecer ou a sequência do vetor, ou os genes AAV associados ao empacotamento, na forma de um plasmídeo episomal numa célula mamária usada para a replicação de AAV. Por exemplo, a patente U.S. 5,173,414 descreve uma linha celular na qual a sequência do vetor se encontra presente na forma de um plasmídeo episomal com elevado número de cópias. As linhas celulares podem ser transduzidas com as funções AAV trans-complementares *rep* e *cap* para produzir preparações do vetor AAV. Esta abordagem não é ideal, uma vez que o número de cópias por célula não pode ser rigorosamente controlado e o DNA episomal é muito mais provável de ser sujeito a rearranjo, levando à produção de subprodutos do vetor.

Uma terceira abordagem é fornecer ou a sequência do vetor, ou os genes AAV associados ao empacotamento, ou ambos, estavelmente integrados no genoma de uma célula mamária usada para replicação.

WO 97/09441 divulga vetores para terapia genética. Tamayose et al., *Human Gene Therapy*, 7:507:513 (1996) divulga uma estratégia para a preparação em larga-escala e de alto título de vetores AAV recombinantes através do uso de linhas celulares associadas ao empacotamento e cromatografia em coluna com celulose sulfonada. WO 97/06243 divulga a purificação cromatográfica de adenovírus e AAV.

Uma técnica exemplificativa é descrita no pedido de patente internacional WO 95/13365 (Targeted Genetics Corporation and Johns Hopkins University) e a correspondente Patent U.S. No. 5,658,776 (por Flotte et al.). Este exemplo usa uma célula mamária com pelo menos uma cópia intacta de um vetor rAAV estavelmente integrado, onde o vetor compreende um ITR AAV e um promotor de transcrição ligado operacionalmente ao polinucleótido-alvo, mas onde a expressão de *rep* é limitativa. Numa forma de realização preferencial, um plasmídeo de AAV associado ao empacotamento compreendendo o gene *rep* operacionalmente ligado a um AAV heterólogo é introduzido na célula, e então a célula é incubada sob condições que permitem a replicação e o empacotamento da sequência do vetor AAV em partículas.

Uma segunda técnica exemplificativa é descrita no pedido de patente WO 95/13392 (Trempe et al.). Este exemplo usa uma linha celular mamária estabelecida com um gene *rep* AAV operacionalmente ligado a um promotor heterólogo de forma a ser capaz de expressar uma proteína *Rep* funcional. Em várias formas de realização preferenciais, o gene *cap* AAV pode também ser fornecido estavelmente ou transientemente (p.ex, num plasmídeo). Um vetor AAV recombinante pode também ser introduzido estavelmente ou transientemente.

Outra técnica exemplificativa é descrita no pedido de patente WO 96/17947 (por Targeted Genetics Corporation. J. Allen). Este exemplo usa uma célula mamária que compreende um gene *cap* AAV estavelmente integrado, e um gene *rep* AAV estavelmente integrado que está operacionalmente ligado a um promotor heterólogo e induzível por um vírus adjuvante. Em várias formas de realização preferenciais, um plasmídeo compreendendo a sequência do vetor é também introduzida nas células (seja estavelmente ou transientemente). O resgate de partículas do vetor AAV é então iniciada através da introdução de um vírus adjuvante.

Estes diversos exemplos focam a importância de fornecer AAV a títulos suficientemente elevados, minimizando a recombinação entre vetor e componentes de empacotamento, e reduzindo ou evitando as potenciais dificuldades associadas com a expressão do gene *rep* AAV em linhas celulares mamárias (uma vez que as proteínas Rep podem não apenas limitar a sua expressão mas também afetar o metabolismo celular). Contudo, o empacotamento de um vetor AAV em partículas víricas ainda depende da presença de um vírus adjuvante adequado para AAV ou do fornecimento de funções víricas adjuvantes. Exemplos de vírus adjuvantes capazes de suportar a replicação de AAV são os adenovírus, mas incluem outros vírus tais como herpesvírus e poxvírus. A presença de quantidades significativas de vírus adjuvantes infecciosos numa preparação de vetores AAV é problemática no sentido de que a preparação tem como objetivo ser usada para administração humana. Mesmo a presença de componentes de vírus adjuvantes não-replicativos pode causar uma reação imunológica inaceitável no paciente em tratamento.

Os potenciais problemas despoletados por antigénios víricos adjuvantes têm sido ilustrados em vários estudos recentes. Byrnes et al. (Neuroscience 66:1015, 1995) injetou um

adenovírus tipo 5 humano não-replicativo, com uma região E1 deletada, no cérebro de ratinhos consanguíneos. Uma resposta inflamatória foi observada que foi atribuída às partículas administradas em vez da expressão de novas proteínas víricas resultantes da infecção vírica das células. A presença do vírus foi associada com o aumento da expressão de MHC Classe I e a forte infiltração de macrófagos e células. T. McCoy et al. (Human Gene Therapy 6:1553, 1995) infundiu os pulmões de ratinho com adenovírus intacto, adenovírus com genoma incompleto, ou adenovírus inativados por luz ultravioleta. Todos os ratinhos induziram inflamação pulmonar, e o número de células inflamatórias no tecido pulmonar revelou-se quantitativamente semelhante para todas as três formas de vírus. Experiências comparativas usando construções adenovíricas em ratinhos normais e imunodeficientes realizadas por Barr et al. (Gene Therapy 2:151, 1995) indicam que a resposta imunitária anti-adenovírica é primariamente mediada por células T e origina uma resposta de memória que afeta dosagens subsequentes.

Concordantemente, no desenvolvimento de vetores AAV recombinantes tais como aqueles usados em terapia genética, existe uma necessidade de estratégias que minimizem as quantidades de vírus adjuvantes, assim como de proteínas víricas adjuvantes e proteínas celulares, presentes na preparação final, ao mesmo tempo em que se obtém altos títulos de AAV de modo a que os métodos possam ser efetivamente empregados numa escala que seja adequada para a aplicação prática de técnicas relacionadas com terapia genética.

Uma vez que altos títulos de preparações de vetores rAAV são particularmente úteis, mas a produção de altos títulos de rAAV, particularmente em procedimentos de larga-escala,

pode conduzir à produção de quantidades significativas de vírus adjuvantes contaminantes (p.ex., adenovírus ou "Ad"), proteínas víricas adjuvantes (p.e., proteínas Ad", e/ou proteínas celulares, tornou-se especialmente importante o desenvolvimento de métodos escaláveis para a produção de rAAV que possam ser úteis na produção de preparações de alto-título que sejam substancialmente livres de vírus contaminantes e/ou proteínas víricas ou celulares. A presente descrição fornece métodos para atingir essas metas competidoras e demonstra que tais técnicas podem ser empregadas para a produção em larga-escala de preparações de vetores AAV recombinantes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Aqui descritos estão métodos e materiais para a produção de preparações de alto título de vírus adeno-associados (AAV) que são substancialmente livres de vírus adjuvantes, proteínas víricas adjuvantes, e proteínas celulares e outros componentes.

A invenção fornece um método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV), compreendendo os passos de:

a) incubação de uma célula produtora de AAV sob condições que são permissivas para a replicação de AAV onde a célula produtora de AAV compreende:

(i) um ou mais genes AAV associados ao empacotamento, onde cada um dos genes AAV associados ao empacotamento codifica uma proteína AAV de replicação ou encapsidação;

(ii) um pro-vetor AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não-AAV recombinante flanqueado por pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) AAV; e

(iii) um vírus adjuvante para AAV;

b) lise da célula produtora após a incubação do passo a) para produzir um lisado de células produtoras de AAV;

c) cromatografia do lisado celular produtor de AAV do passo b) por uma variedade de cromatografias de troca-iônica compreendendo pelo menos uma cromatografia de troca de um anião carregado positivamente e pelo menos uma cromatografia de troca de um catião carregado negativamente, ou cromatografia do lisado celular produtor de AAV do passo b) por uma cromatografia de troca aniônica seguida por filtração de fluxo tangencial para produzir uma população purificada de partículas de vetor rAAV.

A invenção também fornece um método de produção de uma população de partículas rAAV como acima descritas, onde o referido vírus adjuvante é um adenovírus ou um vírus adjuvante sensível à temperatura, e o referido passo de incubação da célula produtora é conduzido a uma temperatura que é permissiva para a replicação de AAV mas não-permissiva para a replicação de vírus adjuvantes sensíveis à temperatura.

Também aqui descrito encontra-se o seguinte:

Um método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV), compreendendo os passos de: a) o fornecimento de uma célula produtora de AAV que compreende: (i) um ou mais

genes AAV associados ao empacotamento, onde cada um dos referidos genes AAV associados ao empacotamento codifica uma proteína AAV de replicação ou encapsidação; (ii) um pró-vetor AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não-AAV heterólogo flanqueado por pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) AAV; e (iii) um vírus adjuvante para AAV; b) a incubação da célula produtora fornecida no passo a) sob condições que são permissivas para a replicação de AAV; c) a lise da célula produtora após a incubação do passo b) para produzir um lisado celular produtor de AAV; e d) cromatografia do lisado celular produtor de AAV do passo c) numa variedade de resinas de troca-iônica compreendendo pelo menos uma resina de troca de um anião carregado positivamente e pelo menos uma resina de troca de um catião carregado negativamente para produzir uma população purificada de partículas do vetor rAAV; ou cromatografia do lisado celular produtor de AAV do passo c) com uma resina de troca aniônica seguida por filtração de fluxo tangencial (TFF).

Um método de produção de uma população de partículas rAAV, onde a incubação das células produtoras é conduzida num vaso de reação selecionado de um grupo consistindo de um vaso de cultura de tecidos, um frasco rotativo, um frasco agitado, um tanque-reator, um fermentador, e um biorreator, opcionalmente usando um microtransportador, e preferencialmente usando uma linha celular mamária de crescimento em suspensão.

Um método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV), compreendendo os passos de: a) fornecimento de uma célula produtora de AAV que compreende: (i) um ou mais

genes AAV associados ao empacotamento; onde cada gene AAV associado ao empacotamento codifica uma proteína AAV de replicação ou encapsidação; (ii) um pró-vetor AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não-AAV heterólogo flanqueado por pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) AAV; e (iii) um vírus adjuvante para AAV ou uma sequência polinucleotídica do referido vírus adjuvante que codifica pelo menos uma função vírica adjuvante; b) a sujeição da célula produtora fornecida no passo a) a um stress subletal; e c) a incubação da célula produtora em stress do passo b) em condições que são permissivas para a replicação de AAV. Formas possíveis de stress subletal são selecionadas mas não estão limitadas aquelas do grupo consistindo de um stress nutricional, um stress osmótico, um stress de pH, um stress de temperatura, um stress aeróbico, um stress mecânico, um stress radiativo e um stress tóxico.

Um exemplo não-limitativo através do qual o stress nutricional é imposto é através da cultura de células produtoras num meio que é deficiente em um ou mais aminoácidos. Ilustrações adicionais são abaixo fornecidas.

Um método de produção de uma população de partículas de rAAV, onde a referida população purificada de partículas de vetores rAAV é substancialmente livre de AAV competentes para replicação, assim como de vírus adjuvantes e proteínas celulares.

Um método para a produção de uma população de partículas de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV), compreendendo os passos de: a) fornecimento de uma célula produtora de AAV que compreende: (i) um ou mais genes AAV associados ao

empacotamento, onde cada gene AAV associado ao empacotamento codifica uma proteína AAV de replicação ou encapsidação; (ii) um pró-vetor AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não-AAV heterólogo flanqueado por pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) AAV; e (iii) um vírus adjuvante para AAV; b) incubação da célula produtora fornecida no passo a) sob condições que são permissivas para replicação de AAV e que compreendem a indução de um stress subletal na célula produtora de AAV; c) a lise da célula produtora após a incubação do passo b) para produzir um lisado celular produtor de AAV; e d) purificação do lisado celular produtor de AAV para a produção de uma população de partículas de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV). Métodos de purificação adequados incluem aqueles descritos noutros locais desta descrição. Um procedimento exemplificativo de purificação compreende a cromatografia do lisado celular produtor de AAV do passo c) com pelo menos uma resina cromatográfica selecionada do grupo consistindo de uma resina de troca aniônica carregada positivamente de forma a produzir uma população purificada de partículas de vetores rAAV (métodos preferenciais incluem troca aniônica seguida por troca catiónica ou filtração de fluxo tangencial (TFF)). Procedimentos cromatográficos ilustrativos, incluindo cromatografia de troca iônica, e purificação cromatográfica com sulfato de heparina são abaixo fornecidos a título de exemplo.

Uma célula hospedeira para a produção de partículas de vírus adeno-associados (rAAV) a eficiências elevadas, compreendendo: a) um ou mais genes AAV associados ao empacotamento, onde o referido gene AAV associado ao empacotamento codifica uma proteína AAV de replicação ou encapsidação; b) um polinucleótido heterólogo introduzido na referida célula hospedeira usando um pró-vetor rAAV,

onde o pró-vetor rAAV compreendendo polinucleótido heterólogo flanqueado por pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) AAV e é deficiente no(s) referido(s) gene(s) AAV associado(s) ao empacotamento; c) um vírus adjuvante tal como um vírus adjuvante sensível a temperatura (tsHV) para AAV, onde o referido tsHV é sensível a temperatura no que refere à sua replicação.

Uma população de partículas rAAV, produzidas de acordo com o método de produção desta invenção. Preferencialmente, a população de partículas contém não mais do que uma partícula adenovírica infecciosa por um milhar de partículas rAAV infecciosas, preferencialmente menos do que uma por 10^6 rAAV, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de por 10^9 rAAV.

Também aqui descritas estão técnicas de ensaio de alta produtividade que podem ser usadas, por exemplo, na titulação de preparações víricas assim como no rastreamento de agentes que afetam a replicação vírica.

As formas de realização desta invenção são representadas na descrição que se segue.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma reprodução em meio-tom se uma análise *Southern Blot* para a produção de vetores rAAV, usando uma sonda para um gene terapêutico CF modelo contido no vetor. A banda proeminente a 1,4 kb indica a presença de rAAV na preparação. A função vírica foi suplementada por um adenovírus subtipo 5 (Ad5) ou pela estirpe adenovírica sensível a temperatura ts149.

A Figura 2 é uma reprodução em meio-tom se uma análise *Slot Blot* para a produção de vetores rAAV, para quantificar o nível de rAAV presente em cada preparação. Quando a função adjuvante é suplementada por ts149, a quantidade de rAAV produzido sob condições estandardizadas de cultura é de vários logs abaixo da produzida na presença de Ad5.

A Figura 3 é uma reprodução em meio-tom de uma análise *Southern Blot* para rAAV, indicando que o aumento do nível de ts149 não melhora o nível de produção de rAAV.

A Figura 4 é um gráfico de barras indicando um aumento dramático na quantidade de rAAV produzido na presença de ts149 (barras com padrão largo) se os períodos de cultura forem estendidos além de 5 dias. Isto encontra-se em evidente contraste com o decréscimo substancial em rAAV que ocorre além do dia 5 quando o adenovírus não-sensível a temperatura é usado para suplementar função vírica (barras com padrão preenchido).

A Figura 5 é um gráfico de linhas mostrando a densidade de células viáveis (VCD) de células HeLa S3 crescidas em cultura de suspensão a 37°C (círculos) ou 32°C (quadrados).

A Figura 6 é um gráfico de linhas mostrando o efeito de filtração de fluxo tangencial a duas diferentes taxas em células HeLa S3 crescidas em cultura de suspensão.

A Figura 7 é um gráfico de barras mostrando a produção de ts149 detetada em células HeLa S3 infetadas cultivadas durante 3-7 dias em suspensão à temperatura permissiva de 32 °C, comparadas com o nível detetado ao dia 7 após microfluidização (MF).

A Figura 8 é um gráfico de combinação mostrando a purificação de ts149 por cromatografia de troca aniónica em matriz PI, eluída com um gradiente de NaCl meq 900-1300 linear a pH 8,0.

A Figura 9 é um gráfico de combinação mostrando a purificação de Adenovírus em matriz PI de troca aniónica, eluída com um gradiente de NaCl 800-1300 meq a pH 8,0. Barras: Atividade vírica medida num ensaio de infecciosidade; linha sólida: A_{280} (uma medida de proteína total); linha a tracejado: condutividade do tampão (ms).

A Figura 10 é um gráfico de combinação mostrando a separação de Adenovírus e AAV recombinante. O painel superior mostra a separação em matriz PI de troca aniónica, eluída com um gradiente de NaCl 0-1000 meq a pH 8,0. O painel inferior mostra a subsequente separação de Adenovírus a partir de contaminante em matriz HS de troca catiónica; eluída com um gradiente de NaCl 0-500 meq a pH 8,0.

A Figura 11 é um gráfico duplo de barras, mostrando o efeito de níveis de soro bovino fetal (FBS) no meio de cultura para a produção de rAAV. A deficiência em soro no meio de cultura é uma de um número de fatores de

stress a que as células produtoras podem ser sujeitas de forma a aumentar a produção de partículas víricas.

A Figura 12 é uma reprodução em meio-tom de uma análise em gel de SDS-poliacrilamida para proteínas AAV durante os passos de purificação. A preparação de AAV foi sujeita a filtração de fluxo tangencial após cromatografia numa coluna de troca aniónica (POROS 50 PI). O gel corado de cor prateada mostra as proteínas AAV da cápside VP1, VP2, e VP3 no material bruto final.

A Figura 13 é um cromatograma mostrando a concentração de AAV numa coluna de sulfato de heparina. O pico acentuado na absorvância a 280 nm (eixo esquerdo) a cerca de 18 minutos de tempo de eluição representa a fração de AAV (após troca aniónica e filtração de fluxo tangencial) como eluído por sulfato de heparina com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M (condutividade em ms representada no eixo direito).

DESCRIÇÃO DETALHADA

Aqui descritos estão métodos e materiais para produção de preparações de alto-título de vírus adeno-associados (AAV) que são substancialmente livres de vírus adjuvantes, proteínas víricas adjuvantes e proteína celulares e outros componentes.

Vários métodos para a produção e processamento de partículas AAV em células mamárias são abaixo descritas em detalhe, e ilustrações do uso de tais técnicas são fornecidas nos Exemplos que se seguem.

Para efeitos de introdução, é típica a aplicação de um hospedeiro ou célula "produtora" para a replicação e empacotamento de vetores rAAV. Tal célula produtora (usualmente uma célula hospedeira mamária) geralmente compreende ou é modificada para compreender vários tipos diferentes de componentes para a produção de rAAV. O primeiro componente é um genoma do vetor viral adeno-associado recombinante (rAAV) (ou "pró-vetor rAAV") que pode ser replicado e empacotado em partículas do vetor pela célula hospedeira associada ao empacotamento. O pró-vetor rAAV irá normalmente compreender um polinucleótido heterólogo (ou "transgene"), com o qual é desejado a alteração genética de outra célula no contexto de terapia genética (uma vez que o empacotamento do referido transgene em partículas de vetores rAAV pode ser eficientemente usada para entregar o transgene numa variedade de células mamárias). O transgene é geralmente flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITRs) AAV que compreendem sequências que são reconhecidas durante a excisão, replicação e empacotamento do vetor AAV, assim como durante a integração do vetor num genoma celular do hospedeiro. Um segundo componente é um vírus adjuvante que pode fornecer funções víricas para a replicação de AAV. Embora adenovírus sejam comumente empregados, outros vírus adjuvantes podem também ser usados tal como é do conhecimento do estado da técnica. Alternativamente, as funções víricas adjuvantes requeridas podem ser isoladas geneticamente a partir de um vírus adjuvante e os genes codificantes podem ser usados para fornecer funções víricas adjuvantes em *trans*. Os elementos do vetor AAV e o vírus adjuvante (ou funções

víricas adjuvantes) podem ser introduzidas na célula hospedeira ou simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem. Os componentes finais para a produção de AAV a ser fornecida na célula produtora são "genes AAV associados ao empacotamento" tal como os genes AAV *rep* e *cap* que fornecem proteínas de replicação e encapsidação, respetivamente. Várias versões diferentes de genes AAV associados em empacotamento podem ser fornecidas (incluindo cassetes *rep-cap wild-type* assim como cassetes *rep* e/ou *cap* nas quais os genes *rep* e/ou *cap* podem ser deixados sob o controlo de promotores nativos ou operacionalmente ligados a promotores heterólogos. Tais genes AAV associados ao empacotamento podem ser introduzidos ou transientemente ou estavelmente em células hospedeiras associadas ao empacotamento, tal como é do conhecimento do estado da técnica e abaixo descrito em mais detalhe.

Após cultivar as células hospedeiras sob condições que permitem a replicação e encapsidação de AAV, as células e frações subcelulares podem ser processadas para produzir preparações de alto-título de vírus adeno-associados (AAV) que são substancialmente livres de vírus adjuvantes, proteínas víricas adjuvantes, e proteínas celulares. Descrições detalhadas de técnicas de processamento e protocolos ilustrativos empregando tais técnicas são abaixo fornecidos.

Definições

Um "vetor" como aqui usado refere-se a uma macromolécula ou associação de macromoléculas que compreende ou está associado a um polinucleótido e que pode ser usado para mediar a entrega do polinucleótido a uma célula. Vetores

ilustrativos incluem, por exemplo, plasmídeos, vetores virais, lipossomas e outros veículos de entrega genética.

"AAV" é uma abreviação de vírus adeno-associados, e pode ser usada para referir o vírus em si ou derivados relacionados. O termo cobre todos os subtipos e ambas as formas naturalmente ocorrentes ou recombinantes, a não ser indicado em contrário. A abreviação "rAAV" refere-se a vírus adeno-associados recombinantes, também referidos como vetores AAV recombinantes (ou vetor "AAV").

Um "vetor rAAV" como aqui usado refere-se a um vetor AAV compreendendo uma sequência polinucleotídica de origem não-AAV (i.e., um polinucleótido heterólogo relativamente a AAV), tipicamente uma sequência de interesse para a transformação genética de uma célula. Em construções de vetor preferenciais como aqui descritas, o polinucleótido heterólogo é flanqueado por pelo menos uma, preferencialmente duas sequências terminais invertidas (ITRs) AAV. O termo vetor rAAV engloba tanto as partículas de vetores rAAV como plasmídeos de vetores rAAV.

Um "vírus AAV" ou "partícula AAV vírica" refere-se a uma partícula vírica composta por pelo menos uma proteína AAV da cápside (preferencialmente por todas as proteínas AAV da cápside *wild-type*) e por um polinucleótido associado à encapsidação. Se a partícula compreender um polinucleótido heterólogo (i.e., um polinucleótido diferente de um genoma AAV *wild-type* tal como um transgene a ser entregue a uma célula mamária), é tipicamente referido como uma "partícula de vetor rAAV", ou simplesmente como "vetor RAAV".

"Empacotamento" refere-se a uma série de eventos intracelulares que resultam na montagem e encapsidação de uma partícula AAV.

Genes AAV "*rep*" e "*cap*" referem-se a sequências polinucleotídicas codificando proteínas de replicação ou encapsidação de vírus adeno-associados. Elas são encontradas em todos os serótipos AAV examinados, e são abaixo descritas e no estado da técnica. AAV *rep* e *cap* são aqui referidos como "genes AAV associados ao empacotamento".

Um "vírus adjuvante" para AAV refere-se a um vírus que permite que AAV (p.ex, AAV wild-type) seja replicado e empacotado por uma célula mamária. Uma variedade de tais vírus adjuvantes para AAV fazem parte do conhecimento do estado da técnica, incluindo adenovírus, herpes-vírus e pox-vírus tais como *vaccinia*. Os adenovírus englobam um número de diferentes subgrupos embora Adenovírus tipo 5 do subgrupo C é o mais comumente usado. Numerosos adenovírus de origem humana, não-humana mamária e aviária são conhecidos e disponíveis a partir de depósitos tais como a ATCC. Vírus da família herpes incluem, por exemplo, vírus herpes simplex (HSV), e vírus Epstein-Barr (EBV), assim como citomegalovírus (CMV) e vírus da pseudo-raiva (PRV): que também estão disponíveis em depósitos tais como a ATCC.

O termo "tsHV" refere-se a vírus adjuvantes sensíveis a temperatura, que podem fornecer funções adjuvantes para a replicação e empacotamento de AAV mas que são sensíveis à temperatura no que refere à sua replicação (i.e, eles podem replicar-se a uma temperatura "permissiva" mas replicam-se a uma eficiência mais baixa, ou preferencialmente sem eficiência alguma, a uma temperatura "não-permissiva"). A capacidade do tsHV para fornecer adjuvância para a replicação de AAV pode também ser sensível a temperatura, mas tsHV preferenciais para uso nesta invenção preferencialmente auxiliam a replicação de AAV a temperaturas em que AAV se pode replicar mas que são não-

permissivas para a replicação de tsHV. Exemplos de tais tsHV são abaixo descritos.

Um vírus "infectioso" ou partícula vírica é uma que compreende uma componente polinucleotídica que é capaz de ser entregue numa célula para a qual a espécie viral é trófica. O termo não implica necessariamente que qualquer capacidade replicativa do vírus. Ensaio para contagem de partículas víricas infectiosas são descritas noutra local desta descrição e no estado da técnica.

Um vírus "competente para replicação" (p.ex., um AAV competente para replicação, por vezes abreviado como "RCA") refere-se a um vírus *wild-type* que é infectioso, e é também capaz de ser replicado numa célula infetada (i.e. na presença de um vírus adjuvante ou funções víricas adjuvantes). No caso de AAV, a competência para replicação geralmente requer a presença de genes AAV funcionais associados ao empacotamento. Vetores rAAV preferenciais como aqui descritos são incompetentes para replicação em células mamárias (especialmente em células humanas) por virtude da falta de um ou mais genes AAV associados ao empacotamento. Preferencialmente, tais vetores rAAV carecem de quaisquer sequências genéticas AAV associadas ao empacotamento de forma a minimizarem a possibilidade de RCA serem produzidos por recombinação entre os genes AAV associados ao empacotamento e um vetor rAAV recebido. Preparações de vetores rAAV preferenciais como aqui descritas são aquelas que contêm poucos ou sequer alguns RCA (preferencialmente menos do que 1 RCA por 10^4 partículas de rAAV, ainda mais preferencialmente menos do que 1 RCA por 10^8 partículas de rAAV, ainda mais preferencialmente menos do que 1 RCA por 10^{12} partículas de rAAV, ainda mais preferencialmente sem RCA).

O termo "polinucleótido" refere-se a uma forma polimérica de nucleótidos de qualquer extensão, incluindo desoxirribonucleótidos ou ribonucleótidos, ou análogos relacionados. Um polinucleótido pode compreender nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e análogos de nucleótidos, e podem ser interrompidos por componentes não-nucleotídicos. Se presentes, as modificações à estrutura dos nucleótidos podem ser conferidas antes ou após a montagem do polímero. O termo polinucleótido, como aqui usado, refere-se intercambiavelmente a moléculas de cadeia simples e de cadeia dupla. A não ser especificado em contrário ou requerido, qualquer aspecto do texto aqui descrito que seja um polinucleótido engloba tanto a forma de cadeia dupla e cada uma das formas complementares de cadeia simples conhecidas ou previstas de formarem a forma de cadeia dupla.

