

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 883**

51 Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A01N 43/04 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03754869 .0**
96 Fecha de presentación: **23.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1546343**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Producción de VAA recombinantes de alto título**

30 Prioridad:
23.09.2002 US 252182

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
Applied Genetic Technologies Corporation
11801 Research Drive, Suite D
Alachua, FL 32615, US

72 Inventor/es:
HWANG, Kyu-Kye

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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

ES 2 378 883 T3

DESCRIPCIÓN

Producción de VAA recombinantes de alto título.

5 **1.0 Antecedentes de la invención****1.1 Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a procedimientos para la producción a gran escala de virus adenoasociado recombinante (VAAr) para su utilización en aplicaciones de terapia génica.

1.2 Descripción de la técnica relacionada

15 La terapia génica se refiere al tratamiento de enfermedades genéticas sustituyendo, alterando o complementando un gen responsable de la enfermedad. Esto se consigue mediante la introducción de un gen o genes correctores en una célula huésped, generalmente por medio de un vehículo o vector. La terapia génica es muy prometedora para el tratamiento de muchas enfermedades. Ya ha conseguido cierto éxito de manera preclínica utilizando AVV recombinantes (VAAr) para la inserción y la expresión a largo plazo de genes introducidos en células en animales, incluyendo células que no se dividen clínicamente importantes del cerebro, hígado, músculo esquelético y pulmón. Los ensayos clínicos que utilizan esta tecnología han incluido la utilización de VAAr que expresan el gen *cfr* como tratamiento para la fibrosis quística (Flotte *et al.*, 1998; Wagner *et al.* 1998).

25 Se han desarrollado procedimientos para producir VAAr en los que se hace que células que se han hecho crecer en cultivo produzcan VAA, que luego se recogen de las células y se purifican. Los procedimientos de producción para VAA implican la inserción de tres elementos necesarios para las células productoras: 1) un gen de interés flanqueado por secuencias de repetición terminal invertidas (ITR) de VAA, 2) genes *rep* y *cap* de VAA, y 3) proteínas víricas auxiliares ("funciones auxiliares"). El protocolo convencional para insertar los dos primeros es mediante transfección de las células con ADN de plásmido que contiene los casetes génicos recombinantes apropiados. Las funciones auxiliares se han insertado tradicionalmente infectando las células con un virus auxiliar tal como adenovirus (Ad). (Samulski *et al.*, 1.998; Hauswirth *et al.*, 2000).

30 El documento WO95/06743 describe un procedimiento para producir viriones de VAA recombinantes, que comprende introducir en una célula huésped un vector de VAA recombinante, infectar la célula con adenovirus recombinante o virus de herpes que pueden expresar una proteína de VAA esencial y cultivar la célula para producir viriones de VAA.

1.3 Problemas cuantitativos asociados con la producción de cantidades de VAAr necesarias para la terapia génica

40 A pesar de los beneficios potenciales de la terapia génica como tratamiento para enfermedades genéticas humanas, una grave limitación práctica obstaculizan su utilización extendida en la clínica. Con el fin de producir incluso una dosis única clínicamente eficaz para un paciente humano, deben prepararse más de 10^{14} partículas de VAAr (Snyder, *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1999). Preparar este número de partículas utilizando la tecnología actual requiere más de 2×10^{11} células productoras. A escala de laboratorio, este número de células requeriría aproximadamente 7500 matraces de cultivo tisular. A escala comercial, este nivel de cultivo celular plantea una grave barrera práctica para la producción a gran escala de VAAr en "fábricas celulares".

50 Los beneficios de mejora el rendimiento de partículas por célula serán muy significativos desde un punto de vista de la producción comercial. Por ejemplo, una mejora que dé como resultado un aumento de dos veces en el rendimiento de VAAr por célula permitiría cultivar la mitad de células. Un aumento de diez veces permitiría que se preparase la misma cantidad de producto de VAAr en una décima parte del número de células productoras. Se requieren mejoras significativas de esta magnitud con el fin de conseguir una viabilidad económica para esta tecnología.

55 Las metodologías de producción de VAAr actuales utilizan procedimientos conocidos para limitar el número de VAAr que puede producir una única célula productora. El primero de éstos es la transfección utilizando plásmidos para la inserción de ADN en las células. Se conoce bien que la transfección de plásmidos es un proceso inherentemente ineficaz que requiere un alto número de copias del genoma y por tanto grandes cantidades de ADN (Hauswirth *et al.*, 2000). Adicionalmente, la utilización de Ad reduce significativamente los títulos de VAAr finales porque es un contaminante que debe retirarse del producto final. No sólo deben emplearse procedimientos eficaces para eliminar la contaminación por Ad, sino que también son necesarios ensayos rigurosos para determinar la contaminación por Ad de VAAr. Los procedimientos de purificación y seguridad dictados por la utilización de Ad dan como resultado la pérdida de VAAr en cada etapa. Por tanto, deben desarrollarse procedimientos prácticos desde el punto de vista comercial que superen estas barreras para proporcionar VAAr en las enormes cantidades requeridas para aplicaciones clínicas.

2.0 Sumario de la invención

La presente invención trata de superar algunas de las deficiencias en la técnica anterior abordando los problemas que limitan la producción de VAAr en cantidades suficientes para procedimientos de terapia génica eficaces. En la invención, se obtienen altos títulos de VAAr infeccioso que son al menos un orden de magnitud mayor que los notificados previamente.

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir virus adenoasociado recombinante (VAAr) de alto título que comprende: (a) coinfectar simultáneamente una célula 293 con (i) un primer virus de herpes simple recombinante (VHSr) de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico que comprende un gen *rep* de VAA y uno *cap* de VAA, estando cada uno funcionalmente unido a un promotor, y (ii) un segundo VHSr de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico que comprende repeticiones terminales internas (ITR) de VAAr, un gen de interés, y un promotor funcionalmente unido a dicho gen de interés, en el que el gen está flanqueado por las ITR; (b) incubar la célula 293; y (c) tras la incubación, recoger los VAAr de la célula 293 de la etapa (b) en la que se producen 2.300-6.000 partículas infecciosas por célula infectada.

La invención se refiere a un procedimiento para producir VAAr de alto título. En el procedimiento, las células productoras se coinfectan simultáneamente con al menos dos virus de herpes simple recombinantes (VHSr). Los dos VHSr son vectores diseñados para dotar a las células, tras la infección, de todos los componentes necesarios para producir VAAr.

La infección de las células productoras con VHSr que no pueden replicarse se utiliza porque, a diferencia de los procedimientos que implican la utilización de adenovirus, el VHSr no se convierte en un contaminante significativo del producto de VAAr. Esto aumenta el rendimiento final de VAAr eliminando las etapas de purificación asociadas con la eliminación de Ad. En una realización particular de la invención, se construyó el VHSr a partir de un mutante de VHS-1 en el que la incapacidad para replicarse se debe a una mutación en el gen ICP27. También puede utilizarse cualquier otro mutante de VHS que muestre un fenotipo de replicación defectuosa para construir el VHSr.