Um "gene" refere-se a um polinucleótido contendo pelo menos uma fase de leitura aberta que é capaz de codificar uma proteína particular após ter sido transcrita e traduzida.

"Recombinante", enquanto aplicado a um polinucleótido significa que o polinucleótido é o produto de várias combinações de passos de clonagem, restrição ou ligação, e outros procedimentos que resultam numa construção que é distinta de um polinucleótido encontrado na natureza. Um vírus recombinante é uma partícula vírica compreendendo um polinucleótido recombinante. Os termos respetivamente incluem entidades replicadas da construção polinucleotídica original e a progenia da construção vírica original.

Um "elemento de controlo" ou "sequência de controlo" é uma sequência nucleotídica envolvida numa interação de moléculas que contribui para a regulação funcional de um

polinucleótido, incluindo replicação, duplicação, transcrição, união, tradução, ou degradação do polinucleótido. A regulação pode afetar a frequência, velocidade, ou especificidade do processo, e pode ser aumentativa ou inibitória na natureza. Elementos de controlo conhecidos no estado da técnica incluem, por exemplo, sequências regulatórias transcripcionais tais como promotores e intensificadores. Um promotor é uma região do DNA capaz de, sob certas condições, ligar-se à RNA polimerase e iniciar a transcrição de uma região codificante usualmente localizada a jusante (na direção 3') do promotor.

"Operativamente ligado" ou "operacionalmente ligado" refere-se à justaposição de elementos genéticos, onde os elementos estão numa relação que permite que eles operem de uma maneira esperada. Por exemplo, um promotor está operacionalmente ligado a uma região codificante se o promotor auxiliar o início da transcrição de uma sequência codificante. Poderão existir resíduos intervenientes entre o promotor e a região codificante desde que a relação funcional seja mantida.

Um "vetor de expressão" é um vetor compreendendo uma região que codifica um polipéptido de interesse, e é usado para efetuar a expressão da proteína numa célula-alvo desejada. Um vetor de expressão também compreende elementos de controlo operacionalmente ligados à região codificante para facilitar a expressão da proteína no alvo. A combinação dos elementos de controlo e um gene ou genes para os quais eles estão operacionalmente ligados para expressão é muitas vezes referida como uma "cassete de expressão", um número elevado das quais é conhecida e disponível no estado da técnica ou pode ser prontamente construído a partir de componentes que estão disponíveis no estado da técnica.

"Heterólogo" significa derivado de uma entidade genotipicamente distinta do resto das entidades para as quais está a ser comparada. Por exemplo, um polinucleótido introduzido por técnicas de engenharia genética num plasmídeo ou vetor derivado de uma espécie diferente é um polinucleótido heterólogo. Um promotor removido da sua sequência codificante nativa e operacionalmente ligado a uma sequência codificante com a qual não se encontra naturalmente ligado é um promotor heterólogo.

"Alteração genética" refere-se a um processo onde um elemento genético é introduzido numa célula diferente por mitose ou meiose. O elemento pode ser heterólogo à célula, ou pode ser uma cópia adicional ou versão melhorada de um elemento já presente na célula. Alteração genética pode ser efetuada, por exemplo, através da transfeção de uma célula com um plasmídeo recombinante ou outro polinucleótido através de qualquer processo conhecido no estado da técnica, tal como eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio ou contacto com um complexo lipossoma-polinucleótido. Alteração genética pode também ser efetuada, por exemplo, por transdução ou infeção com um vírus de DNA ou RNA ou vetor viral. Preferencialmente, o elemento genético é introduzido no cromossoma ou minicromossoma na célula; mas qualquer alteração que mude o fenótipo e/ou genótipo da célula e a sua progenia é incluída neste termo.

Uma célula é considerada como estando "estavelmente" alterada, transduzida, ou transformada com uma sequência genética se a sequência estiver disponível para realizar a sua função durante cultura posterior da célula *in vitro*. Em exemplos preferenciais, tal célula é "hereditariamente" alterada no sentido que a alteração genética introduzida é

também hereditariamente adquirida pela progenia da célula alterada.

Os termos "polipéptido", "péptido" e "proteína" são aqui usados intercambiavelmente para referir polímeros de aminoácidos de qualquer extensão. Os termos também englobam um polímero de aminoácidos que tenha sido modificado por, por exemplo, formação de ligações dissulfureto, glicosilação, lipidação, ou conjugação com um componente marcador.

Polipéptidos tais como "CFTR", "p53", "E1A" e semelhantes, quando discutidos no contexto da terapia genética e composições relacionadas, refere-se ao polipéptido intacto respectivo, ou qualquer fragmento ou derivado geneticamente modificado relacionado que retenha a função bioquímica desejada da proteína intacta. Similarmente, referências a genes de CFTR, p53, E1A, e outros genes similares para uso em terapia genética (tipicamente referidos como "transgenes" a serem entregues a uma célula recetira), incluem polinucleótidos que codificam um polipéptido intacto ou qualquer fragmento ou derivado geneticamente modificado possuindo a função bioquímica desejada.

Uma plasmídeo, vírus, ou outra substância "isolada" refere-se a uma preparação da substância desprovida de pelo menos alguns componentes que podem estar presentes na substância ou substância similar naturalmente ocorrente ou na sua forma preparada inicialmente. Assim, por exemplo, uma substância isolada pode ser preparada através do uso de uma técnica de purificação para a enriquecer a partir de uma mistura inicial. O enriquecimento pode ser medido numa base absoluta, tal como o peso por volume de solução, ou pode ser medido relativamente a uma segunda substância potencialmente interferente presente na mistura inicial.

Enriquecimentos aumentados de aspetos desta descrição são crescentemente preferenciais. Assim, por exemplo, um enriquecimento de 2-vezes é preferencial, um enriquecimento de 10-vezes é ainda mais preferencial, um enriquecimento de 100-vezes é ainda mais preferencial, um enriquecimento de 1000-vezes é ainda mais preferencial.

Uma preparação de AAV é referida como sendo "substancialmente livre" de vírus adjuvante se o rácio de partículas AAV infecciosas para as partículas víricas adjuvantes for pelo menos $10^2:1$; preferencialmente pelo menos $10^4:1$; ainda mais preferencialmente pelo menos $10^6:1$; ainda mais preferencialmente pelo menos $10^8:1$. Preparações são também preferencialmente livres de quantidades equivalentes de proteínas víricas adjuvantes (i.e., proteínas tal como seriam apresentadas como o resultado de um nível de vírus adjuvante correspondente ao das impurezas de vírus adjuvante acima descritas estando presentes na forma quebrada). Contaminação por proteínas víricas e/ou celulares pode geralmente ser observada através da presença de bandas de coloração de azul de Coomassie em géis de SDS (p.ex., o aparecimento de bandas diferentes das correspondentes às proteínas AAV da cápside VP1, VP2 e VP3).

"Eficiência" quando usada na descrição de produção vírica, replicação ou empacotamento refere-se a propriedades úteis dos métodos em particular, a taxa de crescimento e o número de partículas víricas produzidas por célula. Uma produção de "alta eficiência" indica a produção de pelo menos 100 proteínas víricas por célula; preferencialmente pelo menos 10 000 e mais preferencialmente pelo menos 100 000 partículas por célula, ao longo do curso do período de cultura especificado.

Um "indivíduo" ou "sujeito" tratado de acordo com esta descrição refere-se a vertebrados, particularmente membros de uma espécie mamífera, e inclui mas não está limitado a animais domésticos, animais associados a desporto, e primatas, incluindo humanos.

"Tratamento" de um indivíduo ou uma célula é qualquer tipo de intervenção na tentativa de alterar o curso natural do indivíduo ou célula no momento em que o tratamento é iniciado. Por exemplo, tratamento de um indivíduo pode ter como objetivo decrescer ou limitar a patologia causada por qualquer condição patológica, incluindo (mas não estando limitada a) uma deficiência genética adquirida ou hereditária, infecção por um organismo vírico, bacteriano, ou parasita, uma condição neoplásica ou aplásica, ou uma disfunção do sistema imune como uma autoimunidade ou imunossupressão. O tratamento inclui (mas não está limitado a) administração de uma composição, tal como uma composição farmacêutica, e administração de células compatíveis que foram tratadas com uma composição. O tratamento pode ser realizado ou profilaticamente ou terapêuticamente, ou seja, ou antes ou após o início do evento patológico ou contacto com um agente etiológico.

Técnicas Gerais

A prática da presente invenção irá empregar, a não ser indicado em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular, virologia, cultura de células animais e bioquímicas que se encontram no âmbito do estado da técnica. Tais técnicas são explicadas detalhadamente na literatura. Ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed.,

1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos. eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); "Current Protocols in Protein Science" (John E Coligan, et al. eds. Wiley and Sons, 1995); and "Protein Purification: Principles and Practice" (Robert K. Scopes, Springer-Verlag, 1994).

Seleção e Preparação do Vetor AAV e Genes de Empacotamento

AAV

Um vetor AAV recombinante aqui descrito compreende um polinucleótido heterólogo (i.e., não-AAV) de interesse em vez dos genes AAV *cap* e/ou *rep* que normalmente constituem a maior parte do genoma AAC. Tal como no genoma AAV *wild-type*, contudo, o pró-vetor rAAV é preferencialmente flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITRs) como acima referido. Variações em que uma construção rAAV é flanqueada por apenas uma única (tipicamente modificada) ITR também têm sido descritos no estado da técnica e podem ser empregados em ligação com a presente invenção.

Vírus adeno-associados de qualquer serótipo são adequados, uma vez que vários serótipos são funcionalmente e estruturalmente relacionados, mesmo ao nível genético (ver, p.ex., Blacklow, pp. 165-174 d "Parvoviruses and Human Disease" J.R. Pattison, ed. (1988); and Rose, *Comprehensive Virology* 3:1, 1974). Todos os serótipos AAV aparentemente exibem propriedades de replicação similares mediadas por genes *rep* homólogos, e todos geralmente suportam três proteínas da cápside relacionadas tais como as expressas em AAV2. O grau de relação é adicionalmente sugerido por análise *heteroduplex* que revela hibridização cruzada extensa entre serótipos ao longo do comprimento do genoma;

e a presença de segmentos *self-annealing* análogos aos terminais que correspondem às ITRs. Os padrões de infecciosidade similar também sugerem que as funções de replicação em cada serótipo estão sob controle regulatório similar. Entre os vários serótipos AAV, AAV2 é mais comumente empregado.

Um vetor AAV aqui descrito irá tipicamente compreender um polinucleótido que é heterólogo a AAV. O polinucleótido é tipicamente de interesse devido a uma capacidade para fornecer uma função de direcionamento a uma célula no contexto de terapia genética, tal como a sobre-regulação ou sub-regulação da expressão de um certo fenótipo. Tal polinucleótido heterólogo ou "transgene", irá geralmente possuir um comprimento suficiente para fornecer a função desejada ou sequência codificante. Para a encapsidação dentro de partículas AAV2, o transgene irá preferencialmente ser mais pequeno do que cerca de 5 kb embora outros serótipos e/ou modificações possam ser empregadas para permitir que sequências maiores sejam empacotadas em partículas víricas AAV.

Onde a transcrição do polinucleótido heterólogo é desejada na célula-alvo pretendida, ela pode estar operacionalmente ligada ao polinucleótido em si ou a um promotor heterólogo, dependendo por exemplo do nível desejado e/ou especificidade da transcrição na célula-alvo, como é do conhecimento do estado da técnica. Vários tipos de promotores e intensificadores são adequados para uso neste contexto. Promotores constitutivos fornecem um nível contínuo de transcrição genética, e são preferidos quando é desejado que o polinucleótido terapêutico seja expresso numa base contínua. Promotores induzíveis geralmente exibem baixa atividade na ausência do indutor, e são sobre-regulados na presença do indutor. Eles podem ser preferidos

quando a expressão é apenas desejada em certos momentos ou em certos locais, ou quando é desejável a titulação do nível de expressão usando um agente indutor. Os promotores e intensificadores podem também ser específicos para certos tecidos: isto é, eles exibem a sua atividade apenas em certos tipos celulares, presumivelmente devido a elementos reguladores genéticos encontrados unicamente nessas células.

Exemplos ilustrativos de promotores são o promotor tardio SV40, o elemento intensificador/promotor baculovírus poliédrico, a timidina cinase do vírus herpes simplex (HSV tk), o promotor precoce imediato de citomegalovírus (CMV) e vários promotores retrovirais incluindo elementos LTR. Promotores induzíveis incluem promotores induzíveis de iões metálicos pesados (tais como o promotor do vírus do tumor mamário murino (mMTV) ou vários promotores de hormonas de crescimento), e os promotores do fago T7 que estão ativos na presença da RNA polimerase T7. Por meio de ilustração, exemplos de promotores específicos para tecidos incluem vários promotores de surfatina (para a expressão no pulmão), promotores de miosina (para expressão no músculo), e promotores de albumina (para expressão no fígado). Uma grande variedade de outros promotores são conhecidos e geralmente disponíveis no estado da técnica, e as sequências para muitos desses promotores encontram-se disponíveis em bases de dados de sequências tais como a base de dados GenBank.

Quando a tradução é também desejada na célula-alvo pretendida, o polinucleótido heterólogo irá também preferencialmente compreender elementos de controlo que facilitam a tradução (tais como um local de ligação no ribossoma ou "RBS" e um sinal de poliadenilação). Concordantemente, o polinucleótido heterólogo irá

geralmente compreender pelo menos uma região codificante operacionalmente ligada a um promotor adequado, e pode também compreender, por um exemplo, um intensificador operacionalmente ligado, um local de ligação no ribossoma e um sinal poli-A. O polinucleótido heterólogo pode compreender uma região codificante, e mais do que uma região codificante sob o controlo do mesmo promotor ou promotores diferentes. A unidade inteira, contendo uma combinação de elementos de controlo e uma região codificante, é muitas vezes referida como uma cassette de expressão.

O polinucleótido heterólogo é integrado por técnicas recombinantes no interior da ou preferencialmente em lugar da região codificantes AAV genómica (i.e., em lugar dos genes AAV *rep* e *cap*), mas é geralmente flanqueada nos dois lados por regiões de repetições terminais invertidas (ITRs). Isto significa que um ITR aparece tanto a montante como a jusante da sequência codificante, seja em justaposição direta, preferencialmente (embora não necessariamente) sem qualquer sequência interveniente na origem AAC de forma a reduzir a probabilidade de recombinação que possa gerar um genoma AAV competente para replicação. Evidências recentes sugerem que uma única ITR pode ser suficiente para levar a cabo funções normalmente associadas com configurações compreendendo duas ITRs (WO 94/13788), e construções de vetor com apenas uma ITR podem assim ser empregadas em conjugação com os métodos de empacotamento e produção da presente invenção.

Os promotores nativos para *rep* são auto-regulatórios, e podem limitar a quantidade de partículas AAV produzidas. O gene *rep* pode também ser operacionalmente ligado a um promotor heterólogo, seja *rep* fornecido como parte de uma

construção de um vetor, ou separadamente. Qualquer promotor heterólogo que não seja fortemente sub-regulado por expressão do gene *rep* é adequado; mas promotores induzíveis são preferidos porque a expressão constitutiva do gene *rep* pode ter um impacto negativo na célula hospedeira. Uma grande variedade de promotores induzíveis é conhecida do estado da técnica; incluindo, por via de ilustração, promotores induzíveis de iões metálicos pesados (tais como promotores metalotioneína), promotores induzíveis de hormonas esteróides (tais como o promotor MMTV ou promotores de hormonas de crescimento); e promotores tais como os do fago T7 que são ativos na presença da RNA polimerase T7. Uma subclasse especialmente preferencial de promotores induzíveis é aquela em que os promotores são induzíveis por vírus adjuvantes que são usados para complementar a replicação e empacotamento do vetor rAAV. Um número de promotores induzíveis por vírus adjuvantes tem também sido descrito, incluindo o promotor do gene precoce do adenovírus que é induzível pela proteína E1A adenovírica; o promotor tardio maior do adenovírus, o promotor do herpesvírus que é induzível por proteínas de herpesvírus tais como VP 16 ou ICP4, assim como promotores induzíveis de vaccinia ou poxvírus.

Métodos para a identificação e teste de promotores induzíveis por vírus adjuvantes foram descritos no pedido pendente de aplicação W096/17947 co-propriedade da Targeted Genetics Corporation (Allen et al.). Assim, métodos são conhecidos no estado da técnica para determinar se promotores candidatos são ou não induzíveis por vírus adjuvantes, e se ou não eles serão úteis na produção de células de empacotamento altamente eficientes. Sucintamente, cada método envolve a substituição do promotor p5 do gene AAV *rep* com o promotor putativo induzível por vírus adjuvantes (sejam conhecidos no estado

da técnica ou identificados usando técnicas bem conhecidas tais como a ligação a genes "repórter" com promotores fracos. Os genes AAV *rep-cap* (com p5 substituído), preferencialmente ligados a um marcador de seleção positivo tal como um gene de resistência a antibiótico, são então estavelmente integrados numa células hospedeira adequada (tal como células HeLa ou A549 como abaixo exemplificado). As células que são capazes de se multiplicar relativamente bem sob condições de seleção (p.ex, na presença de um antibiótico) são então testadas quando à sua capacidade para expressar os genes *rep* e *cap* após adição de um vírus adjuvante. Como um teste inicial para a expressão de *rep* e/ou *cap*, as células podem ser prontamente rastreadas usando imunofluorescência para detetar proteínas *Rep* e/ou *Cap*. A confirmação das capacidades e eficiências de empacotamento podem então ser determinadas por testes funcionais para replicação e empacotamento de vetores rAAV futuros. Usando esta metodologia, um promotor induzível por vírus adjuvantes derivado de um gene metalotioneína murino foi identificado como um substituinte adequado para o promotor p5, e usado para a produção de altos títulos de partículas rAAV (como descrito em WO 96/17947, Targeted Genetics Corporation).

Dados os limites de tamanho quanto à encapsidação relativa de vários genomas AAV, a inserção de um grande polinucleótido heterólogo no genoma necessita da remoção de uma porção da sequência AAV. A remoção de um ou mais genes AAV revela-se desejável em qualquer caso, para reduzir a probabilidade de produção de AAVs competentes para replicação ("RCA"). Concordantemente as sequências codificantes ou do promotor para *rep*, *cap*, ou ambos, são preferencialmente removidas, uma vez que as funções fornecidas por esses genes podem ser fornecidas em *trans*.

O vetor resultante é referido como sendo "defetivo" nessas funções. De forma a replicar e empacotar o vetor, as funções ausentes são complementadas com um gene associado ao empacotamento, ou uma variedade deles relacionada, que conjuntamente condificam as funções necessárias para os vários produtos genéticos *cap* e/ou *rep* ausentes. Os genes associados ao empacotamento ou cassetes genéticas são preferencialmente não-flanqueadas por ITRs AAV e preferencialmente não partilham qualquer homologia substancial com o genoma rAAV. Assim, de modo a minimizar a recombinação homóloga durante a replicação entre a sequência do vetor e genes associados ao empacotamento fornecidos separadamente, é desejável evitar a sobreposição de duas sequências polinucleotídicas. O nível de homologia e a frequência de recombinação correspondente aumentam com o aumento do comprimento nas sequências homólogas e com o seu nível de identidade partilhada. O nível de homologia que irá colocar uma preocupação num dado sistema pode ser determinado teoricamente e confirmado experimentalmente, como é do conhecimento do estado da técnica. Tipicamente, contudo, a recombinação pode ser substancialmente reduzida ou eliminada se a sequência de sobreposição for menos do que uma sequência de 25 nucleótidos se for pelo menos idêntica em 80% ao longo do seu comprimento total, ou menos do que uma sequência de 50 nucleótidos se for pelo menos idêntica em 70% ao longo do seu comprimento total. Evidentemente, mesmo baixos níveis de homologia são preferíveis uma vez que eles irão adicionalmente reduzir a probabilidade de recombinação. Parece que, mesmo sem qualquer homologia de sobreposição, existe alguma frequência residual de produção de RCA. Mesmo reduções adicionais na frequência de produção de RCA (p.ex., por recombinação não-homóloga) pode ser obtida por separação das funções de replicação e encapsidação em AAV., como descrito por Allen et al. in U.S. pedido de patente

08/769,728, preenchido a 18 Dezembro 1996, publicado internacionalmente com WO98/27204 em 25 de Junho 1998 (Targeted Genetics Corporation)).

A construção do vetor rAAV, e as construções de empacotamento complementares podem ser implementadas nesta invenção num número de diferentes formas. Partículas virais, plasmídeos, e células hospedeiras estavelmente transformadas podem todas ser usadas para introduzir as referidas construções numa células de empacotamento, seja transientemente ou estavelmente.

Em certas formas de realização desta invenção, o vetor AAV e genes associados ao empacotamento complementares, se presentes, são fornecidos na forma de plasmídeos bacterianos, partículas AAV, ou qualquer combinação relacionada. Noutras formas de realização, a sequência do vetor AAV, os genes associados ao empacotamento, ou ambos, são fornecidos na forma de células eucarióticas geneticamente modificadas (preferencialmente modificadas hereditariamente). O desenvolvimento de células hospedeiras hereditariamente modificadas para expressar a sequência do vetor AAV, os genes AAV associados ao empacotamento, ou ambos, fornece uma fonte estabelecida de material que é expresso a um nível confiável.

Uma variedade de diferentes células geneticamente modificadas pode então ser usado no contexto desta invenção. Por via de ilustração, uma célula hospedeira mamária pode ser usada com pelo menos uma cópia intacta de um vetor rAAV estavelmente integrado. Um plasmídeo AAV associado ao empacotamento compreendendo pelo menos um gene *rep* operacionalmente ligado a um promotor pode ser usado para fornecer funções de replicação (como descritas no pedido de patente co-proprietário de Flotte et al., agora

Patente U.S. 5,658,776). Alternativamente, uma linha celular mamária estável com um gene AAV *rep* operacionalmente ligado a um promotor pode ser usado para fornecer funções de replicação (ver, p.ex., Trempe et al., (USSN 08/362,608, 9 Janeiro 1995, WO95/13392, 18 Maio 1995); Burstein et al., (USSN 08/770,122, preenchida 18 Dezembro 1996, WO98/23018, 25 Junho 1998); e Johnson et al., (USSN 08/254,358, publicada 6 Junho 1994, aprovada como U.S. No. 5,656,785, 19 Agosto 1997)). O gene AAV *cap*, fornecendo as proteínas de encapsidação como acima descritas, pode ser fornecido conjuntamente com um gene AAV *rep* ou separadamente (ver, p.ex., os pedidos de patente e patentes publicadas acima referidas assim como Allen et al., USSN 08/769,728, publicada 18 Dezembro 1996, WO98/27204 em 25 Junho 1998 (Targeted Genetics Corporation)). Outras combinações são possíveis e incluídas no âmbito desta invenção.

Introdução de Material Genético nas Células

Como descrito no estado da técnica, e ilustrado tanto aqui como nas referências acima citadas, o material genético pode ser introduzido nas células (tais como células mamárias "produtoras" para a produção de AAV) usando qualquer um de uma variedade de meios para transformar ou transduzir as referidas células. Por via de ilustração, tais técnicas incluem por exemplo transfeção com plasmídeos bacterianos, infeção com vetores virais, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, e introdução usando qualquer uma de uma variedade de composições lipídicas (um processo muitas vezes conhecido como "lipofecção"). Métodos e composições para realizar estas técnicas foram descritos no estado da técnica e encontram-se amplamente disponíveis.

A seleção de células adequadamente modificadas pode ser conduzida por qualquer técnica fazendo parte do conhecimento do estado da técnica. Por exemplo, as sequências polinucleotídicas usadas para alterar a célula podem ser introduzidas simultaneamente com ou operacionalmente ligadas a um ou mais marcadores de detecção ou de seleção como é do conhecimento do estado da técnica. Por via de ilustração, qualquer um pode empregar um gene de resistência a fármaco como um marcador de seleção. Células resistentes a fármacos podem então ser recolhidas e cultivadas, e então testadas para a expressão da sequência desejada, i.e., um produto genético associado ao empacotamento, ou um produto de um polinucleótido heterólogo, como apropriado. O teste para a aquisição, localização e/ou manutenção de um polinucleótido introduzido pode ser realizada usando técnicas baseadas em hibridização de DNA (tais como *Southern blotting* e outros procedimentos do conhecimento do estado da técnica). O teste para expressão pode ser prontamente realizado por análise *Northern* do RNA extraído a partir de células geneticamente modificadas, ou por imunofluorescência indireta para o produto genético correspondente. O teste e confirmação das capacidades e eficiências de empacotamento podem ser obtidos através da introdução na células das componentes funcionais adicionais de AAV e um vírus adjuvante, para testar a produção de partículas AAV. Quando uma célula é hereditariamente modificada por uma variedade de construções polinucleotídicas, é geralmente mais conveniente (embora não essencial) a sua introdução na célula separadamente, e a validação de cada passo serialmente. Referências descrevendo tais técnicas incluem aquelas aqui citadas.

Seleção e Preparação de Vírus Adjuvantes

Como acima discutido, AAV é um parvovírus que é defetivo para auto-replicação, e deverá geralmente depender de um vírus adjuvante para fornecer certas funções replicativas. Um número destes vírus adjuvantes foi identificado, incluindo adenovírus, herpesvírus (incluindo mas não estando limitados a HSV1, citomegalovírus e HHV-6) e poxvírus (particularmente vaccinia). Qualquer um dos vírus referidos pode ser usado com esta invenção.

Frequentemente, o vírus adjuvante será um adenovírus de um tipo e subgrupo que pode infectar a célula hospedeira pretendida. Adenovírus humano do subgrupo C, particularmente serótipos 1, 2, 4, 6 e 7, são comumente usados. O serótipo 5 é geralmente preferido.

As características e padrões de crescimento do adenovírus são conhecidas do estado da técnica. O leitor pode referir-se, por exemplo, a Horowitz, "Adenoviridae and their replication", pp 771-816 em "Fundamental Virology", Fields et al., eds. O genoma adenovírico empacotado é uma molécula de DNA linear, ligada através de ITRs adenovíricas no terminal à esquerda e à direita a um complexo proteico terminal que forma um círculo. As regiões de controlo e codificante para componentes precoces, intermédios e tardios sobrepõem-se no genoma. Os genes da região precoce estão implicados na replicação do genoma adenovírico, e estão agrupados dependendo da sua localização nas regiões E1, E2, E3, e E4.

Embora não sendo essencial, em princípio é desejável que a estirpe do vírus adjuvante seja defetiva para replicação no sujeito a quem se destina a terapia genética. Assim, qualquer vírus adjuvante residual que esteja presente numa

preparação rAAV será incompetente para replicação. Adenovírus dos quais a região E1 ou ambas as regiões E1 e E3 tenham sido removidos não são infecciosos para a maioria das células humanas. Eles podem ser replicados numa linha celular permissiva (p.ex., a linha celular humana 293) que é capaz de complementar a atividade ausente. Regiões de adenovírus que aparentam estar associados com a função adjuvante, assim como regiões que não, foram identificados e descritos no estado da técnica (ver, p.ex., P. Colosi et al., W097/17458, e referências citadas daqui em diante).

Uso de um Vírus Adjuvante Condicionalmente Sensível

Como aqui descrito, um vírus adjuvante "condicionalmente sensível" pode também ser empregado para fornecer atividade vírica adjuvante. Tal estirpe de vírus adjuvante deverá no mínimo possuir a propriedade de ser capaz de suportar a replicação de AAV numa célula hospedeira sob um conjunto de condições onde ela isoladamente não pode completar uma replicação genômica eficiente. Onde a atividade do vírus adjuvante é suplementada como partículas de vírus intactas, é geralmente necessário que o vírus seja capaz de replicação numa célula adjuvante sob um segundo conjunto de condições. O primeiro conjunto de condições diferirá do segundo conjunto de condições por uma propriedade prontamente controlável, tal como a presença ou ausência de um cofator requerido (tal como um catião), a presença ou ausência um fármaco inibitório, ou uma mudança numa condição ambiental como a temperatura. Mais convenientemente, a diferença entre as duas condições é a temperatura, e tal vírus condicionalmente sensível é assim referido como um vírus adjuvante sensível a temperatura (tsHV).

Para os propósitos desta descrição um vírus adjuvante "sensível a temperatura" ou "ts" é um que é capaz de replicar o seu material genético numa célula eucariótica a uma certa gama de temperatura (o gama de temperatura "permissiva"), tipicamente entre cerca de 15°-35°C e preferencialmente entre cerca de 20°-32°C. Contudo, a uma temperatura "não-permissiva", mesmo quando outras condições são mantidas de igual forma, a taxa de replicação do material genético é substancialmente mais baixa, pelo menos 10-vezes mais baixa; usualmente pelo menos 100-vezes mais baixa; e preferencialmente pelo menos 1000-vezes mais baixa. Esta temperatura encontra-se tipicamente entre 35°-50°C, geralmente a cerca de 42°C. Num exemplo típico de tal vírus adjuvante ts, o vírus é capaz de replicação eficiente a temperaturas relativamente baixas tais como temperaturas de cerca 20°-32°C, as é incapaz de replicação eficiente a temperaturas relativamente altas como as temperaturas de cerca de 37°-42°C. É entendido que a célula infetada com vírus possa ainda assim exhibir alguns processos metabólicos atribuíveis ao vírus a uma temperatura não-permissiva, incluindo mas não estando limitado à função adjuvante para a produção de AAV.

Um vírus adjuvante sensível a temperatura pode ser produzido em quantidades grandes através do cultivo de células infetadas a uma temperatura permissiva. O vetor AAV pode então ser produzido por cultivo de células compreendendo os elementos do vetor e um vírus adjuvante sensível a temperatura a uma temperatura não-permissiva. A preparação do vetor será substancialmente livre de componentes víricos adjuvantes.

Um grande número de variantes adenovíricas sensíveis a temperatura foram descritas no estado da técnica; ver, p.ex., as variantes descritas por Ensinger et al. (J.

Virol. 10:328, 1972); Williams et al. (J. Gen Virol. 11:95, 1971); Ishibashi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65:304, 1970); Lundholm et al. (Virology 45:827, 1971); e Shiroki et al., (Virology 61:474, 1974); entre outros. A análise de complementaridade indica que tais variáveis caem uma pluralidade de diferentes grupos de complementaridade (Ginsberg et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34:419, 1974). Isto sugere que um número de passos no ciclo descontínuo replicativo adenovírico possa tornar-se sensível à temperatura.

Uma vez que a função adjuvante para a replicação de AAV requer que apenas parte do ciclo descontínuo adenovírico seja intacto, o teste para a função adjuvante de vários mutantes a uma temperatura não-permissiva fornece um meio de mapear a função adjuvante. Por exemplo, Ishibashi et al. (Virology 45:317, 1971) reportou que variantes adenovíricas aviárias sensíveis a temperatura auxiliam a replicação de AAV1 e AAV2. Ito et al. reportou que o mutante ts13 sensível a temperatura do adenovírus humano 7 (Ad7ts13) auxilia a replicação de AAV a temperaturas não-permissivas tão eficiente como seria de esperar de uma estirpe *wild-type*. Drake et al.

(Virology 60: 230, 1974) reportaram a complementação na síntese de antigénios AAV4 por 3 grupos de mutantes sensíveis a temperatura do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV1). Handa et al. (J. Gen. Viro. 29:239, 1975) reportou a atividade adjuvante para a produção de vírus AAV1 pelos adenovírus mutantes humanos Ad5ts36, Ad5ts125, Ad5ts149, Ad12tsA275, Ad12tsB221, e Ad12tsC295. Ostrove et al. (Virology 104:502, 1980) reportou que os mutantes sensíveis a temperatura Ad5ts125, Ad5ts135, Ad5ts157, Ad5ts116, e Ad5ts142, e a gama de mutantes dos hospedeiros hr6 mas não hr3 auxiliam a replicação de AAV. Mayor et al. (J. Gen

Virol. 35:545, 1977) reportou que Ad31 ts 13 mas não Ad31 ts94 auxiliam a produção de AAV1 a temperaturas não-permissivas.

Straus et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:742, 1976) reportou que Ad5ts125 auxilia a replicação de AAV2 sob condições em que o adenovírus não seria capaz de se replicar. Eles utilizaram esta propriedade para estudar intermediários de DNA formados durante a replicação de AAV. Myers et al. (J. Virol. 35:65, 1980) realizou um estudo quantitativo da função adjuvante, e mostrou que Ad5ts149 auxilia a produção de 20 000 partículas de AAV por células a uma temperatura não-permissiva, enquanto que Ad5ts107 produz apenas ~100 partículas por célula. Uma vez que Ad5ts107 tem uma mutação na região de DNA codificante de ligação a proteína de 72 KdA, eles concluíram que esta proteína desempenhava um papel na replicação AAV RNA. Mais recentemente, Carter et al. (Virology 191:473, 1992) propuseram que uma proteína de 72 kDa totalmente funcional é requerida para expressão pós-transcricional quantitativa dos genes *rep* e *cap*.

Como frisado na secção anterior, a existência de adenovírus sensíveis a temperatura já é conhecida há algum tempo. Contudo, não tem existido até à data qualquer sugestão ou indicação relativamente ao efectivo uso condicional de vírus adjuvantes na produção de vetores AAV recombinantes, tais como aqueles que podem ser usados para terapia genética.

Parte da explicação pode ser a dificuldade na obtenção de títulos suficientes de AAV quando se usam vetores recombinantes. Entre outras coisas, as proteínas AAV *Rep* aparentemente sub-regulam a sua própria expressão através do promotor p5 (Tratschin et al., Mol. Cell Biol. 6:2884,

1986). Adicionalmente, foi observado que a expressão do gene *rep* em linhas celulares associadas ao empacotamento tais como aquelas que podem ser usadas para a produção de vetores AAV recombinantes, tende a inibir o crescimento e/ou metabolismo da célula (ver, p.ex., Targeted Genetics Corporation, W096/17947, por Allen et al.).

As diferenças entre a produção de AAV *wild-type* e vetores AAV recombinantes tende a ser bastante dramática quando considerada em termos de produção. Em particular, foi observado que a produção de vetores AAV tende a ser substancialmente mais baixa que a produção de partículas AAV *wild-type*, e que a presença ou produção de quantidades ainda que pequenas de AAV *wild-type* contaminante tende a resultar numa produção preferencial de vírus *wild-type* que pode eventualmente superar o número de vetores AAV recombinantes.

Estes fenómenos são adicionalmente ilustrados pelos resultados descritos nos Exemplos 1 e 2 desta descrição, e na Figura 1. O adenovírus mutante sensível a temperatura *ts149* é reportado noutra fonte como auxiliante da replicação de partículas AAV (Myers et al., J. Virol. 35:65, 1980). Contudo, o Exemplo 2 mostra que quando este mutante é usado para auxiliar a produção de um vetor AAV com um promotor heterólogo sob condições standardizadas, o nível da produção é várias ordens de magnitude abaixo daquele que é evidenciado por adenovírus *wild-type*.

Esta descrição mostra que vírus sensíveis a temperatura podem de facto ser usados para preparar vetores AAV recombinantes a títulos suficientes, superando os aparentes obstáculos de produção. As descrições que se seguem ilustram como seleccionar um vírus adjuvante sensível a

temperatura e otimizar as condições de forma a fornecer suficiente AAV para propósitos de terapia genética.

Em particular, é demonstrado que a extensão do período de replicação para AAV quando se usando tsAd como adjuvante dramaticamente aumenta a quantidade de vetor AAV que é produzida (Exemplo 3). Isto é contraintuitivo, uma vez que a extensão do período de replicação quando se usando da mesma forma Ad *wild-type* decresce a quantidade de vetor AAV em pelo menos uma ordem de magnitude. Um profissional de saúde habilitado no estado da técnica procurando a otimização de condições para a produção de AAV iria logicamente procurar por tempos de cultura mais curtos e concentrações mais elevadas de vírus adjuvantes, duas condições que como aqui demonstradas são ineficazes.

Também aqui descritos estão métodos melhorados de cultura e separação para a preparação de grandes quantidades adenovírus sensíveis a temperatura. Ao mesmo tempo que não sendo estritamente requeridos para a práticas de certas formas de realização desta invenção, preparações de adenovírus sensíveis a temperatura obtidas por estes métodos são particularmente adequadas para a produção de AAV, *inter alia*, para os propósitos de terapia genética.

Variantes condicionalmente sensíveis da estirpe selecionada de vírus adjuvantes podem ser produzidas por uma estratégia de mutagenização e seleção. Por exemplo, os vírus podem ser mutagenizados com nitrosoguanidina, ácido nitroso, hidroxilamina, ou 5-bromo-2-desoxiuridina. Os candidatos que conseguem multiplicar-se numa célula eucariótica adequada sob as condições permissivas desejadas são selecionados. Como ilustração, adenovírus mutantes sensíveis a temperatura que se multiplicam, p.ex., a 32°C mas não a 39,5°C, podem ser obtidos. Rácios de eficiência

de plaqueamento a 39,5°C versus 32°C são preferencialmente menos do que 10^{-4} e mais preferencialmente menos do que 10^{-5} . Ilustrações adicionais de processos de seleção adequados para adenovírus sensíveis a temperatura podem ser encontrados, por exemplo, em Ensinger et al., J. Virol. 10:328, 1972; e Williams et al., J. Gen Virol. 11:95, 1971. A descrição de variantes de adenovírus que não são sensíveis a temperatura, mas com uma gama de hospedeiros sensível, podem ser encontrados em Harrison et al., Virology 77:319, 1977. Mutantes sensíveis a temperatura eficazes para uso nesta invenção podem ser preparados, por exemplo, a partir de vírus adjuvantes alternativos tais como vírus herpes simplex 1 (HSV1) ou vírus herpes simplex 2 (HSV2). Ver, p.ex., Schaffer et al., Virology 52:57, 1973 para HSV 1; Esparza et al., Virology 57:554, 1974 para HSV2. Como indicado na secção "Antecedentes da Invenção", um grande número de vírus adjuvantes condicionalmente sensíveis foram já descritos, e podem ser obtidos por cientistas que os desenvolvem ou descrevem ou a partir de um depósito público.

Nem todas as variantes condicionalmente sensíveis da lista acima referida de vírus funcionarão na presente invenção. Em particular, a estirpe deverá ser condicionalmente sensível numa qualquer etapa do seu ciclo descontínuo de replicação de tal forma que a função a ser bloqueada sob condições não-permissivas não seja uma que é requerida para uma replicação altamente eficiente de AAV. A escolha de qual estirpe de vírus adjuvante a ser usada pode ser feita com referência quer à biologia do vírus adjuvante, quer aos requerimentos replicativos de AAV.

Um vírus adjuvante exemplificativo para uso com esta invenção é o adenovírus ts149 sensível a temperatura do serótipo Ad5 (Ad5ts149). Como mostrado na secção

"Exemplos", sob condições otimizadas, esta estirpe pode ser usada para a produção de rAAV a nível que equivalem ou excedem aqueles obtidos por Ad5 *wild-type*. A ts149 apresenta uma transição única de C-G para A-T na posição 7563 (Roovers et al., *Virus Genes* 4:53, 1990). Isto resulta numa mudança no aminoácido leucina na posição do resíduo 411 na DNA polimerase em substituição de fenilalanina. A DNA polimerase está contida na unidade de transcrição E2 do adenovírus. Contudo, outros mutantes ts mapeados nesta região são menos adequados. Em particular, a unidade de transcrição E2 podem também compreender a região codificante para a proteína de ligação a DNA 72kDa (DBP). Uma estirpe que não produz qualquer DBP detetável (Add/802) auxilia a replicação de AAV, mas a um nível que é reduzido por uma ordem de magnitude (Carter et al., *Virology* 191:473, 1992). Adts125, que também compreende uma mutação mapeando a região codificante de DBP, auxilia a replicação AAV (Straus et al., *J. Virol.* 17:140, 1976), embora os níveis sejam geralmente muito mais baixos que aqueles de Ad5 *wild-type* (Myers et al., *J. Virol.* 35:65, 1980). Concordantemente, vetores adenovíricos sensíveis a temperatura adequados para uso nesta invenção incluem aqueles para os quais a sensibilidade se aplica à região E2A do genoma, preferencialmente à região codificante da DNA polimerase.

O artesão poderá prontamente determinar quais estirpes víricas são adequadas para uso como vírus adjuvantes através da condução de um ensaio de replicação rAAV usando um painel de estirpes candidatas a vírus adjuvantes numa linha celular candidata sob condições que são não-permissivas para a auto-replicação do adjuvante. Para variantes sensíveis a temperatura, o rastreio é feito a temperaturas não-permissivas de acordo com as propriedades conhecidas da estirpe. Temperaturas não-permissivas são

geralmente mais altas que as temperaturas permissivas, tipicamente entre 35°-50°C, preferencialmente 38°-45°C, ainda mais preferencialmente a cerca de 39,5°C. Variantes que auxiliem a replicação de AAV a um nível que se encontra uma ordem de magnitude que é aquele apresentado pelo vírus *wild-type* correspondente são preferidas. Na condução do rastreio, o artesão deverá incorporar outras indicações técnicas desta descrição. Em particular, o rastreio por cultura em circunstâncias que mostrem um pico de replicação para AAV com vírus *wild-type* é insuficiente. Uma matriz cinética deverá ser montada de tal forma que os vírus adjuvantes candidatos sejam usados por períodos mais longos, e então comparados com o vírus *wild-type* no tempo do pico de recolha. Uma ilustração mais detalhada desta análise é fornecida no Exemplo 3 desta descrição.

Uma vez tendo sido selecionada uma estirpe de vírus adjuvante adequada, pode ser implementada nesta invenção num número de diferentes formas. Partículas víricas, plasmídeos víricos, e células hospedeiras estavelmente transformadas podem ser usadas.

Num aspeto, o genoma do vírus adjuvante (ou minimamente, as regiões do genoma do vírus adjuvante codificando uma função adjuvante) é introduzido numa células hospedeira para ser usado para replicação do vetor rAAV na forma de um plasmídeo de DNA, ou uma pluralidade de plasmídeos que fornecem funções complementares. Procedimentos para a manipulação experimental de adenovírus são conhecidos do estado da técnica. O leitor poderá referir-se a Graham et al., "Manipulation of adenovirus vectors". Em: Murray EJ, ed *Methods in molecular biology: Gene transfer and expression protocols*, vol7. Clifton, NJ: The Human Press, 1991:109-128, que fornece protocolos detalhados para a propagação, titulação, e purificação de adenovírus, co-transfecção e

recombinação *in vivo*. Plasmídeos adenovíricos estão disponíveis comercialmente a partir de Microbix Biosystems Inc., Toronto, Canada.

Num outro aspeto, a célula hospedeira é estavelmente transfetada com genes adenovíricos, ou geneticamente modificados para fornecerem as funções requeridas para a replicação de rAAV. Alternativamente, a célula hospedeira pode ser geneticamente modificada com apenas uma porção do genoma adenovírico, e é subsequentemente infetada ou transfetada com uma partícula adenovírica ou plasmídeo. Os pedidos de patente WO 95/27071 e WO 95/34671 descrevem células hospedeiras hereditariamente modificadas para fornecerem função adenovírica, que complementa as propriedades replicativas de várias construções adenovíricas defetivas.

Ainda noutra forma de realização, a célula hospedeira usada para a replicação de AAV é infetada com um vírus adjuvante que é capaz de auto-replicação, mas não sob condições não-permissivas. Qualquer preparação da estirpe requerida fornecendo uma MOI suficiente pode ser usada. Na manutenção de GMP e outros requerimentos regulatórios, e para facilitar o *scale-up* para propósitos comerciais, as preparações de vírus adjuvantes preferencialmente compreendem uma densidade elevada de partículas infecciosas e são substancialmente livres de *debris* celular e outros contaminantes. Propriedades desejáveis incluem as seguintes:

- Uma densidade de pelo menos 10^6 , preferencialmente pelo menos 10^8 , mais preferencialmente pelo menos 10^{10} IU/ml, como determinado por um ensaio TCID₅₀.

- Um rácio de DNA adenovírico para proteína total ou de exões adenovíricos que indique pelo menos 10%, preferencialmente pelo menos 50%, mais preferencialmente pelo menos 80% de partículas virais contendo DNA adenovírico.
- Menos do que 20%, preferencialmente menos do que 10%, mais preferencialmente menos do que 1% de contaminação por material não-adenovírico a nível proteico ou de DNA, como detetado por géis SDS marcados para proteína, ou géis de agarose com material digerido por enzimas de restrição e corado com brometo de etídio.
- Um total de pelo menos 10^9 , preferencialmente pelo menos de cerca de 10^{11} , mais preferencialmente pelo menos de cerca de 10^{13} IU por ciclo descontínuo de produção.

Os vírus adjuvantes podem ser preparados em qualquer célula que seja permissiva para replicação vírica. Para adenovírus, as células preferenciais incluem células 293 e células HeLa. Tradicionalmente, quando essas células tiverem sido usadas para a replicação de adenovírus, elas foram usadas em placas de cultura. Contudo, como mostrado no Exemplo 4, estes métodos geralmente suportam a replicação de adenovírus sensíveis a temperatura a níveis que são um ou dois logaritmos abaixo daqueles evidenciados por adenovírus *wild-type*.

Concordantemente, é preferível a utilização de técnicas de cultura que permitam um aumento na densidade de plaqueamento. Variantes de células 293 e HeLa que foram adaptadas para crescimento em suspensão estão disponíveis. HeLa é preferível por razões de crescimento celular, viabilidade e morfologia em suspensão. Como mostrado no

Exemplo 5, estas células podem ser mantidas numa densidade suficiente (2×10^6 por ml) para compensar a taxa de replicação mais baixa da estirpe adenovírica sensível a temperatura. Uma vez estabelecidas, as células são infectadas com o vírus e cultivadas a uma temperatura permissiva por um período de tempo suficiente, geralmente 3-7 dias e tipicamente cerca de 5 dias.

A filtração de fluxo tangencial é uma técnica usada no estado da técnica para o processamento de grandes volumes de células mamárias para o propósito de sua perfusão, concentração e recolha. Ver, p.ex., Dorin et al., *Biotechnol. Prog.* 6:494, 1990; Maiorella et al., *Biotechnol. Bioeng.* 37:121, 1991. É recomendável que esta técnica seja usada com culturas em suspensão para a preparação de vírus adjuvantes para uso nesta invenção. O Exemplo 5 demonstra que células HeLa S3 suportam forças de cisalhamento de $750-1500 \text{ sec}^{-1}$, permitindo a concentração de células de diafiltração do meio despendido.

Os vírus são recolhidos da cultura seja através do meio despendido ou por microfluidização das células. O nível de vírus adjuvantes produzidos na cultura é tipicamente de pelo menos 10^7 IU/ml, e preferencialmente de pelo menos de cerca de 3×10^7 IU/ml.

Os vírus adjuvantes preparados de acordo com a descrição referida podem ser usados diretamente para infeta células hospedeiras usadas para a replicação de rAAV. Mais usualmente, o vírus é isolado e concentrado antes de uso. Métodos atuais para a purificação e concentração de vírus adjuvantes tipicamente envolvem gradientes isopícnicos de CsCl. Este método é intensivo em termos de tempo e recursos, requerendo numerosos passos de processamento, e é difícil de *scale-up*. Alternativamente, a purificação por

cromatografia é recomendada. O leitor é geralmente direcionado para Prior et al., Pharmaceut. Technol. 19:30, 1995; e Huyghe et al., Human Gene Therapy 6:1403, 1995. Particularmente preferida para o isolamento de estirpes sensíveis a temperatura de adenovírus é a cromatografia de troca aniônica, especialmente numa resina de polietileneimina usando um gradiente contínuo de NaCl a pH 7,4. Uma ilustração detalhada do método de separação com polietileneimina é apresentada no Exemplo 6.

Fornecendo uma Célula Hospedeira Compreendendo Vírus Adjuvante e AAV

Vários critérios influenciam a seleção de células para uso na produção de partículas rAAV como aqui descrito. Como matéria inicial, a célula deverá ser permissiva para replicação e empacotamento do vetor rAAV quando se usando o vírus adjuvante selecionado. Contudo, uma vez que a maioria das células mamárias pode ser produtivamente infetada por AAV, e muitas podem também tornar-se infetadas por vírus adjuvantes tais como adenovírus, é claro que uma grande variedade de células mamárias e linhas celulares efetivamente satisfazem estes critérios. Entre eles, as células mais preferidas e linhas celulares são aquelas que podem facilmente ser mantidas em cultura de forma a facilitar a produção em larga-escala de preparações de vetores AAV recombinantes. Uma vez mais, contudo, muitas dessas células efetivamente satisfazem este critério. Onde a produção em larga escala é desejada, a escolha do método de produção irá também influenciar a seleção da célula hospedeira. Por exemplo, como descrito em maior detalhe abaixo e no estado da técnica, algumas técnicas de produção e reatores ou câmaras de cultura são desenvolvidos para o crescimento de células em suspensão. No último caso, a

célula hospedeira seria assim preferencialmente adaptada ou adaptável a crescimento em suspensão. Contudo, mesmo no caso de células e linhas celulares que são consideradas como aderentes ou dependentes de ancoragem, é possível (como abaixo descrito) desenvolver variantes adaptadas a crescimento em suspensão a partir de uma linha parental dependente de ancoragem por seleção serial das células capazes de crescer em suspensão.

Onde o vírus adjuvante sensível a temperatura é usado, as células deverá ser capaz de eficazmente replicar o vetor rAAV sob condições que são não-permissivas para replicação de vírus adjuvantes. Por via de ilustração, quando o adenovírus ts149 é usado como um vírus adjuvante ts (como abaixo ilustrado e descrito), as células deverá ser capaz de auxiliar a replicação de rAAV e fornecer empacotamento a temperaturas bem acima de 32°C, preferencialmente rondando os 39,5°C. As células 293 são um exemplo de uma linha celular cumprindo estes critérios mas outras numerosas células e linhas celulares são capazes de replicar AAV a esta temperatura relativamente elevada.

Finalmente, o vírus adjuvante, a sequência de vetor rAAV e todas as sequências AAV necessárias para replicação e empacotamento deverão estar presentes na mesma célula. Onde um ou mais genes AAV associados a empacotamento são fornecidos separadamente do vetor, uma célula hospedeira é fornecida compreendendo: (i) um ou mais genes AAV associados ao empacotamento, onde o referido gene AAV associado ao empacotamento codifica uma proteína AAV de replicação ou encapsidação; (ii) um polinucleótido heterólogo introduzido na referida células hospedeira usando um vetor AAV ou pró-vetor, onde o referido vetor rAAV ou pró-vetor compreende o referido polinucleótido heterólogo flanqueado por pelo menos uma ITR AAV e é

deficiente nos referidos genes AAV associados ao empacotamento; e (iii) um vírus adjuvante ou sequências codificando as funções víricas adjuvantes requeridas. Deverá ser referido, contudo, que um ou mais desses elementos pode ser combinado numa única replicação. Por via de ilustração, um vírus adjuvante pode também compreender um pró-vetor rAAV ou um gene AA associado ao empacotamento.

O vírus adjuvante é preferencialmente introduzido na cultura de células a um nível suficiente para infetar a maioria das células em cultura, mas pode alternativamente ser mantido a um nível mínimo para limitar a quantidade de vírus adjuvante presente na preparação resultante. Uma multiplicidade de infecção ou "MOI" de 1-100 pode ser usada, mas uma MOI de 5-10 é tipicamente adequada.

Similarmente, se o vetor AAV e/ou os genes associados a empacotamento forem transientemente introduzidos na célula de empacotamento (por oposição a serem estavelmente introduzidos), eles são preferencialmente introduzidos a um nível suficiente para geneticamente alterar a maior parte das células em cultura. Quantidades geralmente requeridas são na ordem dos 10 µg por 10^6 células, se suplementadas com um plasmídeo bacteriano; ou 10^8 partículas por 10^5 células, se suplementadas como uma partícula AAV. A determinação de uma quantidade ótima é um exercício de titulação rotineira que está ao alcance daqueles artesãos habilitados no estado da técnica.

Estes elementos podem ser introduzidos na célula, seja simultaneamente, ou sequencialmente em qualquer ordem. Onde a célula é hereditariamente modificada por qualquer um dos elementos, a célula pode ser selecionada e permitida proliferar antes da introdução do elemento seguinte.

Numa forma de realização preferencial, o vírus adjuvante é introduzido em último lugar na célula para o resgate e empacotamento do vetor rAAV residente. A célula já irá geralmente encontrar-se suplementada com genes AAV associados ao empacotamento. Preferencialmente, sejam o vetor rAAV ou os genes AAV associados ao empacotamento e mais preferencialmente os dois, estarão estavelmente integrados na célula. É prontamente apreciável que outras combinações sejam possíveis. Tais combinações estão incluídas no âmbito da invenção.

Uma vez a célula hospedeira tendo sido fornecida com os elementos requeridos, a célula é cultivada sob condições que são permissivas para a replicação AAV, de modo a permitir a replicação e empacotamento do vetor rAAV. O tempo de cultura é preferencialmente ajustado para corresponder a níveis de produção máximos, e é tipicamente de 3-6 dias. Preferencialmente pelo menos 100 partículas víricas são produzidas por célula, mais preferencialmente pelo menos 1 000 por célula, ainda mais preferencialmente pelo menos 10 000 por célula. Preferencialmente, pelo menos $0,5 \times 10^6$, mais preferencialmente pelo menos 1×10^6 , ainda mais preferencialmente pelo menos 2×10^6 RU/ml de vetores AAV são produzidos por 2×10^5 células durante o período de cultura. Opcionalmente, métodos de produção em larga-escala tais como cultura em suspensão ou filtração de fluxo tangencial podem ser usados. As partículas AAV são então recolhidas, e isoladas das células usadas para as produzir.