Una realización de la invención implica infección de una célula productora con dos vectores de VHSr diferentes. El primer vector de VHSr contiene los genes *rep* y *cap* de VAA incluyendo los hallados en diversos serotipos de VAA incluyendo VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5 y VAA-6, VAA-7 y VAA-8, y variantes de tales genes, por ejemplo, los de otros serotipos de VAA y los preparados mediante recombinación o mutación de los genes *rep* y/o *cap* de los serotipos anteriores.

En determinadas formas de realización, los genes *rep* y *cap* de VAA-2 en el primer VHSr pueden dirigirse mediante sus promotores nativos, y se inserta el constructo génico en el gen *tk* del virus VHSr. También pueden utilizarse cualquier otro sitio o sitios en el genoma de VHS adecuado(s) para la integración de los genes *rep* y *cap*. Adicionalmente, pueden utilizarse promotores heterólogos para dirigir la expresión de los genes de VAA. Los ejemplos de otros promotores que pueden utilizarse en el procedimiento dado a conocer incluyen pero no se limitan al promotor precoz de SV40, promotor de CMV, promotor de *tk* de herpes, promotor inducible de metalotionina, promotor de virus de tumor mamario de ratón y promotor de β -actina de pollo.

El segundo VHSr contiene ITR de VAA con uno o más genes de interés dirigidos por uno o más promotores. El gen de interés puede ser un gen que probablemente sea de valor terapéutico. Los ejemplos de genes terapéuticos incluyen pero no se limitan a α -1-antitripsina, GAA, eritropoyetina y PEDF. Cuando es deseable seleccionar o identificar la expresión transgénica satisfactoria, el gen de interés puede ser un gen indicador. Se conocen muchos ejemplos de genes utilizados como indicadores o para selección, y pueden utilizarse en la invención. Éstos incluyen pero no se limitan a los genes que codifican para beta-galactosidasa, neomicina fosforotransferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, timidina cinasa, luciferasa, beta-glucuronidasa, aminoglicósido, fosfotransferasa, higromicina B, xantina-guanina fosforribosil luciferasa, DHFR/metotrexato y proteína verde fluorescente (GFP).

En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de VAAr de alto título en el que el rendimiento de VAAr está en el intervalo de al menos hasta 5000-6000 partículas infecciosas por célula productora. En el desarrollo del nuevo sistema sin Ad, basado en VHSr para la producción de VAAr, se descubrieron factores que afectaban en gran medida al rendimiento de VAAr infecciosos por célula. Entre estos, fue altamente significativa la utilización de la coinfección simultánea de las células productoras con dos VHSr diferentes. La infección en serie fue en el mejor de los casos el 35% tan eficaz como la coinfección simultánea, y en el peor de los casos dio como resultado una producción insignificante de VAAr. Otros factores que afectan a los rendimientos incluyen las proporciones relativas del primer y el segundo VHSr, la duración de los tiempos de incubación tras la coinfección simultánea, la elección de las células productoras, las condiciones de cultivo para las células productoras, y las células utilizadas para la titulación de las disoluciones madre de VAAr.

La invención es la primera en utilizar la coinfección simultánea de células productoras con al menos dos vectores de VHSr diferentes para conseguir la producción de VAA. Se consiguió un rendimiento inesperadamente alto de VAA a través de la utilización de la infección simultánea de células productoras con los VHSr, en contraposición a la adición

de dos VHSr en tiempos diferentes. El efecto del momento de la infección por VHSr sobre los rendimientos de VAAr mostró que la desviación del protocolo de coinfección simultánea fue notablemente perjudicial para el rendimiento de VAAr. Por ejemplo, la introducción de un retardo de simplemente 4 horas entre la infección con el primer y el segundo VHSr dio como resultado una reducción de hasta aproximadamente el 35% del nivel de VAAr producido mediante coinfección simultánea. Con retardos de 12 y 24 horas, la producción de VAAr disminuyó hasta niveles no significativos.

Otro factor en la maximización de la producción de VAAr es la razón de los dos virus VHSr utilizados en el procedimiento de coinfección simultánea. En una realización particular de la invención en la que el primer VHSr era VHSr/rc (descrito a continuación) y el segundo VHSr (descrito a continuación) era VHSr/VAA-GFP, se obtuvieron los mejores resultados cuando la razón del primer VHSr con respecto al segundo VHSr era de aproximadamente 8:1. Es probable que esta razón difiera de otro VHSr utilizado en la invención, y puede determinarse experimentalmente con cada combinación del primer y el segundo VHSr seleccionado para su utilización.

Los procedimientos de la invención descritos en la presente memoria utilizan la coinfección simultánea con al menos dos VHSr para insertar el conjunto mínimo de componentes requeridos para producir VAAr en las células productoras. Los expertos en la materia reconocerán que el procedimiento de coinfección simultánea dado a conocer puede modificarse para incluir etapas adicionales diseñadas para insertar otros componentes en las células. Los ejemplos de etapas adicionales de este tipo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, infección con al menos otro virus, incluyendo 1) otro VHSr que difiere en construcción del primer y el segundo VHSr, o 2) otras cepas de virus recombinantes o que se producen de manera natural tales como Ad, VAAr o Ad recombinante (Adr). La infección con el virus adicional puede ser o bien simultánea a la coinfección con el primer y el segundo VHSr, o bien puede llevarse a cabo o bien antes o bien después de la coinfección simultánea con el primer y el segundo VHSr. Alternativamente, o además de la etapa de infección con al menos un virus adicional, el procedimiento puede incluir una etapa adicional que implica la transfección con al menos un ADN de plásmido, incluyendo un vector de expresión de AVV, siempre que se realice una etapa de coinfección simultánea.

Se describe una población de células productoras que contiene al menos 6000 VAAr infecciosos por célula. Una población de este tipo puede producirse según los procedimientos dados a conocer.

También se describe un kit para la producción de VAAr de alto título que incluye un primer VHSr que contiene genes *rep* y *cap*, un segundo VHSr que incluye ITR de VAA y un promotor, e instrucciones para su utilización. En el kit puede incluirse cualquier combinación del primer y el segundo VHSr tal como se describieron anteriormente. La inclusión de virus adicionales o plásmidos para su utilización con el primer y el segundo VHSr también está dentro del alcance del kit. El kit puede incluir además una línea celular productora y una línea celular para la titulación del VAAr.

El aumento de la eficiencia del rendimiento de VAAr por célula que puede conseguirse utilizando los procedimientos dados a conocer de la invención será particularmente ventajoso para la producción comercial de VAAr. Proporcionando el beneficio de una reducción de al menos diez veces en los requisitos para el cultivo celular, la invención ofrece el potencial de ahorros significativos en instalaciones que producen VAAr a la escala necesaria para su utilización terapéutica en terapia génica.