Preparações de partículas rAAV aqui preparadas preferencialmente compreendem uma elevada densidade de partículas AAV infecciosas e são substancialmente desprovidas de vírus adjuvantes, proteínas víricas adjuvantes e *debris* celular e outros contaminantes. Propriedades desejáveis incluem as seguintes:

- Uma concentração de pelo menos 10^7 , preferencialmente pelo menos 10^8 , mais preferencialmente pelo menos 10^9 RU/ml, como determinado num ensaio de replicação ou por comparação de hibridização quantitativa com um padrão conhecido.
- Não mais do que 10^3 , preferencialmente não mais do que 10^2 , mais preferencialmente não mais do que 10^1 partículas infecciosas de vírus adjuvantes por 10^8 RU de partículas rAAV.
- Menos do que 5%, preferencialmente menos do que 1%, mais preferencialmente menos do que 0,01 %, ainda mais preferencialmente menos do que 0,001 % de contaminação por vírus adjuvantes numa base proteica (wt/wt), detetada seja por análise densitométrica de géis SDS, ou por imunoenaios para proteínas específicas de vírus adjuvantes (tais como exões ou fibra-penton de adenovírus)
- Menos do que 5%, preferencialmente menos do que cerca de 1%, mais preferencialmente menos do que cerca de 0,01%, ainda mais preferencialmente menos do que 0,001% de contaminação por vírus adjuvantes ou proteínas celulares (wt/wt), detetadas seja por análise densitométrica de géis SDS, ou por imunoenaios para vírus adjuvantes ou proteínas celulares específicas.
- Preferencialmente, a preparação é também substancialmente livre de outros componentes celulares potenciais tais como lípidos celulares, hidratos de carbono e/ou ácidos nucleicos.

Os métodos focados nesta descrição são adequados para a produção de pequenos ciclos experimentais, ou ciclos

preparativos de 10-100 litros ou mais. Para preparações de ciclos de larga-escala, as seguintes propriedades são também desejadas:

- Um total de pelo menos 10^{10} , preferencialmente 10^{12} , e mais preferencialmente 10^{14} RU de partículas de vetores AAV na preparação.

Opcionalmente, os vetores rAAV podem ser adicionalmente processados para enriquecer as partículas rAAV, diminuir as partículas de vírus adjuvantes, ou de alguma forma torná-las adequadas para administração a u sujeito. Técnicas de purificação podem incluir centrifugação em gradiente isopícnico, e técnicas cromatográficas. A redução da atividade de vírus adjuvantes infecciosos pode incluir inativação por tratamento com temperatura ou tratamento com pH como é do conhecimento do estado da técnica. Outros processos podem incluir concentração, filtração, diafiltração, ou mistura com um tampão adequado ou excipiente farmacêutico. As preparações podem ser divididas em unidade de dosagem ou alíquotas multi-dosagem para distribuição, que irão reter as características essenciais do ciclo, tais como a homogeneidade do conteúdo antigénico e genético, e a proporção relativa do vírus adjuvante contaminante.

Técnicas exemplificativas para a produção de preparações de vírus adjuvantes e AAV exibindo várias propriedades desejáveis como as acima descritas são fornecidas nas seguintes secções e exemplos subsequentes.

Vários métodos para a determinação do título infeccioso de uma preparação vírica são do conhecimento do estado da técnica. Contudo, um método preferencial para a determinação do título é um ensaio de titulação de alta

eficiência como aqui fornecido. Num ensaio exemplificativo de titulação de alta eficiência, um conjunto de poços de cultura cada um compreendendo uma alíquota de células mamárias e uma alíquota de preparação vírica (assim como poços de controlo compreendendo, p.ex., células sozinhas, vírus sozinhos e meio) é estabelecido. O conjunto de poços de cultura pode, por exemplo, ser na forma de um vaso de microtitulação. Tipicamente, alíquotas (p.ex., alíquotas diluídas serialmente) da preparação vírica a ser titulada são adicionadas às células e então as células e vírus são incubadas sob condições que permitem a replicação do vírus (condições tipicamente de crescimento adequadas para a célula hospedeira mamária). Após a replicação do vírus, o ácido nucleico viral é geralmente libertado por lise das células mamárias (usando condições ou agentes que promovem lise se necessário). Em formas de realização preferenciais, os ácidos nucleicos (incluindo ácidos nucleico virais) na multiplicidade de lisados é transferido e fixo numa membrana sob condições em que se liga a ácidos nucleicos (lavando como apropriado para a remoção de proteínas e outros contaminantes). A membrana preferencialmente é uma réplica ou imagem espelhada do conjunto de cultura em que os poços individuais do conjunto inicial são subsequentemente representados por "pools" de ácidos nucleicos (do lisado de cada poço de cultura) que estão ligadas nas posições correspondentes à membrana. A hibridização da membrana com uma sonda marcada específica para o vírus (ou específica para o fragmento vírico) pode então ser usada para identificar e quantificar a quantidade relativa de ácido nucleico viral em cada um dos pontos do conjunto, e por correspondência, em cada um dos poços de cultura originais. As condições e materiais para a transferência de ácidos nucleicos, incluindo ligação, lavagem e hibridização podem ser adaptadas a partir de técnicas de biologia molecular rotineiras tais como

hibridização "dot blot" (como descrita no estado da técnica, ver, p.ex., as técnicas de biologia molecular em Sambrook et al., supra, e Ausubel et al., supra). Aplicações ilustrativas dessas técnicas encontram-se abaixo apresentadas.

Estes métodos fornecem assim um ensio de infecciosidade de alta-eficiência que pode ser usado na determinação do título infeccioso de uma preparação vírica. Como mostrado no Exemplo 4, os títulos víricos determinados por este método rápido e quantitativo correspondem intimamente aos títulos determinados por outras técnicas mais clássicas. Adicionalmente, contudo, este método de alta-eficiência permite o processamento e análise concorrentes de muitas reações de replicação víricas e assim possui muitos outros usos, incluindo por exemplo o rastreio de linhas celulares permissivas ou não-permissivas para a replicação viral e infecciosidade, assim como o rastreio de agentes que afetam a replicação vírica, como discutido adicionalmente abaixo.

Técnicas Preferenciais de Produção e Purificação de Vírus Adjuvantes para Uso na Presente Invenção

Em vários aspectos preferenciais da presente descrição, métodos de produção e purificação são empregados para a produção de vírus adjuvantes adequados para uso na produção de vetores rAAV como aqui descrito. Um vírus adjuvante comumente usado para a produção de AAV é o adenovírus, tipicamente Ad5, embora outros vírus adjuvantes possam também ser empregados como aqui discutido e no estado da técnica.

Para propósitos de ilustração, é conveniente dividir a discussão da produção e purificação de vírus em fases "a

montante" e "a jusante". O processo "a montante" geralmente refere-se à produção do vírus em células hospedeiras adequadas e libertação ou remoção do vírus das células para produzir uma preparação vírica "bruta" tal como um lisado. O processamento "a jusante" pode ser empregado para purificar a preparação bruta de vírus (p.ex., através do isolamento de proteínas celulares e/ou outros contaminantes).

Uma grande variedade de técnicas é conhecida para a produção e processamento de vírus adjuvantes, incluindo adenovírus (p.ex., centrifugação CsCl, assim como outras técnicas tais como as descritas em WO 96/27677). Vírus adjuvantes produzidos usando técnicas que podem ser empregadas na produção de vetores rAAV como aqui descritas.

As seguintes secções descrevem, para propósitos de ilustração, técnicas que podem ser empregadas para a produção de adenovírus embora outras técnicas façam parte do conhecimento do estado da técnica e podem ser aqui empregadas.

(i) Vírus Adjuvantes "a Montante"

Vírus adjuvantes, tais como Ad5, podem ser prontamente produzidos através da infecção de células mamárias (p.ex., células humanas). Nos exemplos ilustrativos abaixo descritos, as células são cultivadas em meios e reatores de cultura adequados para o crescimento das células hospedeiras, concentradas antes da infecção, e depois infetadas com vírus adjuvantes (p.ex., a um MOI de 1-5) com agitação suave. Após a infecção, as células podem ser ressuspensas em meio fresco e incubadas por um período adicional de tempo (tipicamente 2 dias) de forma a permitir

a replicação e empacotamento do vírus adjuvante. Após incubação, as células podem ser recolhidas e lisadas para libertar o vírus adjuvante. Após a lise, o lisado celular é preferencialmente tratado com uma nuclease para degradar os ácidos nucleicos livres (p.ex., ácidos nucleicos celulares) sem degradar os ácidos nucleicos que são encapsidados nas partículas virais. O lisado pode ser clarificado (p.ex., por filtração e/ou centrifugação), e pode também ser sujeito a técnicas de purificação adicionais de forma a purificar e concentrar o vírus adjuvante na preparação, como abaixo descrito e ilustrado.

Como um exemplo ilustrativo de tal processo, as células podem ser crescidas em meio a uma densidade de cerca de 1×10^6 células/ml num vaso tal como um frasco de agitação. Após incubação, as células podem então ser concentradas até cerca de 10^7 células/ml, e infetadas com Ad5 a 1-2 unidades de infeção/célula com agitação suave. As células podem então ser ressuspensas em meio a cerca de 10^6 células/ml, e permitidas produzir vírus ao longo de um período de incubação de cerca de 2 dias. As células podem então ser recolhidas, ressuspensas em meio ou solução-tampão (p.ex., a cerca de 5×10^6 células/ml), e depois lisadas, p.ex., por lise mecânica tal como passagem através de um microfluidizador a 8000 psi ou técnica equivalente (p.ex., congelamento/descongelamento ou sonicação). O lisado pode ser tratado com uma nuclease (p.ex., benzonase) durante uma hora a 37°C . O lisado pode ser clarificado através de um filtro, tal como um filtro de $1,0\mu\text{m}$, ou por centrifugação. Técnicas análogas e modificações relacionadas são adicionalmente descritas em baixo.

(ii) Vírus adjuvante "a Jusante"

Técnicas preferidas para o processamento a jusante do vírus adjuvante, tal como um adenovírus, empregam procedimentos de cromatografia de troca iónica para a purificação do vírus adjuvante

Por via de ilustração, o filtrado de adenovírus como acima descrito pode ser adicionado a uma resina de troca-iónica, tal como uma resina amino ou imino N-carregada (p.ex., POROS 50 PI, ou qualquer amina DEAE, TMAE, amina terciária ou quaternária, ou resina baseada em PEI) numa coluna cromatográfica equilibrada com tampão (tal como TMEG), também aqui referido como tampão "A" de Cromatografia: 50 mM Tris (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 5% glicerol).

A coluna pode então ser lavada com múltiplos volumes de TMEG de lavagem de coluna (p.ex., 5-6 volumes), seguido por múltiplas volumes com solução salina de lavagem (p.ex., 5-6 volumes de TMEG com NaCl 800 mM (tampão "B" de Cromatografia: 60 % TMEG e 40% TMEG com NaCl 2M). O adenovírus pode ser eluído com TMEG com 1300 mM de NaCl. (35% de tampão "A" de cromatografia, 65% de tampão "B" de cromatografia).

O pico de adenovírus pode ser identificado nas frações por um ensaio de infecciosidade ou por uma hibridização de ácidos nucleicos ou por um imunoensaio, tal como já descrito no estado da técnica. O pico de adenovírus pode ser tornado estéril através de filtração por im filtro de 0,2µm estéril. Opcionalmente, o pico pode ser concentrado por filtração de fluxo tangencial, por exemplo numa unidade *Filtron Ultrasette* ou *Millipore Pellicon*. O pico ou concentrado pode ser diafiltrado neste sistema com um

tampão adequado, tal como uma mistura PBS + 5% Sacarose. Alternativamente, o adenovírus pode ser deixado num tampão de eluição. O produto adenovirico final pode ser esterilizado através de um filtro de 0,2 μ m e armazenado para uso. Como aqui descrito e ilustrado, um vírus adjuvante sensível a temperatura (como um adenovírus sensível a temperatura) pode também ser empregado.

Exemplos descrevendo a preparação e uso de tais vírus adjuvantes são abaixo fornecidos para os propósitos de ilustração posterior.

Técnicas de Produção e Purificação de AAC para uso na Presente Invenção

Tal como com vírus adjuvantes, é conveniente para os propósitos de ilustração a divisão da discussão da produção e purificação de AAV nas fases do processo "a montante" e "a jusante"; com o processo "a montante" geralmente a referir-me à produção de AAV nas células hospedeiras adequadas e a libertação ou remoção dos vírus das células para a produção de uma preparação "bruta" de AAV. O processamento "a jusante" pode ser empregado para purificar a preparação AAV (p.ex., para isolar AAV das proteínas celulares e/ou outros contaminantes).

Em aspetos preferenciais da presente invenção, o processamento "a montante" e "a jusante" de AAV é conduzido de um modo considerado como substancialmente redutor ou eliminador de proteínas celulares contaminantes, assim como de quaisquer vírus adjuvantes contaminantes (p.ex., AD) ou proteínas víricas adjuvantes, cada um dos quais possa contribuir para a promoção de uma resposta imune se

presente a níveis substanciais na preparação de vetor rAAV final a ser usada para transferência genética.

As seguintes secções descrevem, para propósitos de ilustração, técnicas que podem ser empregadas para a produção de AAV.

(i) Processamento de AAV a Montante

Um vetor AAV pode ser produzido a partir de uma linha celular mamária que contém os necessários genes AAV associados ao empacotamento (p.ex., um gene *rep* e *cap*); um pró-vetor AAV recombinante (rAAV) que compreendem um polinucleótido não-AAV heterólogo flanqueado por pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) AAV; e um vírus adjuvante para AAV (p.ex., um adenovírus). Estes componentes podem ser introduzidos numa célula numa variedade de configurações, como acima descrito e abaixo ilustrado. Uma vez que AAV podem ser replicados e empacotados em qualquer uma de uma variedade de células mamárias, existem um grande número de linhas celulares que podem ser modificadas e empregadas para a produção de AAV.

Por via de ilustração, um vetor AAV pode ser produzido a partir de uma linha celular, tal como a linha "C12" (como descrito por K.R. Clark et al.. *Gene Therapy*, 3: 1124-1132, 1996) ou a linha "C137,5" (descrita no pedido de aplicação co-propriedade de Targeted Genetics Corporation, J. Allen et al., WO 96/17947), que foi desenvolvida para conter uma construção *rep* e/ou *cap*, assim como uma construção de um vetor. Opcionalmente, uma linha celular tal como C12 ou C137 que contém uma construção *rep* e/ou *cap* pode ser transfetada com um plasmídeo que contém uma construção do vetor, tal como ptgAAV-CF. Ou uma célula pode ser transfetada com um plasmídeo que contém *rep* e *cap* tal como

pRS5, assim como um plasmídeo que contém uma construção do vetor. A célula pode ser infectada com adenovírus ou transfetada com DNA que contém genes adenovíricos.

Uma variedade de tais células "produtoras" de AAV pode ser produzida, como descrito em referências aqui citadas e no estado da técnica.

As células produtoras de AAV podem ser crescidas sob condições (incluindo meio, temperatura e semelhantes) que são geralmente adequadas para crescimento de células mamárias, que são geralmente também permissivas para a replicação de AAV. Por exemplo, o meio de suspensão DMEM/F12 é preferido para o crescimento de células e o meio DMEM isolado é preferido para a produção de vetores AAV. Como faz parte do conhecimento do estado da técnica, alguns tipos celulares e linhas celulares tendem a ser dependentes de ancoragem, enquanto outras são capazes de crescer em suspensão, e muitas outras células dependentes de ancoragem podem também ser "adaptadas" para crescer em suspensão por ciclização de células sob condições de suspensão como meio para as enriquecer e ultimamente selecionar as variantes que são capazes de crescer em suspensão. Concordantemente, o crescimento de células para a produção de AAV pode ser conduzido em qualquer uma de uma variedade de vasos de cultura, dependendo em parte se a linha celular produtora escolhida é relativamente dependente de ancoragem ou se está adaptada para crescimento em suspensão. Tais vasos para o crescimento de células dependentes de ancoragem incluem, por exemplo, frascos de cultura de tecidos, frascos rotativos, microtransportadores e biorreatores (tais como biorreatores de fibras-ocais, de leito fixo ou de leito fluidizado). Vasos para o crescimento de linhas celulares em suspensão incluem, por exemplo, frascos de

agitação, tanques-reatores e fermentadores de aeração forçada.

A replicação de AAV procede por um período de tempo assim como até a um ponto no ciclo descontínuo de crescimento em que a produção vírica é ótima, preferencialmente com um crescimento logarítmico médio a tardio (tipicamente de um a três dias), após o qual as células podem ser recolhidas e lisadas para libertar a progenia do vírus. Por exemplo, as células podem ser ressuspensas em meio de crescimento até a uma concentração de $1-10 \times 10^6$ células/ml, e permitidas produzirem vírus durante 48 horas. As células podem então ser recolhidas (p.ex., por centrifugação), e ressuspensas em solução-tampão (p.ex., TMEG (ou "Tampão A de Cromatografia"): 50 mM Tris, pH 8,0, 5 mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 5% Glicerol) a cerca de $1-10 \times 10^6$ células/ml.

Os AAV podem replicar-se em números elevados de cópias (p.ex. $10^5 - 10^6$ genomas/células) em células transduzidas se as necessárias proteínas AAV *rep* e funções víricas adjuvantes forem fornecidas de um modo relativamente simultâneo. Se as proteínas *cap* forem também fornecidas, as partículas AAV são montadas no núcleo das células infetadas onde tendem a auto-organizar-se em agregados cristalinos. O primeiro passo na recuperação do produto é portanto a lise celular. Embora ciclos de congelamento/descongelamento e/ou sonicação possam ser usados para lisar as células (como aquelas contendo adenovírus=, tais técnicas não são muito adequadas à preparação em larga-escala. A lise mecânica, usando técnicas tais como a microfluidização são assim preferíveis a esse nível. Detergentes e outros agentes químicos podem também ser empregados para mediar ou facilitar a lise. O tratamento dos lisados com nucleases (tais como benzonase) foi descoberto como sendo útil na redução de viscosidade e aumento da filtrabilidade. A

clarificação, p.ex., por microfiltração para separar o vetor de pelo menos uma porção de *debris* celular, é também útil para a promoção da recuperação e purificação.

Por via de ilustração, as células podem ser mecanicamente lisadas após um período de incubação por passagem sequencial através de um microfluidizador (tipicamente a 8000 psi, usando duas passagens). Outras técnicas comumente empregadas incluem ciclos de congelamento/descongelamento e sonicação, tal como é conhecido no estado da técnica. O lisado pode também ser tratado com uma nuclease para degradar ácidos nucleicos (tal como um ácido nucleico celular ou viral) que não é efetivamente "protegido" por virtude de se encontrar empacotado numa partícula vírica. Tipicamente empregamos digestão com benzonase durante cerca de uma hora a 37°C. O lisado pode também ser clarificado. Métodos para a clarificação incluem passagem através de um filtro, tal como um filtro de 1,0µm, e centrifugação.

Filtração de fluxo tangencial (TFF) pode ser beneficemente empregada para o processamento e colheita de grandes volumes de células. TFF pode ser usado para perfusar, concentrar e recolher células animais. Por exemplo, TFF pode ser usado para processar células sob condições de fluxo laminar a taxas médias de disrupção de cerca de 3000 vezes por segundo (ver, p.ex., Maiorella, B., et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 37: 121-126, 1991). A concentração em larga-escala de vírus usando ultra-filtração TFF foi descrita por R. Paul et al. *Human Gene Therapy*, 4:609-615, 1993.

Ensaio de produção ilustrativos empregando tais técnicas encontram-se abaixo descritos.

(ii) Processamento AAV "a Jusante"

Como acima descrito, seria particularmente vantajoso obter-se preparações de AAV que sejam substancialmente livres de partículas víricas adjuvantes (tais como partículas Ad). Adicionalmente, preparações de vetores AAV irão ser também preferencialmente livres de vírus adjuvantes e proteínas celulares (que podem também ser imunogénicas). Contudo, existe um conjunto adicional de restrições que influenciam a adequabilidade de técnicas para a produção de AAV. Nomeadamente, de forma a ser particularmente útil para a produção de AAV para terapia genética, é mais desejável que as técnicas sejam "escaláveis", i.e., aplicáveis em conjugação com dispositivos e procedimentos de produção de larga-escala. Este último conjunto de restrições efetivamente reduz ou elimina a utilidade de técnicas estandardizadas disponíveis tais como a separação por cloreto de céσιο (que não é efetivamente bem adequada a procedimentos de preparação em larga-escala).

Descobrimos uma combinação de procedimentos que são simultaneamente escaláveis e altamente eficientes para a produção de preparações AAV que são substancialmente livres de partículas víricas adjuvantes, assim como de vírus adjuvantes e proteínas celulares e outros contaminantes. A nossa combinação preferencial de procedimentos emprega procedimentos cromatográficos de troca-iónica que contrastam com vários procedimentos mencionados no estado da técnica para a purificação potencial de, p.ex., AAV ou Ad. Em particular tais procedimentos como descritos no estado da técnica empregam um único tipo de separação iónica, muitas vezes em combinação com outros tipos de procedimentos cromatográficos (ver, p.ex., K. Tamayose et al., Human Gene Therapy 7: 507-513 (1996), e W096/27677,

Setembro 12, 1996). Contudo, no caso da produção de AAV, encontramos que uma combinação de cromatografias de troca iónica por oposição a cromatografias sequenciais é particularmente eficaz na produção de preparações AAV que são substancialmente livres de partículas víricas e proteínas, assim como de proteínas celulares.

À vista destas descobertas, parece que AAV não se encontra apenas "adaptada" a cromatografia de troca aniónica e cromatografia de troca catiónica, mas também que tal combinação de ambas trocas iónicas opostas é particularmente eficaz para a eliminação das várias partículas e contaminantes proteicos que tipicamente surgem na produção de preparações de vetores AAV. Qualquer uma de uma variedade de resinas de troca catiónica ou aniónica pode ser empregada em conjugação com estes procedimentos, as propriedades fundamentais das quais são a disponibilidade de grupos negativamente ou positivamente marcados, respetivamente, para que os AAV se possam ligar a pelo menos alguma extensão (mais preferencialmente a um grau que difere substancialmente da afinidade de ligação relativa de um ou mais dos contaminantes acima referidos, i.e., partículas e proteínas Ad, assim como proteínas celulares mamárias). Sem pretender estar preso por teoria, acredita-se que o passo de troca aniónica seja particularmente eficaz para a separação de AAV de Adenovírus, onde ambos os passos (mas especialmente o passo de troca catiónica) sejam particularmente eficazes na separação de AAV de proteínas celulares. Também empregamos a troca aniónica seguida por filtração de fluxo tangencial, como abaixo descrito e ilustrado. Como adicionalmente descrito abaixo, descobrimos que as preparações AAV pode ser altamente concentradas por cromatografia com sulfato de heparina.

Por via de ilustração, um lisado de AAV clarificado como acima descrito pode ser adicionado numa coluna de troca aniónica positivamente carregada, tal como com uma resina amino ou imino N-carregada (p.ex. POROS 50 PI, ou qualquer outra DEAE, TMAE, amina terciária ou quaternária, ou resina baseada em PEI) ou uma coluna de troca catiónica carregada negativamente (como com HS, SP, CM ou qualquer outra resina catiónica de base sulfo-, fosfo- ou carbóxi-). A coluna pode ser lavada com um tampão (tal como um tampão A cromatográfico A/TMEG). A coluna pode ser eluída com um gradiente de concentração crescente de NaCl e as frações podem ser recolhidas e ensaiadas para a presença de AAV e/ou contaminantes.

Outros procedimentos podem ser usado em vez de ou, preferencialmente, em adição aos já descritos procedimentos de troca aniónica e catiónica, baseados nas associações intermoleculares mediadas por outras propriedades que não carga tal como faz parte do conhecimento do estado da técnica. Tais outros procedimentos incluem associações intermoleculares baseadas em pares ligando-recetor (tais como interações anticorpo-antigénio ou lectina-hidratos de carbono), assim como separações baseadas noutras propriedades das moléculas, tais como cromatografia de exclusão molecular baseada no tamanho e/ou forma. Para tomar apenas um exemplo, o filtrado ou preparação AAV parcialmente purificada pode ser adicionada a uma coluna que contém um anticorpo específico para AAV. Esta coluna pode ligar-se a AAV. A coluna pode ser lavada com solução-tampão para remover proteínas contaminantes, e depois eluída com um gradiente ou passo de aumento de concentração de NaCl e as frações podem ser recolhidas. Alternativamente, tal coluna pode ser eluída com um tampão a diferentes pHs daqueles do tampão de diluição.

Os picos de AAV e adenovírus podem ser identificados em frações por ensaios de infecciosidade ou por hibridização de ácidos nucleicos ou imunoenaios. Os picos podem ser combinados, e a combinação pode ser diluída ou dializada ou diafiltrada com um tampão (p.ex., TMEG ou equivalente) para reduzir a concentração de sal.

Esta combinação pode ser injetada numa coluna de troca aniónica carregada positivamente e/ou uma coluna de troca catiónica carregada negativamente (tal como aquelas acima referidas). A coluna pode ser lavada com um tampão (tal como um tampão A de cromatografia TMEG). A coluna pode ser eluída com um gradiente de concentração crescente de NaCl e as frações podem ser recolhidas. Os picos de AAV e adenovírus podem ser identificados nas frações por um ensaio de infecciosidade ou por hibridização de ácidos nucleicos ou por um imunensaio. Os picos podem ser combinados com base nos resultados de qualquer um destes ensaios.

A conjugação de frações contendo AAV eluídas de uma coluna de troca aniónica como acima descrita podem ser concentradas e purificadas por filtração de fluxo tangencial (TFF), por exemplo numa unidade Filtron Ultrasette ou Millipore Pellicon. Uma membrana com um *cut-off* adequado de peso molecular (tal como um *cut-off* de 100 000 ou 300 000) é tipicamente composta por um polímero tal como uma celulose regenerada ou poliétersulfona. A preparação é filtrada através de uma membrana, e o produto é retido. O material retido pode ser diafiltrado usando a membrana com lavagens sucessivas de um tampão adequado solução de Ringer salina ajustada + 5% glicerol. A amostra final é altamente enriquecida para o produto e pode ser esterilizada por filtração através de um filtro de 0,2µm e armazenada para uso futuro.

Na purificação e concentração de AAV com filtração de fluxo tangencial de material de pós-coluna de troca aniónica, a membrana *cut-off* de peso molecular 300 000 resultou em produtividades mais elevadas das unidades replicativas em comparação com uma membrana *cut-off* de peso molecular 100 000.

Um passo adicional que foi empregado para a remoção de um adenovírus, se desejado, envolve o tratamento da combinação de eluentes com um passo de inativação por calor (como aqui descrito) e depois filtração (p.ex., antes de submeter a preparação a TFF). Contudo, encontramos que o procedimento "TFF-troca aniónica" acima descrito resultou numa preparação AAV que é livre de adenovírus detetável, e resultou em taxas mais elevadas de AAV purificado.

Ensaios de produção ilustrativos empregando tais técnicas são abaixo descritos.