Aunque pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados.

3.0 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de datos de producción de VAAr comparativos utilizando protocolos de coinfección simultánea e infección individual.

La figura 2 es un gráfico que muestra el efecto sobre la producción de VAAr de variar el momento de adición de VHSr/rc y VHSr/GFP a las células productoras.

La figura 3 son dos gráficos que muestran el efecto sobre la producción de VAAr de variar la proporción de VHSr/rc (R) y VHSr/GFP (G) en el protocolo de coinfección.

La figura 4 es un gráfico que muestra el efecto sobre la producción de VAAr de variar el momento de la recogida de las células productoras.

La figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de la densidad de siembra de las células productoras (293) sobre la producción de VAAr.

La figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de la densidad de siembra de células C12 sobre la cuantificación de VAAr/GFP.

La figura 7 es un gráfico que muestra una comparación de rendimientos de VAAr/GFP utilizando 293 y Vero como células productoras.

5 4.0 Descripción detallada

4.1 Definiciones

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “infección” se refiere a la inserción de ADN heterólogo en una célula por un virus. La expresión “coinfección simultánea” indica la infección simultánea (es decir, al mismo tiempo que o en el plazo de al menos 5, 10, 30, 45, 60, 90 ó 120 minutos de) de una célula productora con al menos dos virus. La infección de una célula productora con dos (o más) virus en diferentes tiempos se denominará “coinfección”.

15 Por el término “gen” se entiende una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína particular, o en determinados casos, una molécula de ARN funcional o estructural. Un “transgén” se refiere a un gen o genes heterólogos en un vector, que es/son, o va(n) a introducirse en una célula. Por el término “vector” se entiende un constructo viral o de plásmido recombinante utilizado como vehículo para introducir un gen en una célula.

20 Los términos/las expresiones “VHS recombinante,” “VHSr” y “vector de VHSr” se refieren a formas genéticamente modificadas, aisladas de VHS que contienen genes heterólogos incorporados en el genoma viral. Por la expresión “VHSr/rc” o “virus VHSr/rc” se entiende un VHSr que presenta un gen *rep* de VAA y un gen *cap* de VAA incorporados en su genoma. Las expresiones “virus de expresión de VHSr” y “VHSr/VAA” indican un VHSr que presenta secuencias ITR de VAA incorporadas en su genoma.

25 4.2 Procedimientos biológicos

En la presente memoria, se describen procedimientos que implican técnicas de biología molecular convencionales. En la técnica, se conocen generalmente técnicas de este tipo y se describen en detalle en la tratados de metodología tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas). Se comentan procedimientos para la síntesis química de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Beaucage y Carruthers, Tetra. Letts. 22:1859-1862, 1981, y Matteucci *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981. La síntesis química de ácidos nucleicos puede realizarse, por ejemplo, en sintetizadores de oligonucleótidos automatizados comerciales. También pueden adaptarse procedimientos convencionales de transferencia génica y terapia génica para su utilización en la presente invención. Véanse, por ejemplo, Gene Therapy: Principles and Applications, ed. T. Blackenstein, Springer Verlag, 1999; Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), ed. P.D. Robbins, Humana Press, 1997; y Retrovectors for Human Gene Therapy, ed. C.P. Hodgson, Springer Verlag, 1996.

40 4.3 Protocolo de coinfección simultánea basado en virus de herpes recombinante para la producción de VAAr

Una forma de realización de la invención proporciona un procedimiento sin transfección, sin Ad de preparación de VAAr, basado en la utilización de dos o más virus VHSr recombinantes utilizados para coinfectar células productoras con todos los componentes necesarios para la producción de VAAr. Como Ad, VHS-1 puede soportar completamente la replicación y el empaquetamiento de VAA (Knipe, 1989, Knipe, 1989, Buller, 1981, Mishra y Rose, 1990, Weindler *et al.*, 1991, Johnson *et al.*, 1997). El conjunto mínimo de genes de VHS-1 requerido para replicar y empaquetar VAA es UL5, UL8, UL52 y UL29 (Weindler *et al.*, 1991). En la presente invención, la función auxiliar necesaria para la producción de VAAr se proporciona preferiblemente mediante un virus VHSr que presenta al menos el conjunto mínimo de genes requeridos para replicar y empaquetar VAA.

En el procedimiento de la invención, se utilizan al menos dos formas diferentes de VHSr para coinfectar una célula productora. En la forma de realización descrita en la sección de ejemplos a continuación, las dos formas de VHSr utilizadas se denominan el virus VHSr/rc y el virus de expresión de VHSr. El virus VHSr/rc contiene un casete génico en el que se insertan los genes *rep* y *cap* de VAA en el genoma de VHS. Los genes *rep* son responsables de la replicación y el empaquetamiento del genoma de VAAr en células huésped infectadas con VAA. Los genes *cap* codifican para proteínas que comprenden la cápside del VAAr producido por las células infectadas. Por tanto, se utiliza el virus VHSr/rc para permitir que las células productoras produzcan los productos proteicos de los genes *rep* y *cap* de VAA. El virus de expresión de VHSr contiene un transgén (es decir, un ácido nucleico distinto de VAA) que codifica para un gen(es) de interés insertado(s) en dos ITR de VAA, junto con elementos promotores necesarios para la expresión del transgén. Las ITR son responsables de la capacidad de VAA nativo para insertar su ADN en el genoma de células huésped tras la infección o persistir de otra manera en las células infectadas.

Para producir VAAr, se coinfecta una célula productora (por ejemplo, simultáneamente) con los dos virus VHSr diferentes, y se cultivan las células coinfectadas en condiciones que permiten la producción de VAAr, por ejemplo, en un medio apropiado en un incubador humidificado a 37°C, con el 5% de CO. Utilizando este procedimiento se

consiguieron niveles de producción de VAAr de hasta al menos 5000-6000 p.i./célula. En condiciones experimentales idénticas, los resultados demostraron de manera sistemática que el procedimiento de coinfección simultánea era al menos dos veces tan eficaz como un procedimiento de infección individual. Los números de VAAr infecciosos producidos por célula mediante el protocolo de coinfección simultánea oscilaron entre aproximadamente 2300-6000 p.i./célula. Por el contrario, en las mismas condiciones, el intervalo tras la infección individual era de desde aproximadamente 1200-1600 p.i./célula.