Alterando as Condições de Crescimento de Células Produtoras de AAV para um Aumento de Produção

Durante o curso dos nossos testes de produção com AAV em vários meios e vasos de cultura, tipicamente monitorizamos as culturas com respeito a vários parâmetros de crescimento e/ou metabólicos tais como a densidade celular, disponibilidade de glucose e aminoácidos, e a produção de sub-produtos metabólicos tais como a amónia e ácido láctico. Tais componentes podem ser prontamente monitorizados usando técnicas standardizadas tais como HPLC e ensaios enzimáticos, como descrito no estado da técnica.

Como descrito nos Exemplos abaixo, descobrimos que certos aminoácidos, particularmente aspartato e glutamato, foram rapidamente eliminados tanto em culturas de ciclo descontínuo como em culturas de perfusão. De facto, em várias experiências de ciclo descontínuo e perfusão, observamos que desde 90 a 99% de asp e glu disponíveis eram substancialmente eliminados 24 a 48 horas em tais culturas. Uma vez que os níveis de asp e glu aparentavam ser sub-ótimos em cada meio, fornecemos quantidade adicionais de cada um ou dos dois aminoácidos. Técnicas de manutenção e otimização de cultura tais como as que foram rotineiramente aplicadas no contexto de bioprodução de larga-escala (ver, p.ex., Glacken, M.W., et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 28: 1376-1389, 1986; Glacken, M.W., *Bio/Technology* 6: 1041-1050, 1988; Bibila, T.A., et al., *Biotechnol. Prog.*, 10:87-96, 1994; e Borys, M.C., et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 43: 505-514, 1994).

Para nossa surpresa, a substituição desses aminoácidos eliminados resultou numa acentuada queda na produção de AAV. Por exemplo, nas experiências abaixo descritas, suplementando o meio standardizado (DMEM) com asp e glu adicionais levou a uma queda na eficiência de produção de mais do que uma ordem de magnitude (desde cerca de 1800 partículas resistentes a DNase (DRPs) a cerca de 140 partículas DRP por célula), embora a viabilidade seja ligeiramente aumentada.

Outro componente comum do meio para o crescimento de células mamárias produtoras é um componente sérico, tal como soro fetal bovino (FBS), que está tipicamente incluído no meio do um nível de cerca de 10%. Como abaixo descrito, quando o nível sérico para a produção de AAV foi aumentado (até 20%), a produção de vetores AAV desceu mais do que 2 vezes. Em contraste, quando as células foram submetidas a

níveis progressivamente mais baixos de soro, a produção de vetores AAV aumentou drasticamente. Por exemplo, quando os níveis de soro foram reduzidos até 1/10 dos níveis iniciais normais (i.e., a 1%), a produção de vetores aumentou mais do que 4 vezes.

Sem pretender estar preso por qualquer teoria, parece agora que o stress nas células produtoras, seja metabolicamente ou por outros meios abaixo descritos, pode dramaticamente aumentar a produção de AAV.

O stress pode ser efetivamente caracterizado, e testado, com base no efeito negativo da condição de stress ou agente de stress no crescimento e/ou metabolismo celular. Com efeito, o stress podem ser atingido através da introdução de qualquer condição ou agente que inibe o crescimento celular e/ou metabolismo, ou através da alteração do nível de uma condição ou agente pré-existente que se torna sub-ótimo no que respeita ao crescimento e/ou metabolismo celular. Uma grande variedade dessas condições são conhecidas ou aparentes, incluindo stress nutricional (um ou mais nutrientes presentes a níveis sub-ótimos para o crescimento e/ou metabolismo), stress de temperatura (temperatura subótima, que pode incluir o crescimento de células a temperaturas mais baixas ou mais elevadas), ou sujeitar as células a choques temporários de temperatura tais como um choque de temperaturas baixas ou altas), stress osmótico (nível osmótico sub-ótimo, que pode ser hipo-osmótico ou hiper-osmótico), stress de pH (pH sub-ótimo que pode ser ácido ou alcalino), stress de aeração (p.ex, níveis sub-ótimos de troca de oxigénio ou gás), stress mecânico (p.ex., stress de cisalhamento como aquele ocorrendo na agitação de cultura), stress radiativo, e stress tóxico (presença de um ou mais químicos ou outros agentes que inibam o crescimento e/ou metabolismo) Com a

maioria se não a totalidade de tais agentes e condições, é possível submeter continuamente ou temporariamente as células a stress. Por via de ilustração, no caso do stress de temperatura, as células podem ser crescidas a temperaturas que são acima ou abaixo da temperatura ótima (tipicamente a temperatura ótima é a temperatura fisiológica normal do animal a partir do qual as células são derivadas), ou as células a serem submetidas a um choque temporário de temperatura, tal como um choque a temperaturas baixas ou um choque a temperaturas altas. Exemplos presentemente preferenciais de tais condições de stress incluem: stress nutricional, tal como limitação de aminoácidos ou soto, a alteração dos níveis de aeração e agitação, a alteração dos níveis osmóticos (p.ex., usando hidratos de carbono não-metabolizáveis tais como o sorbitol), e a inclusão de agentes químicos, tais como ácidos carboxílicos alifáticos saturados (p.ex., ácidos propiónico, butírico, isobutírico, valérico e caprício e seus sais com bases orgânicas ou inorgânicas), diaminas N,N'-diaciladas (tais como pentametenobisacetamida, hexametenobisacetamida e heptametenobisacetamida), compostos orgânicos sulfurosos (tais como dimetilsulfóxido), e glucocorticóides (tais como hidrocortisona dexametasona, prednisolona, aldosterona, triamcinolona e cortecotona). Outros agentes incluem agentes genotóxicos tais como carginogénicos químicos, UV, choque de temperatura, inibidores metabólicos da síntese de DNA (p.ex., hidróxiureia, metotrexato, apidicolina, fármacos que afectam topoisomerasas (p.ex., amsacrina, camptecina, etoposido e novobiocina).

Como acima registado, as células produtoras podem também ser sujeitas a stress sub-letal por alteração do pH. Como abaixo exemplificado, descobrimos que o stress de pH induzido por elevação do pH do meio não apenas aumentou

AAV, mas também causou uma mudança dramática nas proporções relativas de AAV que foram libertadas do meio de cultura. Como adicionalmente descrito abaixo, esta técnica pode assim ser usada para facilitar a purificação de AAV como também aumentar a produção.

Procedimentos ilustrativos para a otimização da produção de AAV através da utilização de várias condições de stress são abaixo fornecidas. Como são resultados demonstrando que a aplicação de uma variedade de diferentes condições de stress pode ser usada para efetivamente aumentar os níveis de produção de AAV

Uso de rAAV para terapia genética

Aqui descritas estão composições de vetores compreendendo polinucleótidos com uma sequência genética terapeuticamente relevante. Os vetores víricos AAC desta descrição podem ser usados para administração a um sujeito para propósitos de terapia genética. Doenças adequadas para terapia genética incluem mas não estão limitadas aquelas induzidas por infecção víricas, bacterianas, ou parasíticas, várias condições malignas e hiperproliferativas, condições autoimunes, e deficiências congénitas.

A terapia genética pode ser conduzida para aumentar o nível de expressão de uma proteína particular no interior de uma célula ou secretada por ela. Os vetores aqui descritos podem ser usados para modificar geneticamente células seja por marcação genética, substituição de um gene ausente ou defetivo, ou inserção de um gene terapêutico. Alternativamente, um polinucleótido pode ser fornecido à célula para diminuir o nível de expressão. Isto pode ser usado para a supressão de um fenótipo indesejado, tal como

o produto de um gene amplificado ou sobreexpresso durante o curso de uma condição maligna, ou um gene introduzido ou sobreexpresso durante o curso de uma infecção microbiana. Os níveis de expressão podem ser diminuídos através da suplementação de um polinucleótido terapêutico compreendendo uma sequência capaz de, por exemplo, formar um híbrido estável com o gene-alvo ou o transcrito de RNA (terapia *anti-sense*) capaz de atuar como uma ribozima para clivar o mRNA relevante, ou capaz de atuar como um engodo para um produto do gene-alvo.

De particular interesse é a correção do defeito genético da fibrose cística, através da suplementação de um regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR) funcionante para o epitélio da vida respiratória. Afione et al. (J. Virol. 70:3235, 1996) e Conrad et. al. (Gene Therapy: in press. 1996) demonstraram estável transferência genética *in vivo* do gene CTR ao pulmão de primatas usando dosagens únicas de vetores AAV. Existem uma variedade de polipéptidos CFTR que são capazes de reconstruir as deficiências funcionais CFTR em células derivadas de pacientes com fibrose cística. Rich et al., Science, 253: 205 (1991) descreveram um derivado de CFTR com ausência dos aminoácidos 708-835, que foi capaz de transportar iões cloreto e capaz de corrigir o defeito CFTR de ocorrência natural. Egan et al., Nature, 358:581 (1992) descreveu outro derivado de CFTR (compreendendo cerca de 25 aminoácidos de uma proteína não-relacionada seguida pela sequência do CFTR nativo começando no resíduo 119) que foi também capaz de restaurar as características eletrofisiológicas do CFTR normal. Arispe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1539 (1992) mostrou que um fragmento de CFTR compreendendo os resíduos 433-586 foi suficiente para reconstituir um canal de iões cloreto corrigidos em bicamadas lipídicas. Sheppard et al., Cell

76: 1091 (1994) mostrou que um polipéptido CFTR truncado no resíduo 836 até cerca de metade do seu comprimento era capaz de construir um canal de íons cloreto regulado. Assim, vetores AAV com sequências codificantes para a proteína CFTR nativa, e mutantes e fragmentos relacionados, são preferidos.

Também de interesse particular é a correção do gene de supressão tumoral p53, localmente defetivo em certos tipos de tumores, através do fornecimento de um gene p53 de função normal ao local do tumor (Huyghe et al., Human Gene Therapy 6:1403, 1995).

Composições aqui descritas podem ser usadas *in vivo* como *ex vivo*. A terapia genética *in vivo* compreende a administração dos vetores aqui descritos diretamente a um sujeito. Composições farmacêuticas podem ser fornecidas como soluções ou suspensões líquidas, como emulsões, ou como formas sólidas adequadas para dissolução ou suspensão num líquido antes de uso. Para administração no trato respiratório, um modo de administração preferencial é por aerossol, usando uma composição que fornece um aerossol sólido ou líquido quando usado com um dispositivo aerossolizante apropriado. Outro modo preferencial de administração no trato respiratório é usando um broncoscópio de fibra ótica para infundir os vetores. Tipicamente, os vetores virais encontram-se num tampão apirogênico farmacêuticamente aceitável tal como uma solução de Ringer salina ajustada (pH 7,4). Embora não requeridas, as composições farmacêuticas podem ser opcionalmente fornecidas numa forma de dosagem unitária adequada para administração numa quantidade precisa.

Uma quantidade eficaz de vírus é administrada, dependendo dos objetivos do tratamento. Uma quantidade eficaz pode ser

dada numa dose individual ou dividida. Onde uma baixa percentagem de transdução pode curar uma deficiência genética, então o objetivo do tratamento é geralmente atingido ou excedendo este nível de transdução. Nalgumas circunstâncias, este nível de transdução pode ser obtido por transdução de pelo menos 1 a 5% das células-alvo, mas é mais tipicamente 20% das células do tipo de tecido desejado, usualmente pelo menos cerca de 50%, preferencialmente pelo menos cerca de 80%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 95%, e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 99% das células do tipo de tecido desejado. Como guia, o número de partículas víricas presentes numa dose única dada por broncoscopia será geralmente de pelo menos cerca de 1×10^8 , e é ais tipicamente 5×10^8 , 1×10^{10} , e em algumas ocasiões 1×10^{11} partículas, incluindo tanto partículas resistentes a DNase e suscetíveis a DNase. Em termos de partículas resistentes a DNase, a dose encontrar-se-á geralmente entre 1×10^6 e 1×10^{14} partículas, mais geralmente entre cerca de 1×10^8 e 1×10^{12} partículas. O tratamento pode ser repetido tantas vezes quanto as desejadas a cada duas ou três semanas, como requerido, embora o tratamento a cada 180 dias possa ser suficiente.

A eficácia da modificação genética pode ser monitorizada por vários critérios. Amostras removidas por biópsia ou excisão cirúrgica podem ser analisadas por hibridização *in situ*, amplificação via PCR usando sondas específicas para vetores, proteção por RNase, imunohistologia, ou contagem de células imunofluorescentes. Quando o vetor é administrado por broncoscopia, os testes de função pulmonar podem ser realizados, e a lavagem brônquica pode ser avaliada quanto à presença de citocinas inflamatórias. O sujeito tratado podem também ser monitorizados para as suas propriedades clínicas, e para determinar se as células

expressam a função desejada a ser veiculada pelo polinucleótido terapêutico.

A decisão sobre o uso de terapia *in vivo* ou *ex vivo*, e a seleção de uma composição particular, dose, e via de administração irá depender num número de diferentes fatores, incluindo mas não estando limitado às propriedades da condição e do sujeito a ser tratado. A avaliação de tais propriedades e o design de um regime terapêutico apropriado é ultimamente da responsabilidade do profissional de saúde prescritor.

A presente descrição fornecer, *inter alia*, métodos para a produção de preparações de alto título de vetores AAV recombinantes que são substancialmente livres de vírus adjuvantes (p.ex., adenovírus) e proteínas celulares. Será entendido que as variações possam ser aplicadas a esses métodos por aqueles habilitados no estado da técnica sem fugirem ao espírito e âmbito desta invenção.

Os exemplos abaixo apresentados são fornecidos como um guia adicional a um profissional de saúde ou alguém habilitado no estado da técnica, e não pretendem ser de modo algum limitativos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

PRODUÇÃO ILUSTRATIVA DE VETORES AAV RECOMBINANTES USANDO UM VÍRUS ADJUVANTE *WILD-TYPE* (AD5) E UM VÍRUS ADJUVANTE SENSÍVEL A TEMPERATURA (AD TS149)

Este exemplo ilustra o uso de um vírus adjuvante *wild-type* (Ad5) e um vírus adjuvante sensível a temperatura (Ad ts149) para fornecer funções adjuvantes para a replicação de uma partícula de vetor AAV recombinante compreendendo um gene terapêutico modelo.

O plasmídeo ptgAAVCF consiste de um ITR AAV2 à esquerda; um cDNA de comprimento total do regulador transmembranar de fibrose cística, uma sequência sintética poliadenilada baseada na sequência de poliadenilação murina β -globulina, as sequências AAV2 "a jusante" das sequências cocificantes *cap*; e a ITR AAV2 à direita num esqueleto do plasmídeo pBR322 (Afione et al., 1996). O plasmídeo pGEM-RS5 associado ao empacotamento foi derivado do plasmídeo pHIVrep (Antoni et al., 1991) e consiste das regiões U3 e R de HIV-1 LTR; as regiões *rep* e *cap* de AAV2 incluindo os promotores p19 e p40; as sequências dos plasmídeos pBR322 3 pGEM para replicação bacteriana e seleção; e uma pequena região de DNA Alu humano repetitivo celular a montante de HIV LTR.

Adenovírus tipo 5 foi crescido de um stock obtido a partir da American Type Culture Collection (Rockville, Md). Ad5ts149 (Ensinger et al., J. Virol. 10:328, 1972) foi obtido de Harold S. Ginsberg.

Os stocks utilizados de Ad5 e Ad5ts149 (ts149) foram produzidos a 37°C e 32°C; respetivamente, através da infeção de células 293-1 a uma multiplicidade de infeção (MOI) de 5 e 1; respetivamente. Após 4 horas as culturas foram alimentadas com meio fresco e incubadas a 37°C numa incubadora de CO₂ 10% humidificada. Após setenta e duas horas, as células foram removidas, centrifugadas a 1000 g a 15°C e ressuspensas em PBS contendo 0,1 g/L de MgCl₂ e 0,1 g/L CaCl₂. A suspensão celular foi então congelada e arrefecida três vezes, lisada três vezes através de uma agulha de seringa calibre 18 e clarificada por centrifugação a 1000 g a 15°C. O lisado clarificado foi então tratado com DNase I a um concentração final de 2 mg/ml durante 30 minutos a 37°C. O lisado tratado foi colocado num passo descontínuo de gradiente de CsCl em água compreendendo 4,0 ml de CsCl (1,25 g/cm³) colocada sob 2,0 ml de CsCl (1,40 g/cm³) em água e centrifugada a 35 000 rpm durante 1 a 2 horas num rotor Beckman SW41. A banda de adenovírus de cada tubo foi removida, conjugada e diluída em 1,35 g/cm³ CsCl em água e centrifugada *overnight* a 35 000 RPM num rotor Beckman SW55. A banda de adenovírus foi conjugada, ajustada a glicerol 10% e dializada extensivamente contra tampão Tris 10 mM pH 7,5 suplementado com 1,0 mM MgCl₂ e glicerol 10%.

células 293-1 (ATCC CRL 1573) foram mantidas em Frascos-T numa incubadora de CO₂ 10% humidificada em meio DMEM com alto teor de glucose (JRH) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS, Hyclone). Para este exemplo, as células 293-1 foram inoculadas a 4,4 x 10⁴ células/cm² em frascos de cultura de tecidos com DMEM suplementado com 10% FBS e 2,0 mM L-glutamina, e incubados por vinte e quatro horas a 37°C numa incubadora de CO₂ 10% humidificada.

As células (cerca de 10^7 células por frasco) foram então infectadas com stocks de Ad5 ou ts149 durante 1 hora a uma MOI de 5, seguida por transfeção transiente do vetor e plasmídeos associados ao empacotamento. Co-transfeção transiente do plasmídeo vetor ptgAAVCF e do plasmídeo adjuvante pGEM-RS5 foi realizada usando LIPOFECTAMINA™ (Gibco). Nesse processo, 37,5 µg de cada plasmídeo conjuntamente com 150 µl LIPOFECTAMINE™ foram misturados e diluídos em 4,75 ml de MEM desprovido de soro. O inóculo adenovírico foi removido e a mistura plasmídeo-LIPOFECTAMINA™ foi adicionada às células e incubadas durante quatro horas numa incubadora de CO₂ 5% à temperatura apropriada. The mistura plasmídeo-LIPOFECTAMINA™ foi removida da cultura após quatro horas e substituída por meio fresco.

Células infectadas com vírus *wild-type* foram cultivadas a 37°C e células infectadas com Adts149 foram incubadas a 39,5°C. Após 72 horas, as células foram recolhidas, centrifugadas e ressuspensas em 10 mM Tris pH 7,5. A suspensão foi então lisada por sonicação num banho de gelo-água usando um sonicador Branson de sonda ultrasónica utilizado por pulsos de 15 segundos e ensaiado para rAAVCF e produção adenovírica.

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 2**QUANTIFICAÇÃO DOS TÍTULOS DE RAAV E ADENOVÍRUS EM PREPARAÇÕES DE VETORES**

Lisados celulares do exemplo anterior foram analisados para a produção do vetor rAAVCF pelo ensaio de replicação C37 e analisados para a produção de adenovírus pro hibridização slot-blot.

HeLa C37 foi construído para permitir expressão induzível de proteínas AAV *rep* para a replicação de vetores rAAV. Sucintamente, uma cassete AAV de expressão *rep/cap* consistindo do promotor I metalotioneína murino, genes AAV2 *rep* e *cap* e local de terminação de transcrição AAV foi construído. Também incluído no plasmídeo foi o gene de resistência à neomicina sob o controlo do promotor precoce SV40, pequeno intrão T de SV40 e sinal de poliadenilação SV40. Células HeLa foram transfetada com o plasmídeo e clones foram selecionados em G418. Um painel de clones foi rastreado por um ensaio de amplificação de vetor rAAV. Um clone, C37, demonstrou amplificação consistente e dose-dependente do vetor rAAV seguido por transdução e infecção por adenovírus.

A deteção do vetor de replicação é acompanhada por isolamento de DNA seguido por hibridização a uma sonda CFTR. Em detalhe, células HeLa C37 foram inoculadas a $4,4 \times 10^4$ células/cm² em frascos de cultura de tecidos com DMEM suplementado com 10% FBS e 2,0 mM L-glutamina e incubadas por vinte e quatro horas a 37°C numa incubadora humidificada a 5 % CO₂. As células foram então inoculadas com adenovirus (MOI = 5) e diluições da amostra de rAAVCF durante 72 horas. As células foram recolhidas por raspagem

e preparadas para análise *Souther blot*. O DNA celular total foi preparado, digerido com EcoRI, submetido a eletroforese em 1% de gel de agarose, transferido a uma membrana 66 de nylon seguida por hibridização com um fragmento de restrição de cDNA CFTR humano marcado com ^{32}P . Esta sonda deteta um fragmento de aproximadamente 1,5 kb de um vetor AAVCF (correspondendo ao fragmento EcoRI 1,488 kb previsto). A replicação do vetor foi quantificada por uma banda de CFTR genômica endógena e é expressada em unidades de replicação. Uma unidade de replicação (RU) é definida como uma intensidade de sinal equivalente à da banda CFTR genômica endógena que é de aproximadamente 1,8 kb. Nalgumas experiências, a regressão linear de padrões de vetores conhecidos serialmente diluídos foi usada para extrapolar e calcular a concentração dos vetores nas amostras.

O slot blot de DNA adenovírico foi conduzido como se segue. Alíquotas das amostras foram desnaturadas em 0,4M NaOH, 10 mM EDTA com 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmão a 65°C. As amostras e os padrões de adenovírus foram diluídos e filtrados em membranas de nylon usando uma cópia slot blot e lavadas com 0,4M NaOH. O filtro foi hibridizado com uma sonda marcada com ^{32}P correspondendo à sequência genética E1A adenovírica. O genoma Ad5 completo está disponível na base de dados Genbank sob o código de acesso X02996. Usamos um fragmento de 1 kb SspI-XbaI (correspondendo aos nucleótidos 339-1339) e analisamos os blots num leitor de fósforo (Molecular Dynamics). Um genoma equivalente foi considerado ser equivalente a uma partícula adenovírica.

A **Figura 1** mostra os resultados do ensaio de replicação para o vetor rAAVCF em lisados preparados com Ad5 ou ts149 a temperaturas permissivas (37°C) e não-permissivas (39,5°C). A produção do vetor recombinante foi auxiliada por ts149 a 39,5°C mas a

produtividade foi aproximadamente 2 a 3 vezes inferior à de Ad5.

Figura 2 mostra os resultados do ensaio slot blot para determinar a quantidade de adenovírus. A produção de genomas adenovíricos foi reduzida em 3-4 logs através do uso de um mutante sensível a temperatura quando comparado com a variante *wild-type*.

EXEMPLO 3

OPIMIZAÇÃO DA FUNÇÃO ADJUVANTE PARA MELHORAR A PRODUÇÃO DE RAAV

Este exemplo ilustra várias tentativas para melhorar o nível de rAAV obtido quando usando vírus adjuvantes sensíveis a temperatura. Níveis de infecção crescentes do vírus adjuvante não se revelaram úteis, mas ajuste da cinética foi surpreendentemente eficaz.

Os efeitos do aumento da multiplicidade de infecção na produção de vetores foram primeiramente analisados. Células 293-1 foram infetadas com Ad5 a uma MOI de 5 ou ts149 a vários MOI, seguidos por co-transfecção transiente com vetores e plasmídeos associados ao empacotamento.

Após 72 horas, as células foram lisadas e analisadas para a produção de vetores rAAVCF por um ensaio de replicação do vetor C37 e analisadas para a produção adenovírica por hibridização slot-blot. Num ponto de amostragem adicional às 96 horas foram recolhidas células infetadas com ts149 a uma MOI de 5.

A **Figura 3** mostra os resultados do ensaio de replicação rAAVCF conduzido em lisados celulares preparados com ts149 a vários MOI. Aumentando o MOI de ts149 não restaurou a produtividade dos vetores a níveis observados com Ad5 (como mostrado pela intensidade na banda de hibridização a 1,4 kb). Contudo, o nível mais elevado de produção de vetor foi observado no ponto de amostragem às 96 horas. A concentração de ts149 no lisado detectada por análise slot blot aumentou com o aumento de MOI, mas permanecendo 3 a 4 logs abaixo do apresentado por Ad5.

Após a observação da produtividade de vetor aumentada com ts149 às 96 horas na experiência anterior, um estudo em função do tempo e da cinética de produção foi realizado. Células 293-1 foram infectadas com Ad5 ou ts149 a uma MOI de 5, seguida por co-transfecção transiente com vetores e plasmídeos associados ao empacotamento. As células infectadas com Ad5 e ts149 foram cultivadas a 37 °C e 39,5 °C; respectivamente, durante 6 dias. Os lisados dos dias 3, 4, 5 e 6 foram analisados quanto à produção de vetores por um ensaio de replicação do vetor e analisada quanto a adenovírus por hibridização slot-blot.

A **Figura 4** ilustra a cinética da produção de vetores. As barras sólidas representem lisados produzidos usando Ad5 *wild-type* como adjuvante; barras com padrão representam lisados produzidos usando ts149 como adjuvante. A produção máxima de vetor quando usando Ad5 foi de $\sim 2,0 \times 10^6$ RU/ml, com um pico ao dia 4. Neste ponto de amostragem, a produção do vetor usando ts149 foi menos do que $\sim 0,3 \times 10^6$ RU/ml. No dia 5, contudo, existiu uma alteração drástica na eficácia relativa dos dois vírus adjuvantes. A produção do vetor auxiliada por Ad5 desceu até abaixo dos $0,3 \times 10^6$ RU/ml. Em contraste, a produção do vetor auxiliada por ts 149 subiu

acima de 2×10^6 RU/ml. Os níveis genômicos adenovíricos observados quando usando ts149 foram significativamente mais baixos que os de Ad5.

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 4

TÉCNICAS DE ENSAIO DE ALTA EFICIÊNCIA DE TÍTULOS VIRAIS

Os stocks de adenovírus sensíveis a temperatura e *wild-type* usados nos exemplos anteriores foram produzidos em células 293-1 em frascos de cultura de tecidos. Neste exemplo, os níveis de adenovírus a serem produzidos por células 293-1 foram quantificados por ensaio TCID₅₀ ou por ensaio de infecciosidade.

O ensaio TCID₅₀ foi conduzido como se segue: $1,0 \times 10^3$ células 293-1 foram plaqueadas numa microplaca de 96-poços e infetadas com diluições seriadas de stock adenovírico e permitidas incubar a 37°C numa incubadora de CO₂ 5% humidificada. Oito réplicas de 100 µl para cada diluição foram inoculadas nas células. Três dias após a infecção as células foram fixadas com metanol, lavadas com PBS e coradas com anticorpo anti-exão conjugado a FITC (Biodesign) seguido por marcação com iodeto de propídio para visualizar o núcleo da célula. Após lavagem com PBS, a placa foi examinada num microscópio de fluorescência e avaliada quanto à presença de células contendo exão. O título final foi calculado usando uma distribuição de Poisson. Uma diluição de vírus que produz 50% de amostras replicadas com exão positivo possui 0,5 IU/100 µl de

inóculo e 10 (fator de conversão para mL) para originar o título infeccioso final por mL.

Um ensaio de infecciosidade microtítulo de alta-eficiência para mediar os vírus infecciosos foi conduzido como se segue. Aliquotas (10 µl) de sobrenadantes sem células serialmente diluídas foram inoculadas em células HeLa crescidas em microplacas de 96-poços. Após três dias, as células infetadas foram tratadas e lisadas com uma solução de desnaturação adição de 1/10 do volume de 4,0 M NaOH, 10 µg/ml DNA de esperma de salmão e 100 mM EDTA). O lisado foi transferido para uma placa Silent Monitor BiodyneB (Pall) e filtrado por vácuo para uma membrana de nylon. A membrana foi lavada, desnaturada, hibridizada com com fragmento de restrição cDNA E1A adenovírico marcado com ^{32}P e analisado num leitor de fósforo (Molecular Dynamics). Análise de regressão linear de padrões de adenovírus serialmente diluídos foi usada para calcular os títulos de adenovírus infecciosos em amostras, usando padrões de adenovírus titulados pelo ensaio TCID₅₀.

A produtividade específica de vírus foi calculada por normalização dos títulos víricos infecciosos no lisado relativamente ao número de células aquando do tempo de infeção. Os resultados são apresentados na Tabela 1:

TABELA 1: Produção de adenovírus			
Adenovirus	Linha celular	Produtividade específica (IU/células)	Ensaio
Ad5	293-1	125	TCID ₅₀
	HeLa S3	400	TCID ₅₀
Ad5ts149	293-1	10	TCID ₅₀
	293-1	16	infecciosidade microtítulo
	293-1	15	infecciosidade microtítulo
	293-1	10	infecciosidade microtítulo

Estes resultados mostram que a produção específica de Adts149 em células 293-1 foi um a dois logs abaixo da de Ad5.

Uma preparação de vírus Ad5 de título conhecido mostrou uma gama linear estendendo-se de 12,5 a 500 IU/poço com base numa regressão linear de um ensaio de infecciosidade microtítulo.

Combinando um ensaio de infecciosidade viral com um formato de ensaio de microtítulo como acima descrito resultou numa técnica que é simultaneamente rápida e quantitativa, e que é altamente adequada a automação.

O ensaio de infecciosidade de alta-eficiência como acima descrito pode também ser aplicado na análise de outros vírus (p.ex., rAAV r wtAAV). O ensaio pode ser realizado essencialmente como acima descrito usando células mamárias apropriadas (p.ex, células HeLa C37 para rAAV e células 293

para wtAAV) e sob condições permissivas para a replicação do vírus a ser analisado (p.ex., na presença do vírus adjuvante para rAAV e wtAAV); e então os lisados podem ser preparados e ácidos nucleicos nos referidos lisados podem ser transferidos para uma membrana como acima descrito. A hibridização da membrana contendo o conjunto de ácidos nucleicos combinados (cada conjugação a ser libertadas das células do poço de cultura correspondente) é tipicamente realizada com uma sonda específica para vírus adequada (p.ex., uma sonda específica para AAV *rep* e/ou *cap* pode ser usada para detetar wtAAV, ou uma sonda específica para um transgene inserido pode ser usada no caso de um vetor AAV recombinante).

O ensaio de infecciosidade de alta-eficiência acima descrito exibiu uma resposta linear na determinação de títulos de rAAV ao longo de uma faixa relativamente alargada de concentrações. Por exemplo, quando uma preparação vírica de conhecido título (como determinado por um ensaio de infecciosidade modificado) foi diluída serialmente 1:2, começando com 2400 unidades de infeção ou "IU"/poço, e usada como padrão para a determinação do título de duas preparações purificadas de tgAAVCF de título desconhecido cada uma das quais foi serialmente diluída 1:5, o ensaio de microtítulo mostrou uma gama de linearidade estendendo-se de 75 a 600 IU/poço com base numa regressão linear. A determinação do título de wtAAV preferencialmente empregou um formato de diluição limitante (por exemplo, quando oito diluições limitantes seriais de uma preparação wtAAV de título conhecido foram analisadas, o título determinado pelo ensaio de microtítulo foi essencialmente o mesmo que o determinado pelo ensaio TCID₅₀ estandardizado, 3×10^9 IU/ml).

Seja com diluição limitante ou por comparação com um padrão conhecido, um título vírico infeccioso pode ser determinado correspondendo aos títulos determinados por técnicas mais clássicas (p.ex., o ensaio de infecciosidade ou a análise TCID₅₀). Além do seu uso na determinação de títulos víricos, este ensaio de infecciosidade de alta-eficiência tem muitos outros usos, incluindo, mas não estando limitado a, rastreio de linhas celulares permissivas e não-permissivas para replicação vírica e infecciosidade (p.ex., através da inclusão de linhas celulares mamárias ou variantes relacionadas em diferentes poços de um conjunto microtítulo); assim como o rastreio de agentes que afetam a replicação vírica (p.ex., através da inclusão de vários agentes em diferentes poços de um conjunto microtítulo como acima descrito e determinar os efeitos dos agentes do título infeccioso resultante do vírus. Entre outras coisas, a capacidade para rapidamente rastrear agentes ou condições que aumentam a infecciosidade e/ou replicação viral é particularmente útil no contexto do desenvolvimento ou otimização da produção de vetores víricos. Por outro lado, a capacidade para rapidamente rastrear agentes ou condições que limitam a infecciosidade (replicação vírica é de extrema utilidade no contexto de identificação de terapêuticas anti-víricas.

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 5**DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS EM SUSPENSÃO PARA A PRODUÇÃO DE VIRIS ADJUVANTES**

O exemplo anterior mostra que os níveis de adenovírus sensíveis a temperatura produzidos por técnicas de cultivo convencionais são baixos. Isto limita a capacidade para de usar adenovírus sensíveis a temperatura como adjuvantes na produção de vetores AAV. O presente exemplo fornece um método melhorado que permite a produção de adenovírus sensíveis a temperatura em quantidades muito mais elevadas. Central ao desenvolvimento é o uso de células hospedeiras crescidas em culturas em suspensão.

As células 293 N3S e HeLa S3 são variantes de crescimento em suspensão da linha celular 293-1 de rim embrionário humano e da linha celular HeLa do carcinoma epitelial humano, respetivamente. A cultura em suspensão foi realizada em frascos rotativos de 500 ml (Bellco) com volumes de 250 a 300 ml. Células HeLa S3 (ATCC 2,2-CCL) foram mantidas em DMEM/F-12 com 15 mM HEPES suplementado com 7,5% FBS e 2,0 mM L-glutamina. As células 293-1 N3S (Microbix Biosystems Inc.) foram passadas em meio Joklik MEM suplementado com 7,5% FBS e 2,0 mM L-glutamina. Os frascos rotativos foram agitados a 50-65 RPM.

A performance de crescimento foi avaliada na seguinte experiência, com as células 293 N3S e HeLa S3 a serem passadas serialmente em suspensão em replicados em frascos rotativos de 500 mL com monitorização do crescimento e viabilidade celular. Os frascos foram inoculados a densidades celulares de 2 a 5×10^5 células/ml e depois cultivados durante 2 a 3 dias. Para controlar as diferenças

nas densidades de plaqueamento, os níveis de duplicação das populações (PDLs) foram comparados para as réplicas de cultura. O PDL médio foi de $2,0 \pm 0,49$ (média \pm DP) e $1,1 \pm 0,62$ para células HeLa S3 e 293 N3S; respetivamente (n=14). Números de duplicação celular mais elevados foram consistentemente observados com as células HeLa S3. A morfologia celular em suspensão revelou-se dramaticamente diferente para as duas linhas celulares. As células HeLa crescem como células isoladas ou pequenos agregados. Em contraste, as células 293 N3S formaram grandes agregados de 50 a 100 células cada. Números significativos de células não-viáveis foram observados no centro dos agregados maiores. Os stocks foram cultivados por centrifugação seguida por leve disrupção com uma pipeta libertando as células não-viáveis dos agregados. As viabilidades celulares iniciais de 293 N3S em cultura foram consistentemente mais baixas quando comparadas com HeLa S3.

Baseados no crescimento celular, viabilidade e morfologia em suspensão, a linha celular HeLa S3 foi selecionada para desenvolvimento adicional do processo. O crescimento e viabilidade a temperaturas permissivas foi avaliado. As células HeLa S3 foram plaqueadas em frascos rotativos de 500 ml a 5×10^5 células/ml, e monitorizadas diariamente durante 7 dias.

A **Figura 5** mostra a densidade de células viáveis (VCD) de células HeLa S3, crescidas a 32°C (quadrados) e 37°C (círculos). As barras próximas dos pontos de amostragem a 32°C indicam a gama de valores observados em réplicas de frascos rotativos de 500 mL. As células crescidas a 37°C apresentaram um pico a $2,5 \times 10^6$ células/ml no dia 5, enquanto células crescidas a 32°C apresentaram um pico a 2×10^6 células/ml no dia 6. A viabilidade (como determinada

por exclusão de azul de tripiano) foi de pelo menos 90% ao longo do ensaio.

Filtração de fluxo tangencial ou filtração de fluxo cruzado é uma técnica versátil para uma grande variedade de aplicações biofarmacêuticas de larga-escala incluindo concentração e remoção de células, concentração de macromoléculas e troca de meio/tampão. O processamento de fluxo tangencial é requerido para a concentração de células para infecção e para a recolha de células infetadas a uma larga-escala.

O efeito da disrupção laminar na viabilidade celular por filtração de fluxo tangencial foi avaliado através da concentração e diafiltração de células HeLa S3. As células HeLa S3 foram inoculadas a uma densidade de 4×10^5 células/ml em biorreatores Applikon de 3 litros e cultivadas a 2×10^6 células/ml em DMEM/F-12 com 15 mM HEPES (JRH) suplementado com 7,5% FBS, 2,0 mM glutamina, 1 X MEM aminoácidos. 1 X meio MEM não-essencial aminoácidos, 0,1% Pluronic poliol F-68 e 2g/L glucose. O volume utilizado do biorreator foi de dois litros. O oxigénio dissolvido, pH, temperatura, e agitação foram controlados a 60% (relativamente à saturação do ar), 7,2, 37°C e 100 rpm; respetivamente, usando um sistema de controlo FERMCON™ (Sciur Corporation).

Experiência de filtração de fluxo tangencial foram realizadas com membranas de fibras ocas de mistura de celulose-éster (Microgon) O tamanho do poro e a área de superfície foi de 0,2µm e 725 cm²; respetivamente. Um filtro de 0,2 µm foi selecionado para reter células enquanto permite a passagem do meio de cultura. As células foram bombeadas (Cole Palmer) através do diâmetro interno das fibras ocas. As taxas de recirculação foram ajustadas

para fornecerem taxas de cisalhamento de 750 e 1500 sec^{-1} . Uma vez tendo sido estabelecido o fluxo cruzado, controle de fluxo de permeação de 30 e 90 ml/min; respectivamente, foi obtido com uma bomba (Cole Palmer) localizada na linha de permeação. Durante a concentração de células, a remoção da permeação continuou até que a concentração aumentada desejada fosse obtida. Durante a diafiltração, a entrada de meio no biorreator foi ativada até que a troca de meio desejada fosse obtida. As células viáveis foram contadas antes e após cada tratamento.

A **Figura 6** mostra as curvas do gráfico para as células HeLa S3 antes e após o processamento de fluxo tangencial numa experiência exemplificativa. Dois litros de células foram cultivados em biorreatores de 3 litros. No dia 3 (seta), as células foram concentradas sete vezes a partir do volume utilizado de 2 litros, diafiltradas contra seis volumes de meio de crescimento e devolvidas ao volume utilizado original. Os resultados mostram que as células não foram danificadas por cisalhamento de 750 sec^{-1} (quadrados) e 1500 sec^{-1} (círculos), e continuaram a crescer até elevadas densidades celulares.

Culturas em suspensão de células HeLa S3 foram então testadas como células hospedeiras para a produção de ts149, ou a sua capacidade em culturas em suspensão de 300 ml foi investigada. Células HeLa S3 de culturas em suspensão de 300 ml (1×10^6 células/ml) foram centrifugadas, concentradas e infetadas com ts149 (MOI = 3). Após 1 hora, a cultura foi transferida para um frasco rotativo, ressuspensa em meio e cultivada durante 7 dias a 32°C. As células HeLa S3 continuaram a crescer desde cerca de 1×10^6 células/ml no momento da infecção até cerca de 2×10^6 células/ml no dia 5. A viabilidade decresceu ~60 % no dia 7.

A **Figura 7** mostra a produção de ts149 por culturas de células HeLa S3. A cultura foi amostrada diariamente, e os lisados foram preparados por congelamento/descongelamento para a análise da produção vírica pelo ensaio de infecciosidade adenovírica. A produção de vírus atingiu $\sim 4,5 \times 10^7$ IU/ml de cultura aproximadamente no dia 3-5. No dia 7, as células foram recolhidas por centrifugação, ressuspensas em tampão TMEG e lisadas por microfluidização (MF). O título infeccioso do lisado microfluidizado foi comparável aquele da amostra do lisado congelado/descongelado indicando que a recuperação por microfluidização é comparável à dos métodos de congelamento/descongelamento.

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 6

MÉTODO MELHORADO DE PURIFICAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BÍRUS ADJUVANTES SENSÍVEIS A TEMPERATURA (AD TS149)

A purificação usando gradientes de CsCl é onerosa para a produção em larga-escala. Este exemplo ilustra a purificação de ts149 por cromatografia de troca iônica.

A cromatografia foi realizada num sistema de cromatografia Perseptive Biosystem BIOCAD™. A resina usada foi uma resina de troca aniônica à base de polietileneimina (PI) (POROS™ 50 PI). A coluna foi equilibrada com TMEG (50 mM Tris, pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 % glicerol). A cromatografia foi monitorizada em tempo-real para pH, condutividade e densidade óptica a 280 nm.

Suspensões celulares de células HeLa S3 infetadas com ts149 a uma MOI de 2 foram recolhidas e centrifugadas. O *pellet* foi ressuspensão em TMEG e lisado por cavitação a 3000 PSI usando um microfluidizador (Microfluidics). O lisado foi clarificado por filtração através de um filtro de seringa de 5 μm (Millex SV) seguido por um filtro de seringa de 0,45 μm (Acrodisc). O lisado clarificado foi adicionado a uma coluna de troca aniônica de 1,6 ml POROS™ 50 PI a 1 ml/min. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de TMEG com 900 mM NaCl, e o ts149 foi eluído com um gradiente linear de 900 a 1300 mM de NaCl. Frações de 0,5 ml foram recolhidas e analisadas por ensaio de infecciosidade e slot blot para a presença de adenovírus.

A **Figura 8** mostra os resultados do ensaio de infecciosidade conduzido em frações de coluna consecutivas. A maioria dos adenovírus infecciosos foi encontrada nas frações 26 a 28, coincidentes com o pico de absorvância eluindo a cerca de 100 ms a aproximadamente 25 minutos. O ts149 foi eluído imediatamente antes do pico maior a concentrações de sal mais elevadas. Os ensaios de infecciosidade e slot blot conduzidos em paralelo confirmaram que partículas e vírus infecciosos estavam presentes das mesmas frações do pico.

As frações do pico do lisado e PI foram também analisadas para a proteína total pelo método de Bradford. A concentração de proteína foi de 1,8 mg/ml no lisado e menos do que 30,0 $\mu\text{g/ml}$ no conjugado PI. Os viriões foram separados da maioria das proteínas celulares num passo único e eluídos como um pico único. Os viriões mostraram uma afinidade muito elevada para a matriz PI, como evidenciado pela concentração de sal relativamente alta requerida para os eluir da coluna.

Um método de produção em larga-escala para a produção de vírus adjuvantes sensíveis a temperatura pode incorporar todas as melhorias descritas neste exemplo. Numa ilustração, a produção de vírus iria compreender os seguintes passos:

- Cultura de células em suspensão num biorreator
- Concentração/Troca de meio
- Infeção com vírus adjuvantes
- Produção de vírus
- Recolha: Concentração/Diafiltração
- Lise por microfluidização
- Cromatografia de troca-iónica com PI
- Concentração/Diafiltração
- Filtração esterilizada

Este tipo de abordagem é integralmente escalável e adaptável às Boas Práticas de Produção.

Ilustrações adicionais exemplificativas de tais técnicas são abaixo fornecidas.

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 7**COMPARAÇÃO DOS PROCESSOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE VÍRUS ADJUVANTES****A. Produção e Processamento Ilustrativos de Primeira Geração de Vírus Adjuvantes**

Num processo exemplificativo de "primeira geração" para a produção de vírus adjuvantes, células mamárias foram crescidas em 40 frascos T225, e depois infetadas com Ad5 a uma MOI de cerca de 1.

Após incubação, as células recolhidas por centrifugação, e lisadas por congelamento-descongelamento e passagem através de uma agulha de seringa. O lisado foi sujeito a tratamento com DNase I e depois corrido num passo em gradiente de CsCl e gradiente isopícnico. O material purificado foi dializado e esterilizado por filtração.

Usando este processo de primeira geração, obtivemos aproximadamente 1×10^{12} partículas (ou aproximadamente 1×10^{11} unidades infecciosas) a partir de 4×10^8 células.

B. Produção e Processamento Ilustrativos de Segunda Geração de Vírus Adjuvantes

Num processo exemplificativo "segunda geração" para a produção de vírus adjuvantes, células mamárias (HeLa S3), foram crescidas em biorreatores de 10 litros, e depois

infetadas com Ad5 (da ATCC, subseqüentemente purificadas em placa com células 293, serialmente expandidas em células HeLa S3 e duplamente purificadas por centrifugação em gradiente de CsCl) a uma MOI de cerca de 1. Após incubação, as células foram concentradas e recolhidas por diafiltração, e lisadas por microfluidização. O lisado foi sujeito a tratamento com benzonase (nuclease) e depois filtrado. O filtrado foi então corrido numa coluna de troca aniônica (PI), concentrado e diafiltrado, e finalmente esterilizado por filtração.

Usando este processo de segunda geração, obtivemos aproximadamente 1×10^{14} partículas (ou aproximadamente 5×10^{12} unidades infecciosas) das 1×10^{10} células.

A **Figura 9** ilustra os resultados do processamento "a jusante" do vírus adjuvante usando cromatografia de troca aniônica como acima descrito. Barras: atividade viral medida num ensaio de infecciosidade; linha sólida: A_{280} ; linha a tracejado: condutividade do tampão (ms).

Como é aparente da comparação do fracionamento da atividade vírica versus absorvância A_{280} , estes procedimentos de processamento resultara numa separação substancial do vírus adjuvante relativamente ao grosso dos materiais contaminantes que seria expectável conterem proteínas celulares e ácidos nucleicos.

EXEMPLO 8**COMPARAÇÃO DOS PROCESSOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE VETORES AAV RECOMBINANTES****A. Produção e Processamento Ilustrativos de Primeira Geração de rAAV**

Num processo exemplificativo de "primeira geração" para a produção de vetores rAAV, células mamárias foram descritas em 40 frascos T225, e depois infetadas com Ad5 a uma MOI de cerca de 5. Após incubação, as células foram recolhidas por centrifugação e lisadas por sonicação. O lisado foi sujeito a tratamento com DNase I e depois corrido numa série de dois gradientes CsCl. O material purificado foi dializado e esterilizado por filtração. Usando este processo de primeira geração, obtivemos aproximadamente 5×10^6 unidades replicativas RUs de 4×10^8 células.

B. Produção e Processamento Ilustrativos de Segunda Geração de rAAV

Num processo exemplificativo de "segunda geração" para a produção de vetores rAAV, células mamárias foram crescidas em biorreatores de 10 litros, e depois infetadas com Ad5 a uma MOI de cerca de 5. Após incubação, as células foram concentradas e recolhidas por diafiltração, e lisadas por microfluidização. O lisado foi sujeito a tratamento com benzonase (nuclease) e depois filtrado. O filtrado foi então corrido numa coluna de troca aniónica, seguida por uma coluna de troca catiónica. As frações eluídas contendo AAV

foram conjugadas, concentradas e diafiltradas, e finalmente esterilizadas por filtração. Este processo de segunda geração espera-se que produza mais do que 1×10^{11} unidades replicativas Rus a partir de 1×10^{10} células.

A **Figura 10** mostra os resultados do fracionamento sequencial em colunas de troca-iónica: primeiro uma matriz de troca aniónica (painel superior), e depois uma matriz de troca catiónica (painel inferior). Barras: atividade vírica medida num ensaio de infecciosidade para adenovírus ou AAV, linha sólida: A_{280} (uma medida da proteína total); linha a tracejado: condutividade do tampão (ms). Como é aparente pelas frações analisadas, é possível obter-se níveis extremamente elevados de separação entre AAV e adenovírus, assim como entre AAV e o material absorvente a A_{280} (maioritariamente proteínas) usando as técnicas da presente invenção. Em particular, os resultados revelaram que os vetores AAV podem ser retidos em ambas as colunas de troca aniónica e catiónica, e que a eluição diferencial de AAV usando a troca aniónica e catiónica resultou numa capacidade dramaticamente aumentada de separar AAV de todos os principais contaminantes de interesse (incluindo adenovírus assim como proteínas celulares).

Noutro processo exemplificativo de segunda geração para a produção de vetores rAAV, o filtrado foi preparado como acima descrito e depois corrido numa coluna de troca aniónica, seguida por conjugação das frações eluídas contendo AAV, e depois sujeitando-as a filtração de fluxo tangencial (TFF). Como abaixo descrito, foi descoberto que este procedimento da troca aniónica até TFF resultou numa preparação altamente concentrada e purificada de AAV.

Análise detalhada de AAV obtidos usando esta tecnologia de segunda geração, usando técnicas tais como as acima

descrita e no estado da técnica (incluindo ensaios de infecciosidade, análises slot blot e eletroforese em gel de agarose) forneceram uma confirmação adicional de que o material era de elevada qualidade e substancialmente livre de partículas adenovíricas contaminantes (e proteínas e DNA adenovíricos), e também substancialmente livres de proteínas e DNA celulares contaminantes. Os géis de SDS revelaram a presença de bandas correspondendo a VP1, VP2 e VP3 (i.e., as proteínas AAV da cápside). Nenhuma outra banda foi visível após coloração Coomassie. Estes dados são consistentes com os dados das análises de fracionamento de coluna como representados nas Figuras 10-11.

Como um procedimento ilustrativo da troca aniônica até TFF, o seguinte é um processo exemplificativo de purificação e concentração a partir de um litro de frações conjugadas provenientes de cromatografia de troca aniônica. Se desejado (como acima referido), esta conjugação pode ser submetida a inativação por calor seguida por um passo de filtração (p.ex., usando um filtro de 0,22 μm). Para filtração de fluxo tangencial (TFF), empregamos um sistema desinfetado Pellicon XL equipado com uma membrana de *cut-off* de peso molecular 300 000 que foi operacionalizada a 40/0 para as pressões de entrada e saída. Um litro do material conjugado foi adicionado ao sistema a 500 mL de volume e depois concentrado para 250 mL. A diafiltração foi realizada com 5 diavolumes (1250 ml) de solução de Ringer modificada + 5% glicerol. Após a diafiltração, o concentrado foi concentrado a um volume final de 14 mL. A duração do processo foi de aproximadamente 3,25 horas (não incluindo o tempo de esterilização). Géis SDS marcados com prata, slot blots, e ensaios de infecciosidade confirmaram que a preparação de AAV (que continha aproximadamente 10^{10} unidades replicativas) era substancialmente livre de

adenovírus contaminante assim como de proteínas adenovíricas e celulares.

Os seguintes dados são resultados do referido procedimentos usando um título infeccioso e viral total como RU (unidades replicativas) e DRP (partículas resistentes a DNase), respetivamente.

300K TFF	Volume	Total RU	Total DRP	P/I	%RU	%DRP
Conjugado de Entrada	1000 ml	8,9 10^{10}	x 3,1 10^{14}	x 3483	100	100
Fração purificada	12,5 ml	7,3 10^{10}	x 2,3 10^{14}	x 3103	82	74

Os dados apresentados na **Figura 12** ilustram os resultados da produção de AAV usando filtração de fluxo tangencial após passagem numa coluna de extração aniónica. O material purificado na coluna POROS 50 PI foi concentrado usando uma membrana com *cut-off* de peso molecular de 300 000 (Millipore Pellicon XL). O material concentrado foi diafiltrado com cinco volumes consecutivos de solução de Ringer salina ajustada + 5% glicerol. O material foi então concentrado na membrana 10 vezes. A **Figura 12**, uma reprodução em meio-tom de um gel de SDS-poliacrilamida corado uma marcação de prata, mostra as proteínas AAV da cápside altamente purificadas, VP1 (85 kD), VP2 (72 kD), e VP3 (62 kD), no material final purificado da amostra.

Como é aparente dos dados aqui apresentados, estas técnicas de segunda geração para a preparação e purificação de AAV

resultou em métodos substancialmente melhorados por comparação com aqueles previamente descritos.

Meios exemplificativos para o crescimento do adjuvante adenovírico e para a produção de rAAV estão detalhados na seguinte Tabela:

TABELA 2:

	<u>Meio Ad</u>	<u>Meio rAAV</u>
SAIS INORGÂNICOS		
CaCL	116,61	
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,00125	0,00125
Fe (NO ₃) ₃ *9H ₂ O	0,05	0,05
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,417	0,417
KCL	311,8	311,8
MgCl ₂	28,61	
MgSO ₄	48,84	
NaCl	*	*
NaHCO ₃	2200	2200
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	62,5	62,5
Na ₂ HPO ₄	71,02	71,02
Zn ₂ SO ₄ •7H ₂ O	0,4315	0,4315
OUTROS COMPONENTES		
Glucose	4500	4500
HEPES	3575	3575
Hipozantina Na	2,39	2,39
Ácido Linoléico	0,042	0,042
Ácido Lipóico	0,105	0,105

	<u>Meio Ad</u>	<u>Meio rAAV</u>
Vermelho Fenol, Sal Na		
Putrescina•2HCL	0,081	0,081
Piruvato de sódio	55	55
Pluronic Poliol F-68	100	100
AMINO ACIDS		
L- Alanina	4,455	4,455
L-Arginina•HCL	273,9	273,9
L-Asparagina•H ₂ O	22,5	22,5
L-Aspartato	19,95	19,95
L-Cisteína•HCL•H ₂ O	17,56	17,56
L-Cisteína•2HCL	52,29	52,29
L-Glutamato	22,05	22,05
L-Glutamina	657	657
Glicina	26,25	26,25
L-Histidina•HCL•H ₂ O	73,48	73,48
L-Isoleucina	106,97	106,97
L-Leucina	111,45	111,45
L-Lisina•HCL	163,75	163,75
L-Metionina	32,34	32,34
L-Fenilalanina	68,48	68,48
L-Prolina	17,25	17,25
L-Serina	36,75	36,75
L-Treonina	101,05	101,05
L-Triptofano	19,22	19,22
L-Tirosina	91,79	91,79

	<u>Meio Ad</u>	<u>Meio rAAV</u>
L-Valina	99,65	99,65
VITAMINS		
d-Biotina	0,00365	0,00365
D-Ca Pantotenato	2,24	1,00
Cloreto de Colina	8,98	8,98
Folato	2,65	2,65
mio-inositol	12,6	12,6
Niacinamida	2,0185	2,0185
Piridoxal•HCL	2	2
Piridoxina•HCL	0,031	0,031
Riboflavina	0,219	0,219
Tiamina•HCL	2,17	2,17
Timidina	0,365	0,365
Vitamina B12	0,68	0,68
* adicionar a quantidade apropriada de NaCl para uma osmolalidade de 300 mOsM (+ ou - 20 mOsM)		

C. Purificação de um vetor AAV Usando Cromatografia com Sulfato de Heparina

Como acima discutido, técnicas cromatográficas podem ser empregadas para adicionalmente purificar e concentrar preparações AAV em concordância com a presente invenção. Por via de ilustração, uma preparação de AAV que se encontre na forma bruta (p.ex. lisado), ou que tenha sido eluída a partir de uma coluna de troca aniônica ou de uma

coluna de troca catiónica e/ou concentrada por filtração de fluxo tangencial pode ser purificada por ligação a uma coluna compreendendo sulfato de heparina. O AAV pode então ser eluído da referida coluna usando um tampão contendo um sal (p.ex. um gradiente linear de NaCl).