Los estudios descritos en la presente memoria revelaron que varias variables experimentales afectaban a la producción de VAAr utilizando el procedimiento de coinfección simultánea (es decir, la célula se infecta con los diferentes VHSr al mismo tiempo o en el plazo de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 ó 120 minutos entre sí). Es digno de mención la observación de que la coinfección simultánea con los dos virus, es decir VHSr/rc y el virus de expresión de VHSr fue bastante superior a la infección doble o múltiple con los mismos virus (es decir, la infección con el primer VHSr, seguida por la infección con el segundo VHSr tras un intervalo de horas, por ejemplo 4-24). Estos experimentos revelaron la importancia del momento de la adición de los dos virus, demostrando la clara superioridad de la coinfección con respecto a la infección doble, incluso con retardos de tan sólo 4 horas entre la adición del primer y el segundo VHSr.

Las cantidades relativas de los virus primero y segundo añadidos en el momento de la coinfección simultánea también presentaron un efecto pronunciado sobre la producción de VAAr. Se obtuvieron los mejores resultados cuando la razón de un primer virus (VHSr/rc) con respecto a un segundo virus (VHSr/GFP) era de aproximadamente 8:1.

Otro parámetro que afecta significativamente a los rendimientos de VAAr en el protocolo de coinfección es la elección de la línea celular utilizada para la producción de VAAr. Los experimentos diseñados para someter a prueba dos líneas celulares utilizadas comúnmente para la producción de VAAr, es decir células 293 y Vero, demostraron que de las dos, 293 fue claramente la línea celular de elección, produciendo aproximadamente 5 veces la cantidad de VAAr de las células Vero que se hicieron crecer, se infectaron y se recogieron en las mismas condiciones. Otras variables que afectan significativamente a los rendimientos de VAAr incluyen la densidad de siembra en placa inicial de la línea celular productora (por ejemplo, 293) y el tiempo de recogida de las células productoras.

4.4 Construcción de virus VHS recombinantes

La invención utiliza dos o más virus VHSr en un protocolo de coinfección simultánea para producir VAAr. En la técnica se conocen procedimientos de preparación de VHSr a partir de VHS-1 (Conway *et al.*, 1999).

VHSr/rc. En una forma de realización de la invención, se utilizó un VHS recombinante designado como VHSr/rc para demostrar la eficacia del nuevo procedimiento de producción de VAAr. Este virus se basó en un vector recombinante que expresa los genes *rep* y *cap* de VAA-2 en un vector de VHS-1 mutante designado como d27.1 (Rice y Knipe, 1990) y se preparó tal como se describió previamente (Conway *et al.*, 1999). Como resultado de la mutación, este vector no produce ICP27. Una ventaja de la utilización de un mutante de ICP27 para la producción de VAAr es que se conoce que el proceso de corte y empalme en la célula huésped del ARN mensajero está inhibido por ICP27 (Sandri-Goldin y Mendoza, 1992). ICP27 probablemente también afecta al proceso de corte y empalme apropiado de los mensajes de *rep* y *cap* de VAA-2. Se eligió este vector porque presenta replicación defectuosa y se esperaba que mostrase citotoxicidad reducida en comparación con VHS-1 de tipo natural (wt) en una línea celular no permisiva.

El virus d27.1 presenta otras características varias que hacen su utilización ventajosa para el diseño de un virus auxiliar para la producción de VAAr. En primer lugar, expresa los genes tempranos que se sabe que se requieren para la producción de VAAr (Weindler *et al.*, 1991, Rice y Knipe, 1990). Además, d27.1 sobreexpresa ICP8, la proteína de unión a ADN monocatenario que es el producto de UL29, uno de los genes de VHS-1 esenciales para la replicación y el empaquetamiento de VAA (Weindler *et al.*, 1991, Rice y Knipe, 1990, McCarthy, *et al.*, 1989). Por tanto, se pronosticaría que el aumento de la expresión de ICP8 aumentará la producción de VAAr. En una realización del vector VHS/rc utilizado en la invención, se expresaron los genes *rep* y *cap* de VAA-2 bajo el control de sus promotores nativos. Los promotores p5 y p19 de VAA-2 controlan la expresión de Rep 78 y 68 y Rep 52 y 40, respectivamente. El promotor p40 controla la expresión de VP1, VP2 y VP3. Resultará evidente para los expertos en la materia que puede utilizarse cualquier otro promotor adecuado para el fin y también está dentro del alcance de la invención. Los ejemplos de otros promotores adecuados incluyen promotor precoz de SV40 y promotor de tk de herpes, promotor inducible de metalotianina, promotor de virus de tumor mamario de ratón y promotor de β -actina de pollo.

Virus de expresión de VHSr. Se produjo el virus de expresión de VHSr-1 de la invención casi de la misma manera que VHSr/rc, mediante recombinación homóloga en el gen *tk* de VHS-1, partiendo de plásmidos pHSV-106 y plásmido pTR-UF5. Este último es un constructo proviral de VAA con ITR de VAA-2 que flanquea tanto un casete de expresión de gen de resistencia a la neomicina (neo) como GFP, en el que la expresión de la GFP está dirigida por el promotor de CMV humano (Conway *et al.*, 1999). VHSr/GFP contiene un casete de expresión de *gfp* dirigido por CMV dentro de las ITR de VAA y se recombinó en el locus de *tk* del virus d27.1-*lacZ*.

4.5 Genes *rep* y *cap* de diferentes serotipos de VAA

Los genes *cap*, y en algunos casos *rep*, de VAA utilizados en la invención pueden derivarse de cualquiera de varios serotipos de VAA incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Los genes de estos serotipos pueden aislarse utilizando procedimientos convencionales (Chiorini *et al.*, J Virol 73:1309-19, 1999; Rutledge *et al.*, J Virol 72:309-19, 1998; Xiao *et al.*, J Virol. 73:3994-4003, 1999; Muramatsu *et al.*, Virology 221:208, 1996; y Chiorini, *et al.*, J. Virol. 71:6823, 1997; Sambrook y Russell citado anteriormente). Los genes *rep* de serotipo 2 y TR se prefieren particularmente porque se han caracterizado en gran detalle vectores de serotipo 2 y están disponibles comúnmente constructos derivados del serotipo 2. Se comentan vectores de VAA particulares y proteínas de VAA de diferentes serotipos en Chao *et al.*, Mol. Ther. 2:619-623, 2000; Davidson *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences 97:3428-3432, 2000; y Xiao *et al.*, J. Virol. 72:2224-2232, 1998.

Las cápsides de otros serotipos de VAA ofrecen ventajas en determinadas aplicaciones *in vivo* con respecto a los vectores de VAAr basados en la cápside de VAA-2. En primer lugar, la utilización apropiada de vectores de VAAr con serotipos particulares puede aumentar la eficacia de inserción génica *in vivo* con respecto a determinadas células diana que están escasamente infectadas, o no infectadas en absoluto, por los vectores basados en VAA-2. En segundo lugar, puede ser ventajoso utilizar vectores de VAAr basados en otros serotipos de VAA si se vuelve clínicamente necesaria una nueva administración del vector de VAAr. Se ha demostrado que la nueva administración del mismo vector de VAAr con la misma cápside puede ser ineficaz, posiblemente debido a la generación de anticuerpos neutralizantes generados contra el vector (Xiao, *et al.*, 1999, Halbert, *et al.*, 1997). Este problema puede evitarse mediante la administración de una partícula de VAAr cuya cápside se compone de proteínas de un serotipo de VAA diferente, no afectado por la presencia de un anticuerpo neutralizante contra el primer vector de VAA (Xiao, *et al.*, 1999). Por los motivos anteriores, son deseables vectores de VAAr contruidos utilizando genes *cap* de serotipos distintos de, o además de VAA-2.