Como ilustrativo do uso de cromatografia com sulfato de heparina, AAV obtido de um conjugado "PI" (como abaixo descrito no Exemplo 9) foi primeiro concentrado quatro vezes e depois diafiltrado em TMEG + 100 mM NaCl usando uma membrana de filtração por fluxo tangencial 330K. O concentrado foi então injetado numa coluna de 1mL com sulfato de heparina (coluna Pharmacia "Hi-Trap Heparin") e eluída usando um gradiente linear de NaCl.

A **Figura 13** é um cromatograma mostrando a concentração resultante de AAV numa coluna com sulfato de heparina. O pico acentuado de absorvância a 280 nm (eixo esquerdo) a cerca de 18 minutos de tempo de eluição representa a fracção AAV como eluída a partir do sulfato de heparina com um gradiente linear de 0 a 1M NaCl (condutividade em ms representada no eixo direito).

EXEMPLO 9

PRODUÇÃO E TESTE DE VETORES AAV RECOMBINANTES

Noutro conjunto de experiências de produção, utilizamos $3-4 \times 10^9$ células crescidas num biorreator *Cell Factory*, usando DMEM + 10% FBS como meio de cultura. As células foram infectadas com Ad a uma MOI de cerca de 20, e recolhidas 72 horas após infeção. As células recolhidas foram ressuspensas em TMEG + NaCl a uma concentração de cerca de

5×10^6 células/ml. Após lise mecânica (microfluidização, 2 passagens a 8000 psi), os lisados foram tratados com Benzonase (25 unidades/ml, 37 °C, uma hora), e depois filtrados através de um filtro de 5 micron (Pall Profile II).

Como uma coluna de troca aniônica exeplicativa, empregamos a coluna POROS 50 PI (disponibilizada pela Perseptive Biosystems). Sucintamente, o filtrado foi adicionado à coluna em cerca de 100 mL e eluído com um gradiente de NaCl a 500 mM. As frações determinadas (por ensaio de infecciosidade) como contendo a maioria do AAV foram recolhidas e conjugadas (referido como a "conjugado PI")

O conjugado PI foi então diluído cerca de 1:7 em TMEG e adicionado a uma coluna de 50 mL Toso Haas SP650C, e eluído com um gradiente de NaCl a 500mM. As frações determinadas (por ensaio de infecciosidade) como contendo a maioria do AAV foram recolhidas e conjugadas (referido como o "conjugado SP"). O conjugado SP foi concentrado usando um filtro Centriprep 10K, e depois foi esterilizado por passagem através de um filtro de 0,2 micron.

Os resultados revelaram que o AAV recombinante se encontrava essencialmente livre de adenovírus infecciosos detetáveis (como determinado pelo limite de detecção na análise com amplificação serial em células 293 e ensaio TCID50). A preparação também se encontrou essencialmente livre de DNA adenovírico (como determinado por análise slot blot), essencialmente livre de proteínas celulares (como determinado por análise em gel SDS-PAGE), de DNA celular (determinado por análise PCR), e também essencialmente livre de AAV fenotipicamente *wild-type* (como determinado por amplificação serial e análise *Southern blot*).

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 10

O AUMENTO NA PRODUÇÃO DE AAV POR STRESS NUTRICIONAL

Como acima discutido, acredita-se que a produção de AAV possa ser aumentada usando qualquer uma de uma variedade de agentes e/ou condições que efetivamente stressam (ou sub-otimizam (o crescimento ou metabolismo de células produtoras de AAV. Neste exemplo, é mostrado que a eliminação de certos aminoácidos como ocorrendo durante a cultura está associado com um aumento relativo na produção de AAV; e, por outro lado, que a suplementação do meio para remover o stress nutricional resulta na verdade numa redução dramática na produção do vetor.

(a) Stress Nutricional durante a cultura em ciclo descontínuo e perfusão

Células JL14 foram inoculadas a cerca de 4×10^5 células/ml em biorreatores de 2 litros e crescidas no meio rAAV descrito na Tabela 2 tanto em modo de ciclo descontínuo ou por perfusão (usando filtração por fluxo tangencial, dia 1 a 0,4 volumes/dia, dias 2-3 a 1,2 volumes/ia, dia 4 a 2 volumes/dia e dia 5 a 4 volumes/dia). As culturas foram monitorizadas quando à sua densidade celular, glucose, lactato e aminoácidos usando técnicas standardizadas.

As análises revelaram que a densidade celular atingiu o seu

pico de cultura de ciclo descontínuo a 1×10^6 células/ml no dia 2, e na cultura de perfusão a 8×10^6 células/ml no dia 6. A glucose não foi limitante em nenhum dos casos (>1 g/l) e o lactato não foi inibitório.

Contudo, a análise de aminoácidos revelou que tanto o glutamato como o aspartato foram rapidamente consumidos em ambas as culturas de ciclo descontínuo e perfusão, como representado na seguintes Tabelas:

TABELA 3:

Análise de Aminoácidos no meio de cultura de CICLO						
descontínuo						
(duração-$\mu\text{mol/L}$)						
	MW	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4
Aspartato	133	96	10	4	9	7
Treonina	119	687	644	606	552	533
Serina	105	271	230	157	117	98
Asparagina	132	130	113	96	68	69
Glutamato	147	90	2	1	1	1
Glutamina	146	3424	2987	2450	1989	1843
Prolina	115	135	143	162	164	185
Glicina	75	288	241	194	151	130
Alanina	89	189	306	438	644	681
Valina	117	692	631	518	417	342
Cisteína	121	143	133	120	107	99
Metionina	149	160	132	100	74	58
Isoleucina	131	617	531	383	264	182
Leucina	131	645	538	374	248	161

Análise de Aminoácidos no meio de cultura de CICLO descontínuo						
(duração-$\mu\text{mol/L}$)						
	MW	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4
Tirosina	181	407	379	355	329	315
Fenilalanina	165	323	289	259	231	214
Triptofano	204	47	41	33	28	26
Amónia	17	760	816	941	1021	1033
Omtinina		71	89	110	128	144
Lisina HCl		572	521	463	415	384
Histidina	155	276	257	243	229	211
Arginina	174	1020	943	870	791	747

TABELA 4:

Análise de Aminoácidos no meio de cultura de PERFUSÃO								
(Duração $\mu\text{mol/L}$)								
	MW	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6
Aspartato	133	95	12	5	10	10	10	10
Treonina	119	709	691	560	596	651	641	657
Serina	105	281	264	147	156	180	199	185
Asparagina	132	130	124	75	78	109	119	119
Glutamato	147	88	1	0	1	1	1	0
Glutamina	146	3525	3299	2517	2640	2906	2986	3082
Prolina	115	145	165	163	174	177	157	171
Glicina	75	304	267	189	205	217	227	230
Alanina	89	190	340	341	384	423	333	330

Análise de Aminoácidos no meio de cultura de PERFUSÃO								
(Duração $\mu\text{mol/L}$)								
	MW	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6
Valina	117	678	635	485	500	532	551	561
Cisteína	121	141	136	112	118	123	119	118
Metionina	149	157	133	91	99	107	108	107
Isoleucina	131	616	543	369	401	430	432	442
Leucina	131	649	554	364	400	430	438	444
Tirosina	181	413	398	328	355	379	373	386
Fenilalanina	165	336	316	244	268	291	287	292
Triptofano	204	58	47	36	41	48	44	47
Amónia	17	831	1182	956	1202	1219	931	990
Ornithine		42	97	74	115	112	56	44
Lisina HCl		718	651	528	594	643	617	628
Histidina	155	284	310	223	243	262	266	265
Arginina	174	1058	948	826	901	978	974	1016

(b) Stress Nutritional Stress Associado com Produção Aumentada de AAV

Estudos de *follow-up* foram realizados para confirmar a importância da escassez de glutamato e aspartato no meio de cultura. Células JL14 foram retiradas de um frasco rotativo e divididas em dois conjuntos. Cada conjunto foi inoculado com 3×10^9 unidades infecciosas de 170-37 Ad 5. Um conjunto de células foi ressuspensão a 10^6 células/ml em meio rAAV (Tabela 2) contendo 10% FBS e 1% L-glutamina (300 mL). O

outro foi ressuspensão em meio rAAV contendo 10% FBS, 1% L-glutamina, 10 mg/L aspartato, e 110 mg/L Glutamato.

Cada conjunto foi incubado a 37 °C durante 72 horas num frasco rotativo. As células foram recolhidas, microfluidizadas duas vezes a 8000 psi, tratadas com benzonase, colocadas num ensaio de infecciosidade, recolhidas e analisadas.

Os resultados mostraram que o frasco rotativo de controlo produziu 6,2 RUs por célula. O frasco rotativo suplementado com aspartato e glutamato produziu 0,94 RUs por célula.

Isto indica que quando o consumo de aspartato e glutamato é prevenido através do fornecimento desses aminoácidos em excesso, a produção de rAAV é comprometida devido à falha de submeter as células a um stress nutricional.

Testes adicionais foram realizados usando uma linha celular HeLa derivada D6 que possui um vetor rAAV integrado (ITR-(CMV promotor)-(gene repórter β -gal)-ITR), assim como cópias dos genes AAV *wild-type rep* e *cap*.

As células foram plaqueadas a 5×10^6 células por frasco T225 em 30 mL de meio DMEM completo (10% FBS, 2 mM L-Glutamina), e incubadas a 37 °C em 10% CO₂ durante 2 dias, até que as células atingissem uma densidade de 2×10^7 células por frasco. As células em dois frascos duplicados foram infetadas com Ad 5 a uma MOI de 10. Um frasco contendo meio DMEM completo, o outro contendo meio DMEM completo suplementado com 5 x Aspartato e Glutamato. As células foram recolhidas e contadas após 72 horas de cultura.

O meio DMEM completo produziu $2,6 \times 10^7$ células com 88%

viabilidade. O meio suplementado com aspartato/glutamato produziu $3,8 \times 10^7$ células com 91% viabilidade. As células foram ressuspensas, sonicadas, tratadas com benzonase (25 U/ML), clarificadas e analisadas por análise slot blot.

Os resultados são como se seguem: O vírus D6 foi produzido em meio DMEM completo (não-suplementado) a $1,8 \times 10^{10}$ DRP/mL (1800 DRP por célula). O vírus D6 foi produzido em meio DMEM completo suplementado com aspartato/glutamato a $1,4 \times 10^9$ DRP/mL (140 DRP/células).

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 11

PRODUÇÃO DE VETORES AAV RECOMBINANTES SOB STRESS DE SORO

Como um exemplo da produção de rAAV sob condições de stress, utilizamos um stress de soro reduzido com conjugação com técnicas como as acima descritas. Sucintamente, células JL14 cells foram crescidas em frascos rotativos com meio DMEM modificado + 10% FBS em modo de cultural serial contínuo, e foram divididas a cada 3-4 dias. As células das culturas em suspensão foram colocadas num biorreator *16 Nunc Cell Factories, 10-stack*, a 3×10^8 células/biorreator num regime de 3 a 4 rotações/dia. O meio usado para crescimento apresentava uma redução em soro na ordem das dez vezes (i.e. DMEM + 1% FBS) assim colocando as células sob stress de soro.

Às 24 horas após plaqueamento, o meio nos biorreatores foi removido e meio fresco contendo 3×10^9 Ad unidades/ml foi

adicionado. Após 72 horas de cultura a 37 °C, as células foram removidas dos biorreatores por leve agitação, o meio contendo células foi recolhido e as células foram centrifugadas e ressuspensas em TMEG + 100 mM NaCl, e depois lisadas por passagem através de um microfluidizador a 8000 psi. O lisado foi clarificado através de um filtro de 5 micron e o lisado clarificado foi adicionado a uma colina de troca aniônica PI de 500 mL. A colina foi eluída com um gradiente crescente de NaCl (até 500 mM) em tampão TMEG. As frações foram recolhidas e analisadas usando um ensaio Clone 37 como descrito por Allen et al. (W096/17947, supra). As frações contendo a maior parte do vetor AAV foram então conjugadas e concentradas 10 vezes usando um concentrador Centripe centrífugo a 1000 x g durante 30 minutos. O material concentrado foi dializado contra solução de Ringer salina ajustada com 5% glicerol, e armazenada a -70°C. O AAV foi analisado pelo ensaio Clone 37, assim como por slot-blot e SDS-PAGE. O material pôde também ser analisado para a presença de adenovírus, proteínas adenovíricas, e DNA celular, assim como de outros contaminantes potenciais.

A **Figura 11** mostra os resultados obtidos usando o produtor GAK-0003 com células preparadas em frascos T225 a 10^7 células por frasco, e inoculadas no dia 2 com adenovírus DAB-003 a um MOI de 10. Diferentes frascos foram cultivados durante 72 horas a 37 °C em meio DMEM fresco contendo uma percentagem diferente de FBS, como mostrado na figura. No dia 5, cada frasco foi recolhido, as células foram contadas, ressuspensas, sonicadas, tratadas com benzonase, e plaqueadas para medir a produção de vetor como anteriormente demonstrado.

A produção ótima de vetor foi observada a uma percentagem de FBS de 1%. Concordantemente, o meio que é deficiente em

FBS (menos do que 2,5%, preferencialmente menos do que 2% mas mas do que 0%) é preferido como uma condição para submeter as células produtoras a um stress de soro.

O seguinte exemplo é fornecido para propósitos de referência apenas e não faz parte da invenção.

EXEMPLO 12

PRODUÇÃO DE VETORES AAV RECOMBINANTES SOB STRESS DE pH

Como um exemplo adicional para a produção de rAAV sob condições de stress, usamos stress de pH em conjugação com técnicas como as acima descritas. Sucintamente, células produtoras de AAV foram crescidas em biorreatores como acima descrito. As células foram então infetadas com Ad5 a uma MOI=10 e inoculadas em meio com baixo teor de soro (como no Exemplo 11) em suspensão em biorreatores de 1,5 litros. As culturas foram mantidas a diversos pHs elevados (de 7,2 a 8,0). As culturas foram então monitorizadas diariamente quanto ao número de células, viabilidade, consumo de glucose, produção de lactato, pH, osmolaridade e produção de AAV. Como abaixo representando, existiu um aumento na produção de AAV quando o pH foi elevado a 7,4; acoplado com um aumento ainda mais dramático no número de partículas AAV libertadas para o sobrenadante (em que o pH foi elevado):

pH da cultura	Partículas celulares associadas	Partículas no Sobrenadante	Total de Partículas	% Partículas celulares associadas	% no Sobrenadante
7,2	4,70E + 12	1,90E + 09	4,70E + 12	100%	0%
7,4	6,50E + 12	1,30E + 13	1,95E + 13	33%	67%
7,6	3,40E + 12	1,50E + 13	1,84E + 13	18%	82%
8,0	1,30E + 12	1,50E + 13	1,63E + 13	8%	92%

Em suma, à medida que o pH foi elevado, observamos um forte aumento no número de partículas AAV libertadas para o sobrenadante, e uma mudança na percentagem do sobrenadante:partículas celulares associadas (de praticamente todas celularmente-associadas a pH 7,2 para praticamente o sobrenadante (92%) a pH 8,0). A capacidade para recuperar as partículas AAV diretamente do sobrenadante sem a necessidade de lisar as células produtoras representa uma poderosa vantagem em termos da produção e purificação de AAV. Os AAV isolados do sobrenadante usando stress de pH podem ser prontamente concentrados e purificados usando técnicas como aqui descritas (p.ex., cromatografia de troca iónica e/ou filtração de fluxo tangencial).

Lisboa, 28 de Dezembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de produção de uma população de partículas de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV), compreendendo os passos de:

a) incubação de uma célula produtora de AAV sob condições que são permissivas para a replicação de AAV onde a célula produtora de AAV compreende:

(i) um ou mais genes AAV associados ao empacotamento, onde cada um dos genes AAV associados ao empacotamento codifica uma proteína AAV de replicação ou encapsidação;

(ii) um pro-vetor AAV recombinante (rAAV) que compreende um polinucleótido não-AAV recombinante flanqueado por pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) AAV; e

(iii) um vírus adjuvante para AAV;

b) lise da célula produtora após a incubação do passo a) para produzir um lisado de células produtoras de AAV;

c) cromatografia do lisado celular produtor de AAV do passo b) por uma variedade de cromatografias de troca iônica compreendendo pelo menos uma cromatografia de troca de um anião carregado positivamente e pelo menos uma cromatografia de troca de um catião carregado negativamente, ou cromatografia do lisado celular produtor de AAV do passo b) por uma cromatografia de troca aniônica seguida por filtração de fluxo tangencial para produzir uma população purificada de partículas de vetor rAAV.

2. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com a reivindicação 1 onde as células produtoras de AAV são concentradas antes da sua lise, opcionalmente por centrifugação ou filtração de fluxo tangencial.

3. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, onde o referido passo de lise das células produtoras de AAV é conduzido através da exposição das células a técnicas líticas selecionadas de microfluidificação, sonicação e congelamento/descongelamento.

4. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores onde o lisado de células produtoras de AAV do passo b) é:

(i) tratado com a nuclease, opcionalmente benzonase, antes da cromatografia; e/ou

(ii) clarificado antes da cromatografia, opcionalmente por filtração ou centrifugação.

5. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores onde as células produtoras de AAV são concentradas antes da sua lise, ressuspensas num tampão compreendendo sal a uma força iónica pelo menos equivalente à de uma solução de NaCl 50 mM, lisadas e depois clarificadas por filtração antes da cromatografia.

6. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações

anteriores, onde a referida cromatografia de troca aniónica e realizada numa resina amino ou imino N-carregada, opcionalmente selecionada de uma resina POROS 50 PI, I, a resina dietilaminoetil (DEAE), uma resina trimetilaminoetil (TMAE), uma resina amina quaternária e uma resina polietileneimina (PEI).

7. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a referida cromatografia de troca catiónica é realizada numa resina catiónica de base sulfo-, fosfo- ou carbóxi-, opcionalmente selecionada de uma resina HS, uma resina SP e uma resina carbóximetil (CM).

8. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o referido passo a) de incubação da célula produtora é conduzido em um vaso selecionado de um frasco de cultura de tecidos, um frasco de agitação, um frasco rotativo, um tanque-reactor, um fermentador tal como um fermentador de aeração forçada, um biorreator tal como um reator de fibras ocas, ou biorreator de leito fixo ou leito-fluidizado, ou um biorreator multi-litros de onde do reator multi-litros cerca de 10^9 unidades replicativas de rAAV por litro do volume do biorreator são isolados após o passo c).

9. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o referido passo a) de incubação da célula produtora é conduzido num microtransportador.

10. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das

reivindicações anteriores, onde o referido passo a) de incubação da célula produtora é realizado no meio rAAV como mostrado na Tabela 2.

11. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o referido passo a) de incubação da célula produtora é conduzido por pelo menos 5 dias.

12. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, a referida população purificada de partículas de vetores rAAV é livre de AAV competentes para replicação e de vírus adjuvantes e de proteínas celulares.

13. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, no qual a eluição a partir da cromatografia de troca aniónica e/ou cromatografia de troca catiónica é conduzida através do aumento da concentração de sal e eluentes cromatográficos compreendendo partículas rAAV que são subseqüentemente tratadas para reduzir a concentração de sal efectiva por diluição, diálise, diafiltração ou concentração.

14. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, incluindo o passo de exposição da fração compreendendo partículas AAV a cromatografia com sulfato de heparina.

- 15.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o referido pró-vetor rAAV compreende um polinucleótido não-AAV heterólogo flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITRs).
- 16.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a referida célula produtora de AAV compreende pelo menos um gene associado ao empacotamento que se encontra estavelmente integrado no genoma da referida célula produtora de AAV e/ou um gene AAV *rep* e um gene AAV *cap* que pode encontrar-se estavelmente integrado no genoma da referida célula produtora de AAV.
- 17.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o referido método compreende o fornecimento da referida célula produtora de AAV por um processo compreendendo:
- (i) introduzir o vírus adjuvante na célula produtora compreendendo o(s) gene(s) AAV associado(s) ao empacotamento e o pró-vetor rAAV;
 - (ii) introduzir o pró-vetor rAAV e o vírus adjuvante simultaneamente ou sequencialmente na célula produtora compreendendo o(s) gene(s) AAV associado(s) ao empacotamento; ou
 - (iii) introduzir o(s) gene(s) AAV associado(s) ao empacotamento e o pró-vetor rAAV simultaneamente ou sequencialmente na célula hospedeira compreendendo o vírus adjuvante.

- 18.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a célula produtora é fornecida por um processo compreendendo a introdução na célula produtora de pelo menos um gene AAV associado em empacotamento dividido.
- 19.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o referido vírus adjuvante é um adenovírus, um adenovírus sensível a temperatura, ou um adenovírus Ad-ts 149.
- 20.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o referido vírus adjuvante é um vírus adjuvante sensível a temperatura e o referido passo de incubação da célula produtora é conduzido a uma temperatura que é permissiva para replicação de AAV mas não-permissiva para replicação de vírus adjuvantes sensíveis a temperatura.
- 21.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a célula produtora é uma linha celular mamária dependente de ancoragem, uma linha celular mamária adaptada para crescimento em suspensão, uma linha celular 293 N3s ou uma linha celular HeLa S3.
- 22.** Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com a reivindicação 1, onde a cromatografia do lisado de células produtoras de AAV obtido no passo c) compreende uma combinação de cromatografia de troca aniônica carregada positivamente e uma cromatografia

de troca catiónica carregada negativamente para produzir uma população purificada de partículas rAAV.

23. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com a reivindicação 22, onde a referida cromatografia de troca aniónica carregada positivamente é realizada antes da referida cromatografia de troca catiónica carregada negativamente.

24. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com a reivindicação 22, onde a referida cromatografia de troca catiónica carregada negativamente é realizada antes da referida cromatografia de troca aniónica carregada positivamente.

25. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, adicionalmente compreendendo o passo de cromatografia do lisado contendo partículas rAAV em sulfato de heparina, com o referido passo a ser realizado após a referida cromatografia de troca aniónica carregada positivamente e após a referida cromatografia de troca catiónica carregada negativamente.

26. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 25, adicionalmente compreendendo o passo de exposição das células produtoras a filtração de fluxo tangencial após a incubação do passo a) mas antes da lise do passo b).

27. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 26, onde a referida cromatografia de

troca aniónica é realizada numa resina amino ou imino N-carregada, opcionalmente selecionada de uma resina POROS 50 PI, I, a resina dietilaminoetil (DEAE), uma resina trimetilaminoetil (TMAE), uma resina amina quaternária e uma resina polietileneimina (PEI).

28. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 27, onde a referida cromatografia de troca catiónica é realizada numa resina catiónica de base sulfo-, fosfo- ou carbóxi-, opcionalmente selecionada de uma resina sulfato de heparina (HS), uma resina sulfopropil (SP) e uma resina carbóximetil (CM).

29. Um método para a produção de uma população de partículas rAAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 27, onde a cultura de células em suspensão é usada.