Se reconocerá que la construcción de vectores de VHS recombinantes similares a VHSr/rc pero que codifican para los genes *cap* de otros serotipos de VAA (por ejemplo VAA-1, VAA-3 a VAA-8) puede conseguirse utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria para producir VHSr/rc. Las ventajas significativas de construcción de estos vectores de VHSr adicionales son la facilidad y el ahorro de tiempo, en comparación con procedimientos alternativos utilizados para la producción a gran escala de VAAr. En particular, se evita el difícil procedimiento de construcción de nuevas líneas celulares inducibles por *rep* y *cap* para cada serotipo de cápside diferente.

4.6 Transgenes

El virus de expresión de VHSr utilizado en el procedimiento de la invención contiene un transgén, es decir, un ácido nucleico distinto de VAA que codifica para un gen de interés. Tal como se describe en las secciones de ejemplos a continuación, el transgén podría codificar para una proteína indicadora tal como proteína verde fluorescente (GFP; véase, por ejemplo, Cheng *et al.* Nat. Biotechnol., 14: 606-609, 1995), β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*), CAT (codificado por el gen *cat*), luciferasa (véase, por ejemplo, Himes y Shannon, Methods Mol. Biol., 130: 165-174, 2000), u otros. Para una revisión de indicadores, véase Naylor, L.H., Biochem. Pharmacol, 58:749-757, 1999. Preferiblemente, el transgén codifica para un polipéptido que es uno que puede cambiar el fenotipo de una célula cuando se expresa en esta célula. Por ejemplo, el transgén podría codificar para una molécula terapéutica, por ejemplo, un polipéptido o ARN funcional que puede corregir un defecto genético cuando se expresa en un organismo. Para terapia génica en seres humanos, el polipéptido puede ser uno asociado actualmente con una enfermedad particular o los que se identifique posteriormente que están asociados con una enfermedad particular. Se conocen varios genes que codifican para polipéptidos de este tipo. Véanse, por ejemplo, Amado, R.G. y Chen, I.S. Science 285: 674-6, 1999; Verma, I.M., Scientific America 263:68-72, 1990; Miller, A.D., Nature 357: 455-460, 1992; Costantine, *et al.*, Gene Therapy 7: 93-109, 2000; Persons, D.A. y Nienhuis, A.W., PNAS 97:5022-5024; Morishita, *et al.*, NY Acad. Sci. 902: 369-376, 2000; y Kouraklis, Dig. Dis. Sci. 45:1045: 1052, 2000.

Por ejemplo, puede utilizarse el gen de adenosina desaminasa (ADA) para tratar la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG); puede utilizarse el gen de la fibrosis quística para tratar la fibrosis quística; puede utilizarse el gen de β -globina para tratar anemia drepanocítica y β -talasemia; puede utilizarse el gen de proinsulina/insulina para tratar la diabetes; pueden utilizarse genes de hormonas de crecimiento para tratar deficiencia de hormona de crecimiento; pueden utilizarse genes de hormonas tiroideas o genes de receptores de hormonas tiroideas para tratar la deficiencia de hormonas tiroideas; pueden utilizarse el gen de catepsina D, el gen de β -glucosidasa, el gen de β -glucocerebrosidasa, el gen de β -galactosidasa y el gen de arilsulfatasa A para tratar la enfermedad de almacenamiento lisosómico grave; pueden utilizarse genes de citocinas (por ejemplo, los que codifican para las interleucinas 1 a 18, factores estimulantes de colonias, de interferencia, factores de necrosis tumoral y similares) para terapia inmunogénica; pueden utilizarse genes de receptores de lipoproteínas receptoras de baja densidad (LDL) para tratar la hipercolesterolemia; puede utilizarse el gen de alfa-antitripsina para tratar deficiencia de alfa1-antitripsina; puede utilizarse el gen de surfactante pulmonar para tratar la deficiencia de surfactante pulmonar; pueden utilizarse genes de factor VIII y IX como factor de coagulación sanguínea para el tratamiento de la hemofilia; pueden utilizarse el gen de la proteína C anticoagulante para tratar la trombosis espontánea; puede utilizarse el gen de activador del plasminógeno para tratar la embolia pulmonar; puede utilizarse

el gen de calicreína o gen de péptido natriurético auricular o antígenos contra el receptor de tipo I de angiotensina II para tratar la hipertensión; y pueden utilizarse genes de factor de crecimiento endotelial vascular para tratar la enfermedad cardiovascular. Todavía otros genes podrían ser útiles para tratar una enfermedad, incluyendo los que codifican para, por ejemplo, eritropoyetina para la maduración de glóbulos rojos, factores de crecimiento de fibroblastos para la angiogénesis y cicatrización de heridas; factor de crecimiento de hepatocitos para la angiogénesis; hormonas estimulantes del folículo y hormona luteinizante para trastornos reproductivos; subunidad b de fosfodiesterasa de GMPc (PDEb) para la retinitis pigmentosa; tirosina hidroxilasa (TH), aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), y/o GTP-ciclohidrolasa (GTPCH) para la enfermedad de Parkinson; factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF) y/o factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF) para la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica; genes antiapoptóticos tales como bcl-2, los que codifican para la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP) y el transportador vesicular de monoaminas (VMAT) para la enfermedad de Parkinson; el factor de crecimiento nervioso (NGF) para la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer; el factor neurotrófico ciliar (CNTF) para la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica; el inhibidor del antagonista de interleucina-1, la proteína de choque térmico y NGF para la isquemia; la proteína de choque térmico para la epilepsia; el neuropéptido para la función endocrina; y el gen de VHS-timidina cinasa para tumores cerebrales.

4.7 Secuencias de control de la expresión

El virus de expresión de VHSr puede incluir una o más secuencias de control de la expresión funcionalmente unidas al transgén. Se conocen numerosas secuencias de este tipo. Las que van a incluirse en el virus de expresión de VHSr utilizado en la invención pueden seleccionarse basándose en su función conocida en otras aplicaciones. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión incluyen promotores, aisladores, silenciadores, IRES, potenciadores, sitios de iniciación, señales de terminación y colas de poliA.