Lisboa, 28 de Dezembro de 2015

Figura 1

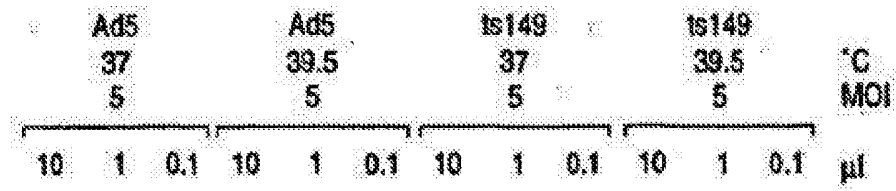


Figura 2

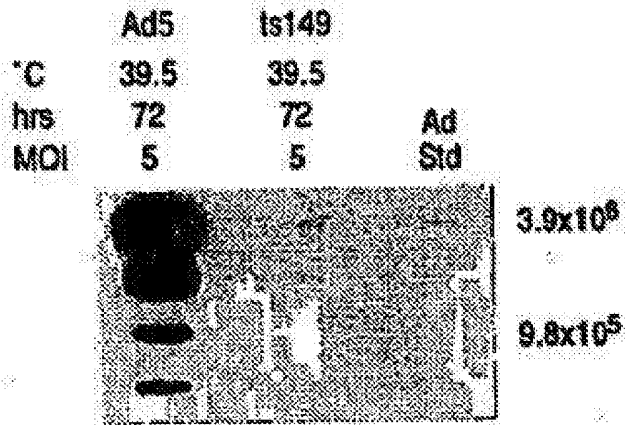
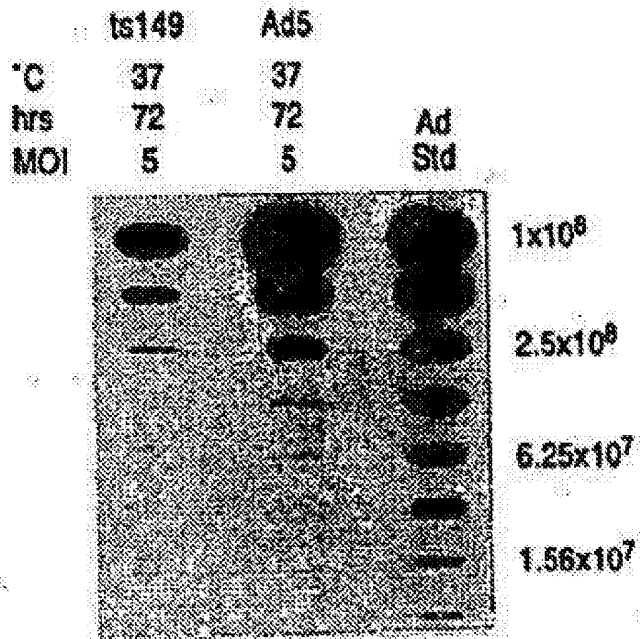


Figura 3

ts149				Ad5	ts149		°C hrs	MOI
5	10	20	40	37	72	96		

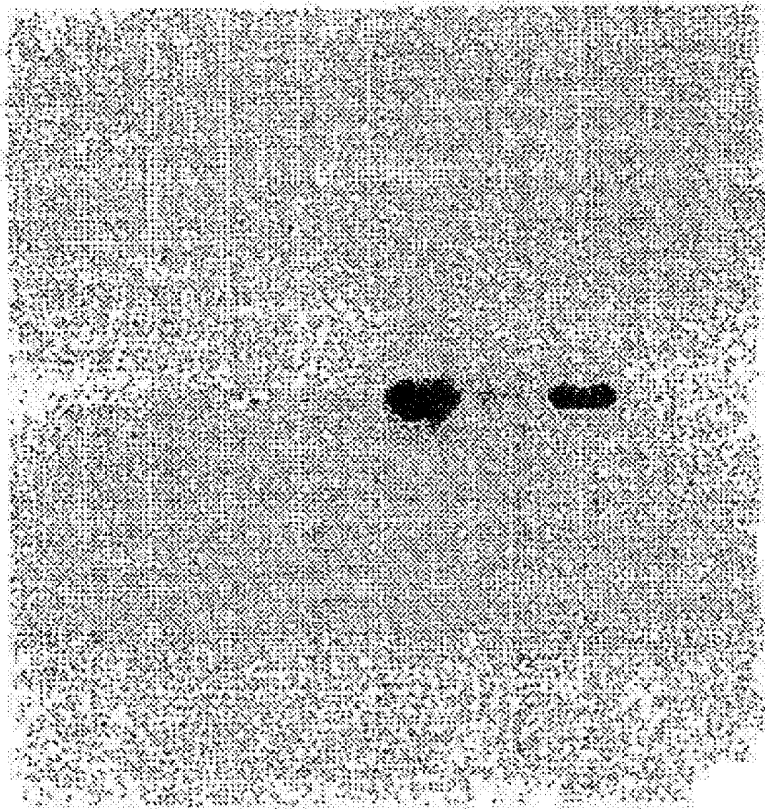


Figura 4

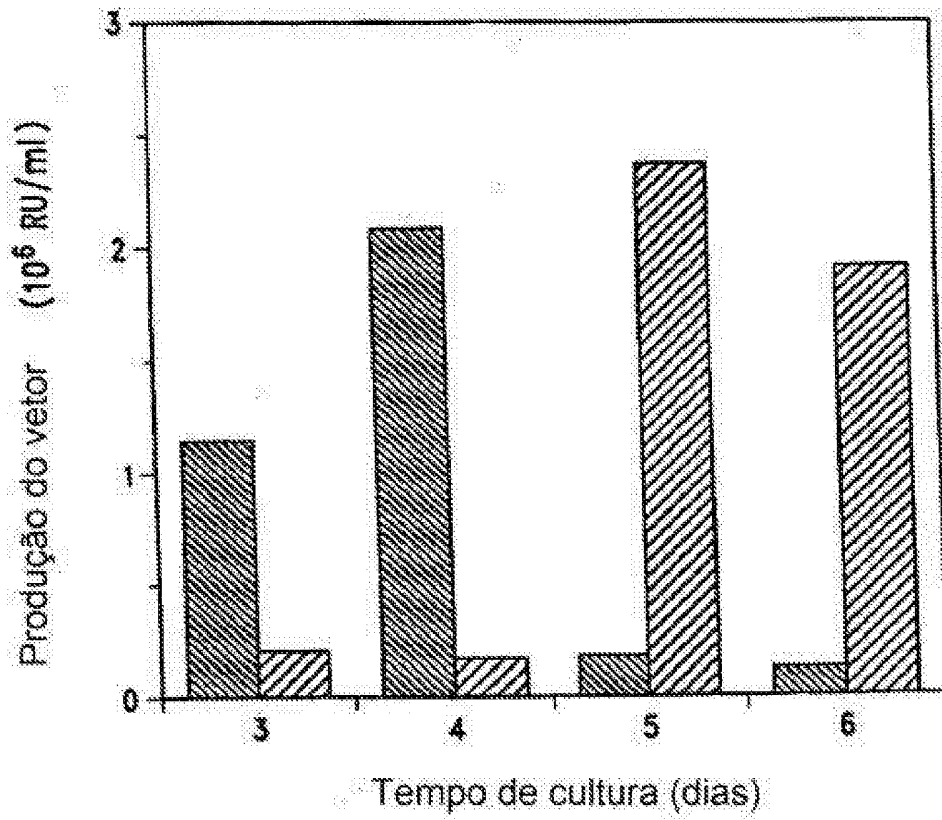


Figura 5

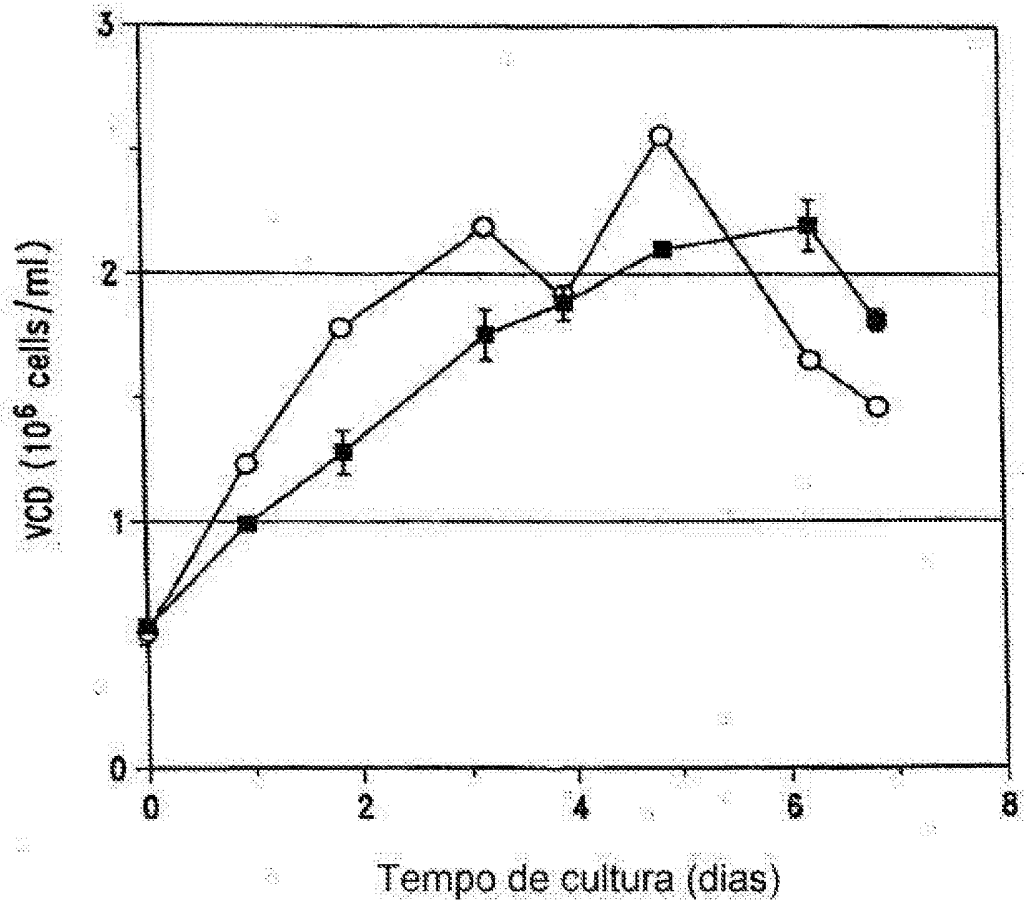


Figura 6

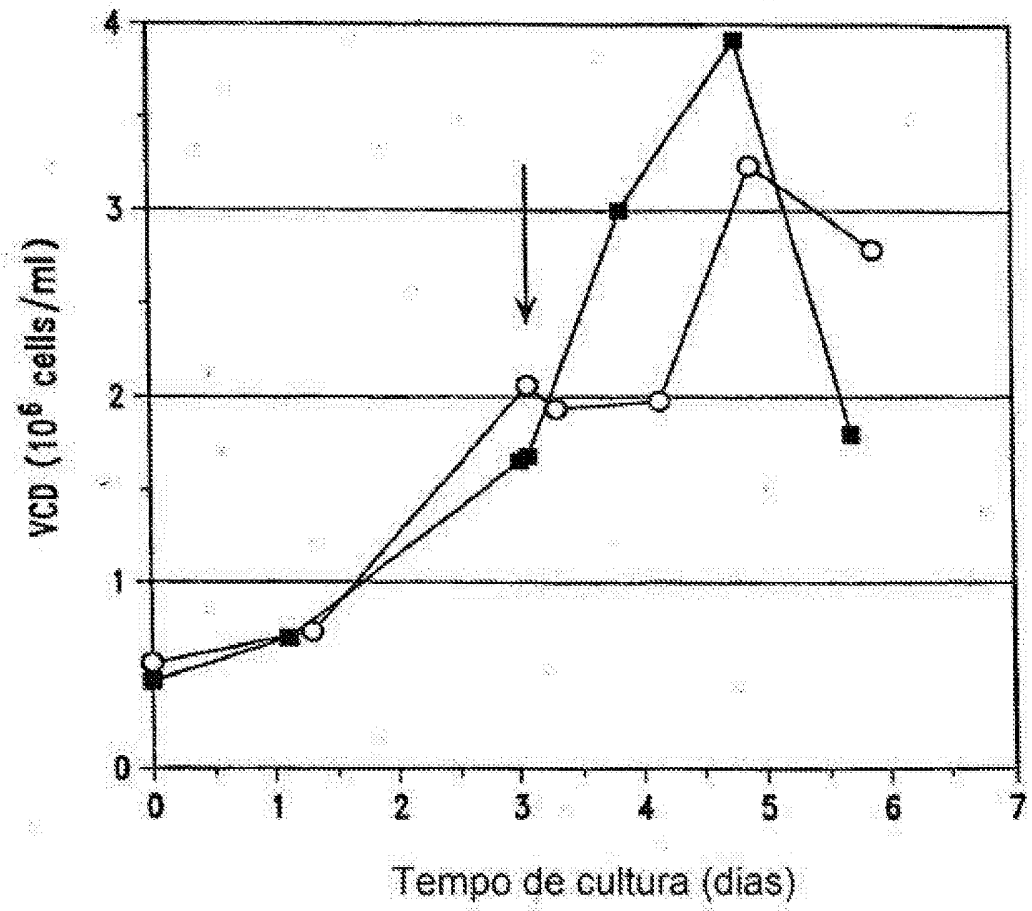


Figura 7

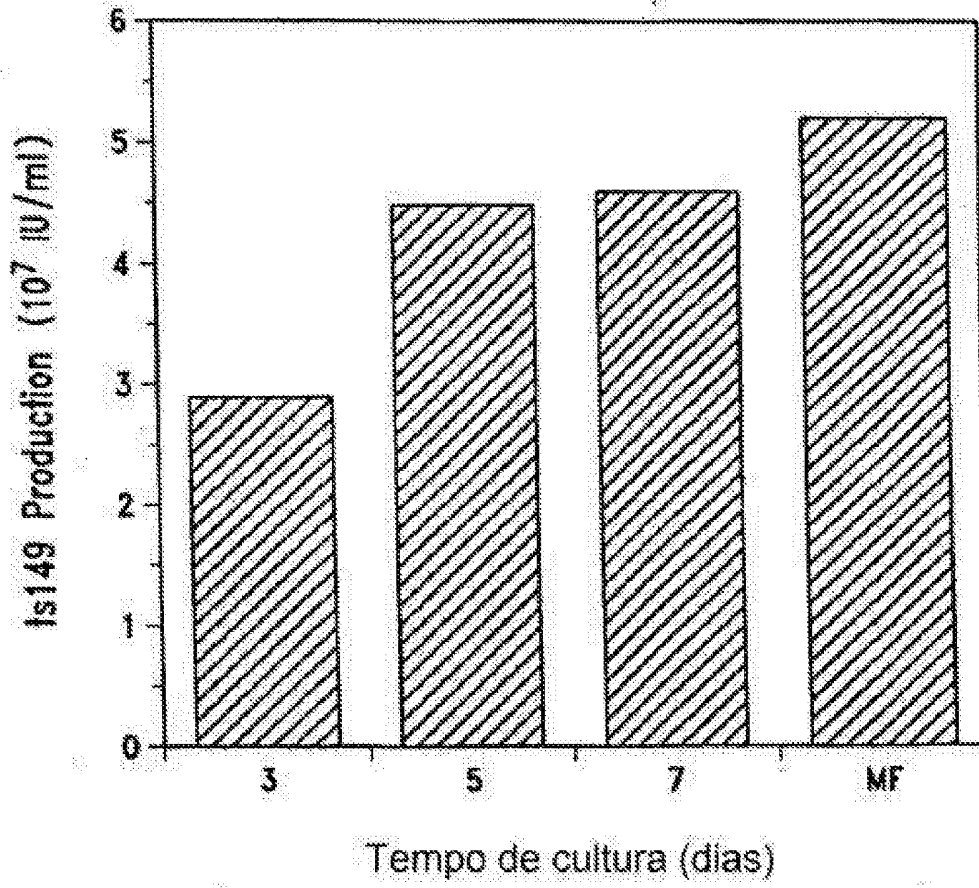


Figura 8A

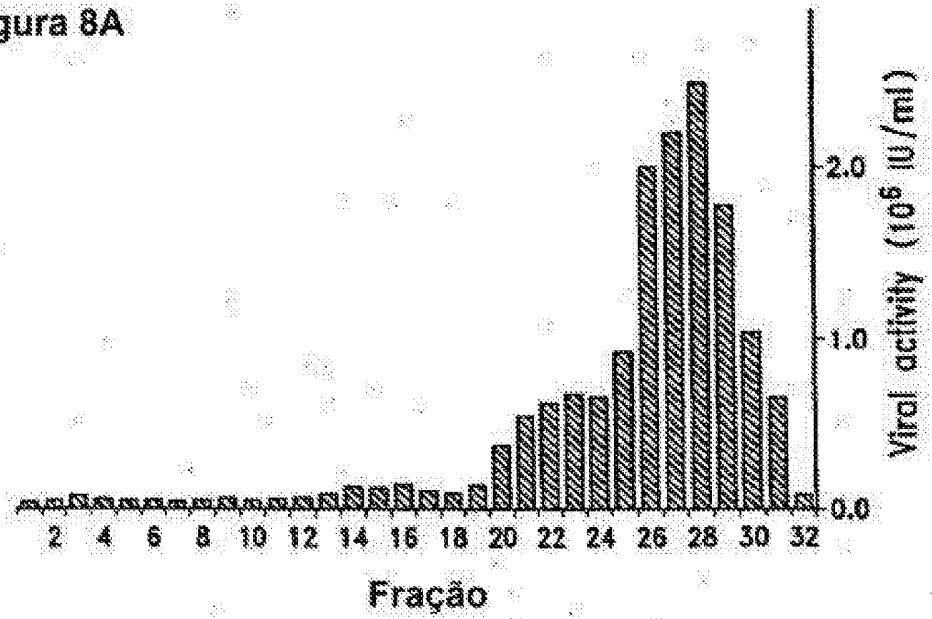


Figura 8B

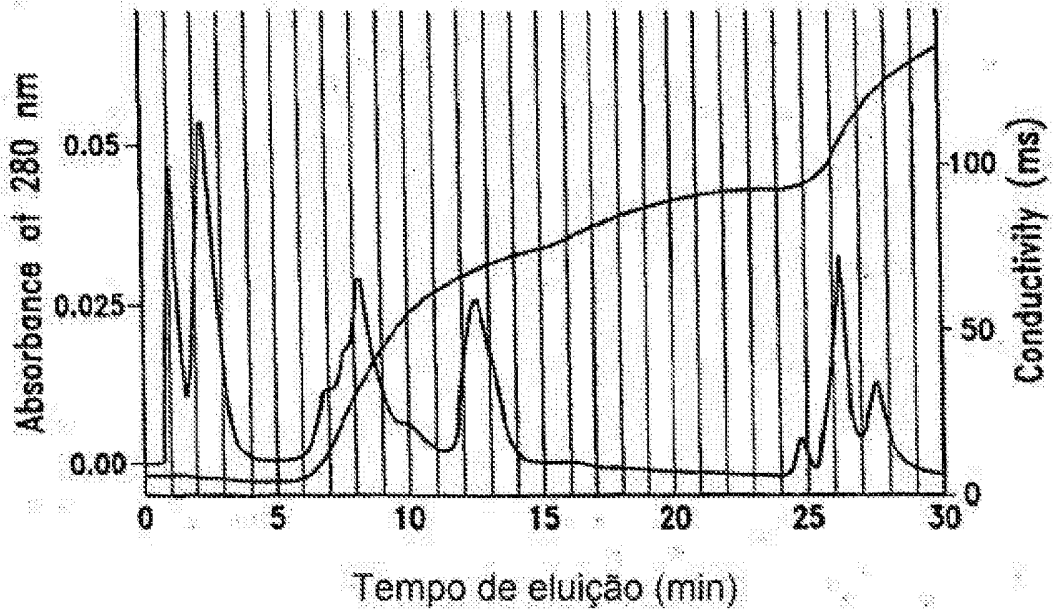


Figura 9

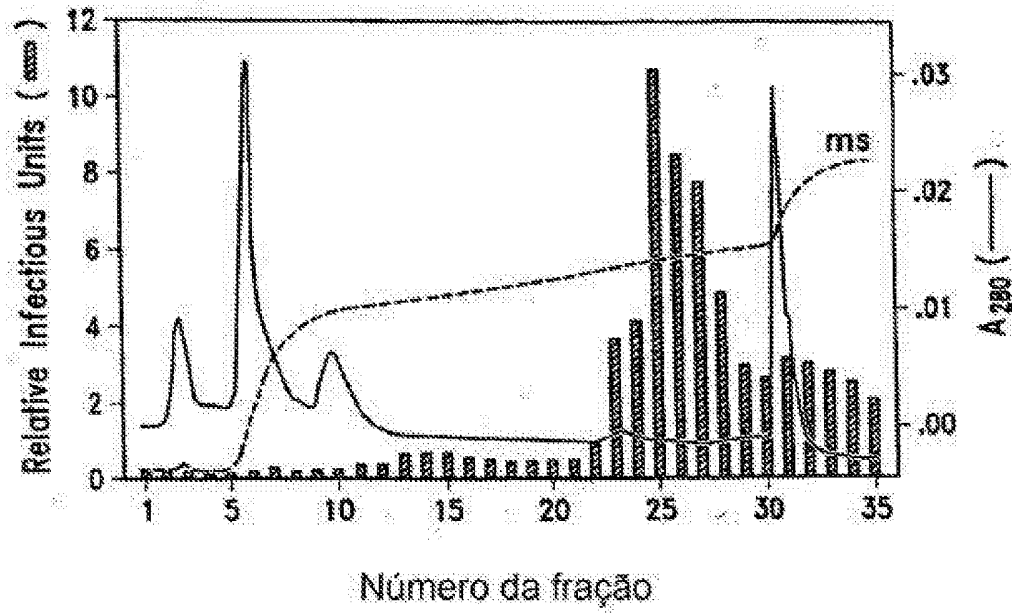


Figura 10A

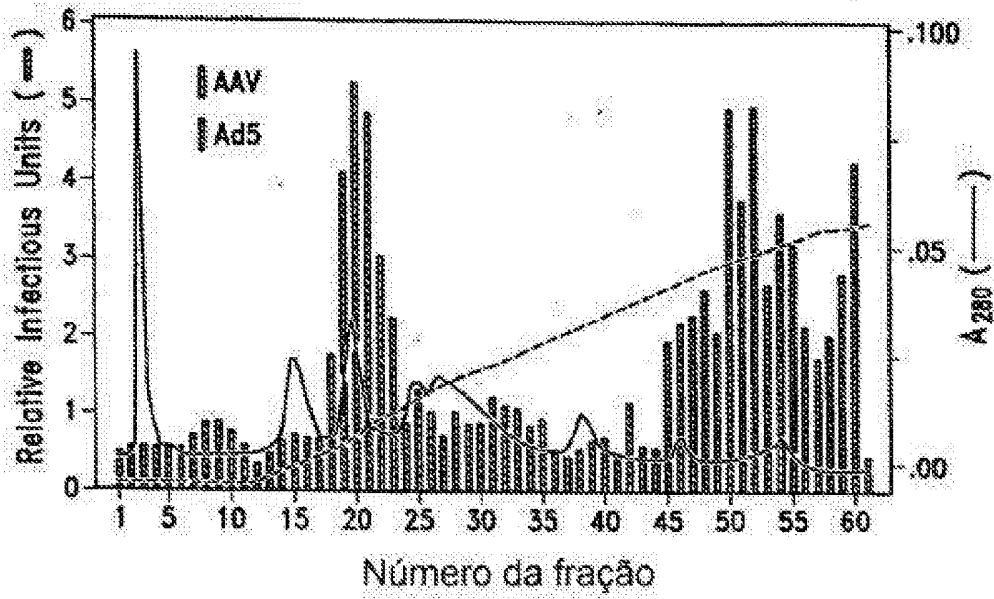


Figura 10B

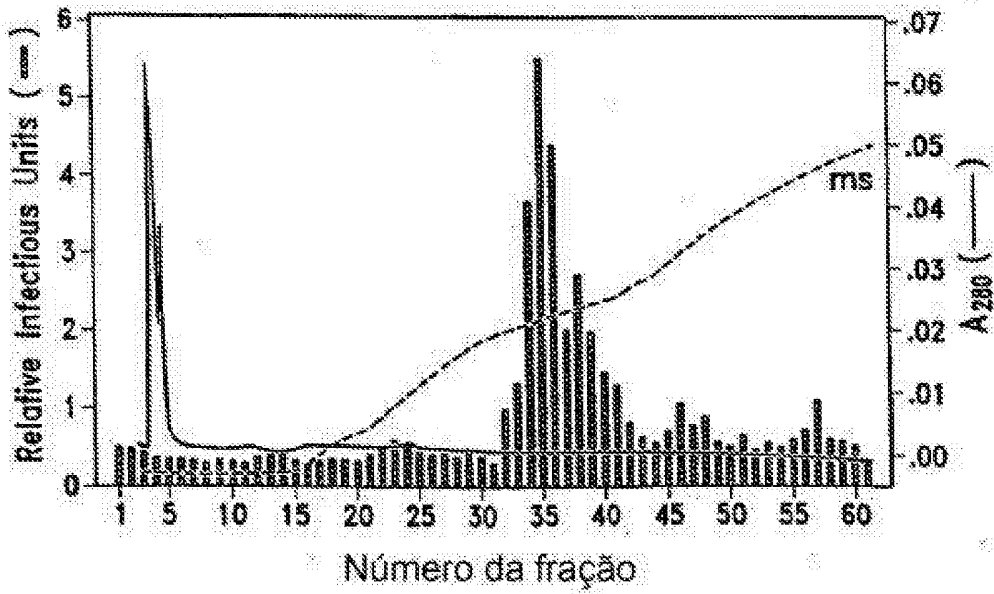


Figura 11A

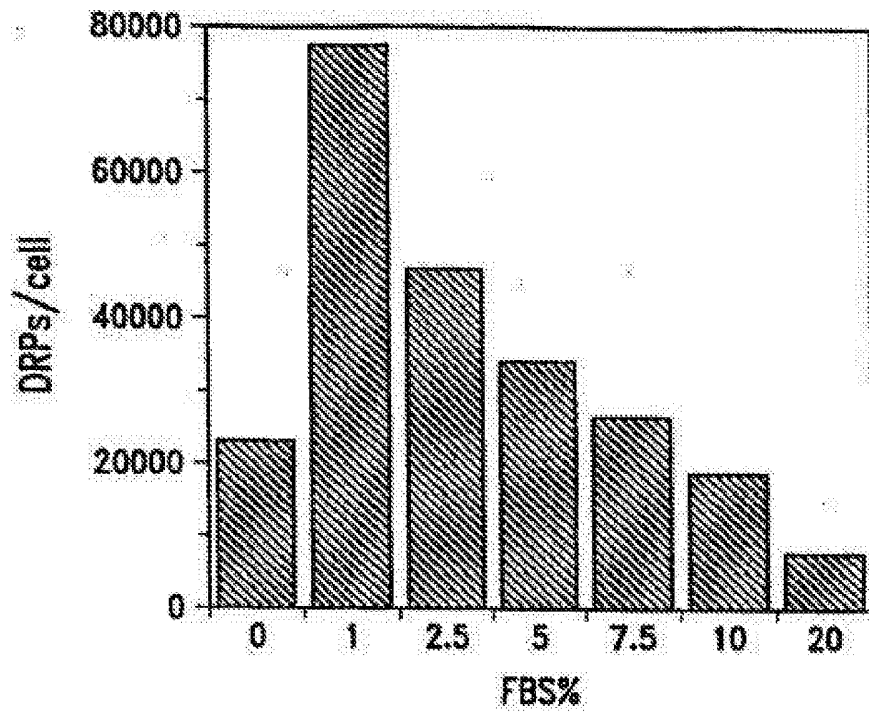


Figura 11B

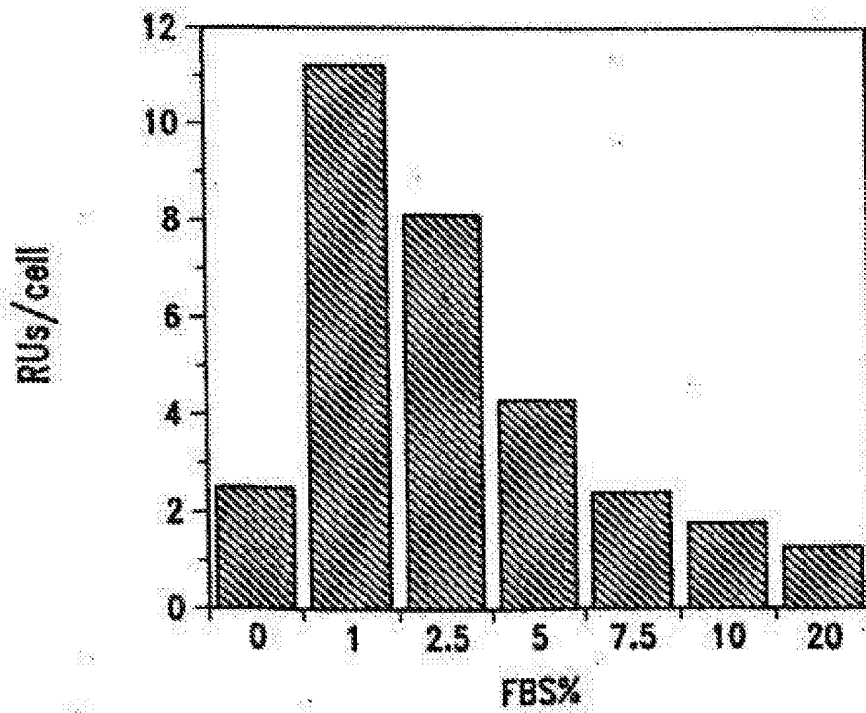


Figura 12