Los ejemplos de promotores virales constitutivos que podrían utilizarse incluyen los promotores de virus de herpes simple (VHS), timidina cinasa (TK), virus de sarcoma de Rous (VSR), virus de simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (VTMR), E1A de Ad y de CMV. Los ejemplos de promotores de mamífero constitutivos incluyen diversos promotores de genes de mantenimiento, por ejemplo, el promotor de β -actina de pollo. Los ejemplos de promotores inducibles que podrían utilizarse incluyen promotores de genes tales como genes de citocromo P450, genes de proteínas de choque térmico, genes de metalotioneína y genes inducibles por hormonas, tales como el promotor del gen de estrógeno. Otro ejemplo de un promotor inducible es el promotor de tetVP16 que es sensible a tetraciclina. El promotor de proteína de unión reguladora de esterol (SREBP-1c) es otro promotor inducible útil dentro de la invención (Deng *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun 290:256-262, 2002; Kim *et al.*, J. Clin. Invest. 101: 1-9, 1998; y Azzout-Marniche *et al.*, Biochem. J. 350 Pt 2:389-393, 2000).

Los elementos reguladores y/o promotores específicos de tejido son útiles en determinadas formas de realización de la invención. Los ejemplos de promotores de este tipo que pueden utilizarse con los vectores de expresión de la invención incluyen promotores de los genes de transferrina, α 1-antitripsina, inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1), albúmina, proteína del núcleo de virus de la hepatitis B, y receptores de LDL y apolipoproteína AI específicos para células hepáticas; genes de MLC-2v, cadena pesada de alfa-miosina, y cadena ligera de miosina-2, específicos para células cardíacas; y el promotor A de utrofina, distrofina humana, creatina cinasa, miogenina, cadena pesada de alfa-miosina, y promotores específicos de músculo de péptido natriurético, específico para células musculares.

5.0 Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

5.1 Ejemplo 1. Materiales y procedimientos

Virus VHS recombinantes. Se construyó un virus auxiliar de VHS-1 recombinante, designado como VHSr/rc, que contenía genes *rep* y *cap* de VAA-2, mediante técnicas de recombinación homóloga tal como se describió anteriormente para un vector de VHSr-1 designado como d27.1-rc, (Conway *et al.*, 1999). Se construyó un segundo VHSr-1, un virus de expresión de VHSr designado como VHSr/GFP, que contenía las ITR de VAA-2 que flanquean la GFP, tal como sigue.

Líneas celulares para la producción de VAAr y titulación. Se obtuvieron líneas celulares Vero, 293 y C12 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD). Las líneas celulares utilizadas para la producción de VAAr mediante infección con VHSr incluyeron 293, 293-GFP y en algunos casos Vero. La línea celular 293-GFP es una línea celular derivada de 293, producida a partir del plásmido pTR-UF5, en la que se han integrado las ITR de VAA-2 y GFP, dirigidas por un promotor de CMV, en el genoma de las células (Conway *et al.*, 1997).

Elección de células productoras para protocolos de infección individual y de coinfección de VHSr. En muchos de los ejemplos descritos en la presente memoria que implican la producción de VAAr por células productoras, se comparó

la técnica de coinfección simultánea utilizando dos VHSr para insertar todos los componentes requeridos para la producción de VAAr con una técnica de infección individual utilizando sólo VHSr/rc. En el protocolo de infección individual, se llevaron a cabo las infecciones utilizando la línea celular 293-GFP, en la que la proteína de interés (GFP) ya está presente dentro de la composición genética de las células. Por tanto, las células productoras para el protocolo de infección individual eran 293-GFP, mientras que para los protocolos de infección doble, las células productoras eran células 293 no modificadas, complementadas mediante la inserción del casete de expresión de GFP en el segundo VHSr, es decir VHSr/GFP. Para protocolos de infección tanto individual como doble, las líneas celulares (o bien 293 o 293-GFP o bien Vero) se sembraron en placa a la misma densidad (generalmente 1×10^7 células por matraz T75) y se trataron igual por lo demás. En experimentos diseñados para someter a prueba el efecto de variar la densidad siembra en placa de 293, se sembraron células a densidades de siembra en placa iniciales de 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 y $2,0 \times 10^7$ células/matraz.

Infección de células productoras con VHSr y recuperación de VAAr. Se diluyeron los virus utilizados en los procedimientos de infección a partir de preparaciones madre hasta las concentraciones deseadas con DMEM, luego se añadieron a los matraces que contenían células productoras 293 o 293-GFP o Vero. En el momento de la adición de los virus, que fue generalmente el día siguiente tras la siembra en placas, las células presentaban una confluencia de aproximadamente el 70-80%. Los títulos de las preparaciones madre de VHSr/rc y VHSr/GFP estaban en el intervalo de 5×10^7 - 1×10^8 de partículas infecciosas (PI)/ml. En algunos de los protocolos de infección doble, se añadieron proporciones variables de VHSr/rc con respecto a VHSr/GFP, oscilando la MOI de dos virus recombinante tal como sigue: rc/GFP: 8/0,7, 8/1, 8/1,5, 8/2, 8/3, 4/1,5, 6/1,5, 12/1,5 y 16/1,5. En otros experimentos que utilizaron el protocolo de infección doble, se sometió a prueba el momento óptimo de adición de los dos virus. En estos experimentos, se añadieron VHSr/rc y VHSr/GFP a las células 293 a intervalos diferentes en vez de simultáneamente. En un experimento típico, se añadieron los dos virus a las células o bien simultáneamente, o bien con un retardo de 4, 8 o 24 horas entre la adición del primer y el segundo virus. Se sometió a prueba el efecto del retardo de la adición de cualquier virus, es decir añadiéndose en primer lugar o bien VHSr/rc o bien VHSr/GFP.

Tras un intervalo de incubación, se recogieron y sedimentaron las células infectadas por virus. Entonces, se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de DMEM y se recuperó VAAr asociado a células de las células productoras mediante lisis de las células utilizando técnicas convencionales que implicaban tres ciclos de congelación y descongelación (Conway *et al.*, 1999). Entonces, se titularon los lisados celulares para la cuantificación de las unidades infecciosas de VAA-GFP. En experimentos diseñados para someter a prueba el tiempo de recogida óptimo, se recogieron las células productoras a diversos intervalos (22, 26, 30, 34, 46 horas) tras la infección.

Ensayo de VAAr infeccioso. La línea celular C12 es una línea celular derivada de HeLa con expresión de gen *rep* de VAA-2 inducible (Clark *et al.*, 1995). Se empleó esta línea celular en experimentos utilizados para someter a ensayo el número de partículas infecciosas de VAAr producidas mediante los procedimientos de producción de la invención. Para este fin, se sembraron generalmente células C12 en placas de 96 pocillos a densidades de $1,2-1,6 \times 10^4$ células/pocillo. En algunos experimentos diseñados para someter a prueba el efecto de la densidad de siembra de C12, se utilizó un intervalo de mayores densidades de siembra en placa ($2,4, 3,3, 4,2 \times 10^4$ célula/pocillo). Se determinó la cantidad de VAA-GFP producido utilizando un ensayo celular de fluorescencia titulando el virus en el lisado celular mediante diluciones en series de células C12 en placas de 96 pocillo tras la coinfección con adenovirus (MOI de 20) y recuento de células fluorescentes mediante microscopia de fluorescencia. Se ha descrito previamente el ensayo de fluorescencia utilizado para este fin (Conway *et al.*, 1999, Zolotukhin *et al.*, 1999). Luego se calculó el rendimiento viral por célula y se determinó la MOI más eficaz.

5.2 Ejemplo 2. Comparación de niveles de producción de VAAr utilizando coinfección simultánea e infección individual.

Este ejemplo describe un procedimiento sin transfección, sin adenovirus de producción de partículas infecciosas de VAAr utilizando la coinfección simultánea de células 293 con dos virus VHS-1 recombinantes, VHSr/rc y VHSr/GFP, y demuestra la superioridad del nuevo procedimiento con respecto a un protocolo de infección individual utilizando VHSr/rc solo en células productoras que presentan un casete de expresión VAA-GFP integrado, insertado en el genoma.

Se realizaron ensayos en los que se comparó la producción de VAAr utilizando los protocolos de infección individual y de coinfección descritos en el ejemplo 1 anterior. La figura 1 muestra los resultados de tres experimentos separados en los que se sembraron en placa células 293 o 293-GFP de manera concurrente a la misma densidad de siembra, y o bien infectadas individualmente con VHSr/rc (células 293-GFP) o bien coinfectadas con VHSr/rc y VHSr/GFP (células 293). Tras la recogida y la preparación de lisados celulares que contenían VAAr-GFP producidos mediante los dos procedimientos, se infectaron células C12 con el VAAr-GFP y se determinaron los números de VAAr-GFP infecciosos. Los resultados mostraron que en las condiciones idénticas del experimento, el protocolo de coinfección simultánea era mucho más eficaz que el de infección individual sólo con VHSr/rc. Los rendimientos de VAAr en los tres experimentos fueron de 2300, 2600 y 2420 p.i./célula utilizando el protocolo de coinfección, frente a 1600, 1400 y 1260, respectivamente para el procedimiento de infección individual. Con el nivel de producción que utiliza la coinfección normalizado hasta el 100%, se encontró que la producción utilizando la infección individual

oscilaba entre un valor bajo de aproximadamente el 52% y un valor alto de aproximadamente el 65% del obtenido mediante la coinfección (figura 1).

5.3 Ejemplo 3. Coinfección simultánea: efecto del momento de la infección por virus

El ejemplo anterior demuestra la superioridad de un protocolo de coinfección simultánea utilizando dos VSHr recombinantes (VHSr/rc y VHSr/GFP) con respecto a la infección individual utilizando sólo VHSr para insertar los genes *rep* y *cap* en las células productoras. Este ejemplo, que implica un protocolo de coinfección utilizando VHSr/rc y VHSr/GFP, muestra el efecto de variar el tiempo de infección con cada uno de los virus recombinantes.

Se llevaron a cabo los experimentos mediante o bien coinfección de cultivos por duplicado de células 293 con VHSr/rc y VHSr/GFP, o bien mediante infección doble de las células con uno de los dos virus (en el tiempo 0) y la adición del otro después de un intervalo de 4, 8 ó 24 horas. La figura 2 muestra los resultados que demuestran que la coinfección era marcadamente superior a la infección múltiple en cada uno de los tiempos indicados. Con la adición de VHSr/rc, en primer lugar, seguida por VHSr/GFP tras un retardo de 4 horas, el rendimiento de VAAr disminuyó hasta aproximadamente el 30% del valor obtenido mediante la coinfección (590 frente a 1940 p.i./célula). Con retardos más largos de 8 horas y 24 horas, la producción de VAAr era insignificante (74 y 14 p.i./célula, respectivamente). Se obtuvieron resultados similares cuando se añadió VHSr/GFP, en primer lugar, y se añadió VHSr/rc tras un retardo de 8 o 24 horas. En este caso también, la producción de VAAr fue insignificante en comparación con los valores de coinfección simultánea (86 y 20 p.i./célula, frente a 1940 p.i./célula) (figura 2).

5.4 Ejemplo 4. Coinfección simultánea: efecto de variar las razones de VHSr

El ejemplo anterior muestra que la coinfección es superior a la infección múltiple utilizando dos virus VHS recombinantes para la producción de VAAr en células productoras. Este ejemplo, que utiliza la coinfección simultánea con VHSr/rc y VHSr/GFP, demuestra el efecto de variar las proporciones relativas de los dos virus en el procedimiento de coinfección. Por simplicidad, la razón de VHSr/rc con respecto a VHSr/GFP se abrevia como "R/G."

La figura 3 muestra datos de dos experimentos en los que se varió la razón R/G, siendo en todos los casos el valor para R mayor que para G. Los valores para la razón R/G variaron desde un valor bajo de (8/0,7) hasta un valor alto de (8/2). Los resultados de este ensayo mostraron que se produjo la mejor producción cuando la razón R/G era de 8:1, con una MOI de 12 y 1,5, respectivamente para R y G.

5.5 Ejemplo 5. Coinfección simultánea: efecto del tiempo de recogida

Este ejemplo demuestra que la elección del momento para la recogida de las células productoras puede afectar al rendimiento de VAAr.

Se llevaron a cabo ensayos tal como se describieron anteriormente con cultivos por duplicado de células 293 coinfectadas en las mismas condiciones con concentraciones idénticas de R/G. Sólo se varió el tiempo de recogida, desde 22 hasta 46 horas tras la coinfección. Los resultados de este ensayo (figura 4) revelan que se obtuvieron los mayores rendimientos de VAAr cuando el período de incubación antes de la recogida fue de 46 horas. Cuando se realizó la recogida de células entre 22 y 26 horas tras la coinfección, el rendimiento de VAAr-GFP fue de aproximadamente 1900 partículas infecciosas (p.i.) por célula. Por el contrario, el retardo de la recogida hasta las 26, 34 y 46 horas tras la coinfección dio como resultado mejoras en el rendimiento de aproximadamente 2600, 2800 y 3000 p.i./célula, respectivamente (figura 4).

5.6 Ejemplo 6. Coinfección simultánea: efecto de la densidad de siembra de células 293

Para determinar el efecto de la densidad de siembra de las células productoras sobre la producción de VAAr-GFP, se sembraron en placa células 293 a cinco densidades de siembra que oscilaban entre $0,5 - 2,0 \times 10^7$ células por matraz T75. Tras la coinfección con VHSr/rc y VHSr/GFP, se recogieron las células y se cuantificó la producción de VAAr. Los resultados mostraron una reducción progresiva en la producción de VAAr en cada una de las densidades de siembra mayores que $0,5 \times 10^7$ células por matraz (figura 5). En los experimentos mostrados, los valores de producción para $0,5, 0,7, 1,0, 1,5$ y $2,0 \times 10^7$ fueron de 4200, 3860, 3000, 2660 y 2160 p.i./célula.

5.7 Ejemplo 7. Coinfección simultánea: efecto de la densidad de células C12

Se determinó el número de VAAr infecciosos contenidos en el lisado celular de las células productoras mediante la infección de una segunda línea celular con el VAAr. La línea celular utilizada para este fin fue C12. Para determinar el efecto de la densidad de siembra de células C12 para este ensayo, se sembraron en placa células C12 a diversas densidades de siembra y se utilizaron para el análisis de la producción de VAAr-GFP tras el tratamiento con lisados de células productoras 293 coinfectadas con VHSr/rc y VHSr/GFP. Los resultados, mostrados en la figura 6, demostraron que se obtuvo la sensibilidad óptima del ensayo de fluorescencia de células sembradas a la menor densidad, es decir $2,4 \times 10^4$ células/pocillo. A mayores densidades en placa iniciales, se redujo la sensibilidad de

detección hasta aproximadamente el 55% y el 25%, respectivamente, para células sembradas a $3,3 \times 10^4$ y $4,2 \times 10^4$ células/pocillo.

5.8 Ejemplo 8. Coinfección simultánea: comparación de líneas celulares productoras

Este ejemplo muestra una comparación de la eficacia de células 293 en comparación con células Vero para la producción de VAAr. Para estos ensayos, se trataron de manera idéntica células 293 y células Vero. Los resultados de dos experimentos separados se muestran en la figura 6, en la que se demuestra claramente que las células 293 son superiores a las células Vero para la producción de VAAr utilizando el protocolo de coinfección anterior que utiliza VHSr/rc y VHSr/GFP. En el primero de los dos experimentos mostrados, las células 293 produjeron 1940 p.i./célula mientras que en las mismas condiciones, las células Vero produjeron 480 p.i./célula. En el segundo experimento, los niveles de producción respectivos fueron de 4000 frente a 720 p.i./célula.

5.9 Ejemplo 9. Coinfección simultánea utilizando vectores VHSr alternativos

Se determinaron las proteínas de la cápside de un producto de VAAr mediante el serotipo del *rep* de VAA utilizado en la construcción del VHSr/rc. El siguiente ejemplo proporciona un procedimiento de producción de VAAr con cápsides basadas en diversos serotipos de VAA, utilizando el protocolo de coinfección simultánea descrito anteriormente.

Construcción de virus VHSr. Se han descrito procedimientos para la construcción de vectores de VHSr que expresan los genes *rep* de VAA-2 (Conway *et al.*, 1999). El producto de un vector viral de este tipo, utilizado junto con un virus de expresión de VHSr, es un VAAr con proteínas de la cápside de serotipo 2 de VAA-2. Pueden obtenerse vectores de VHS recombinantes alternativos que expresan los genes *rep* de VAA-2 y o bien los genes *cap* de VAA-1, VAA-3 o VAA-4 tal como sigue. VAA-1 a VAA-8 pueden adquirirse de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Se sembraron células 293 en placas de 60 mm. 24 horas después, se infectaron las células 293 con el serotipo de VAA deseado (MOI de 500 partículas por célula) y luego se coinfectaron con Ad (MOI de 10) para producir productos intermedios replicativos bicatenarios de los genomas de VAA. Veinticuatro horas tras la infección, se aísla ADN de bajo peso molecular mediante extracción de Hirt tal como se describe en Conway *et al.*, (1997). Entonces este ADN sirve como molde para la amplificación por PCR de los genes *cap* de VAA. Se utilizan cebadores de PCR específicos para los genes *cap* de serotipo de VAA particular para amplificar el gen *cap* a partir del molde apropiado. Estos cebadores presentan sitios *KpnI* incorporados en su extremo 5'. Las condiciones de reacción de PCR son condiciones estándar para la desnaturalización, hibridación y extensión que se han empleado previamente (Conway *et al.*, 1997).

Se separan los productos de PCR mediante electroforesis en gel y se purifican. Luego se secuencian los productos de PCR para verificar la fidelidad de la reacción de PCR. Entonces se digieren con *KpnI* los productos de PCR del gen *cap*. El vector pHSV-106-rc codifica para la región *BamHI* del locus *tk* de VHS-1 en el que se han clonado los genes *rep* y *cap* de VAA-2. El vector pHSV-106-rc es el vector de integración utilizado para construir d27.1-rc. También se digiere pHSV-106-rc con *KpnI* para cortar el gen *cap* de VAA-2 cap en 3' del promotor de p40. Entonces se clonan los genes *cap* de VAA del serotipo de interés en el marco en este sitio *KpnI*. Esto da como resultado constructos (pHSV-106-rc1, pHSV-106-rc3 y pHSV-106-rc4) en los que la proteína VP-3 completa (que comprende el 90% de la cápside viral) proviene del nuevo serotipo de VAA. El sitio de clonación utilizado para este fin está en el sentido de 3' del promotor de p40, garantizando que no se altere la regulación de la transcripción de *cap* por el promotor de p40 de VAA-2 y las proteínas Rep.

Para construir los virus recombinantes (por ejemplo *d27.1-rc1*, *d27.1-rc3*, *d27.1-rc4*, *d27.1-rc5*, *d27.1-rc6*, *d27.1-rc7*, *d27.1-rc8*) se linealizan los constructos pHSV-106-rc1, pHSV-106-rc3 y pHSV-106-rc4 mediante digestión de restricción. Entonces, se contranfecta por separado cada virus en células V27 junto con ADN de células infectadas por *d27.1-lacz*. Este procedimiento así como el aislamiento de clones recombinantes mediante dilución limitante se ha descrito en detalle y se usó para preparar el virus original, *d27.1-rc*. (Conway *et al.*, 1999). Se utiliza la digestión de restricción de ADN viral recombinante y la secuenciación del genoma viral para verificar la integración del vector el genoma del VHS. Entonces se determina la eficacia de los recombinantes en la producción de VAAr tal como se describió para *d27.1-rc*.

Protocolos de coinfección. Los protocolos de coinfección simultánea descritos son adecuados para utilizarse con cualquier virus auxiliar VHSr/rc. Aunque se utilizó un VHSr/rc basado en las proteínas de la cápside del serotipo VAA-2 para demostrar la invención, resulta evidente que pueden emplearse vectores de VHSr basados en otros serotipos de VAA. Excepto por la elección del serotipo de VAA (VAA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y otros posible serotipos) en el VHSr/rc, todas las demás etapas en el procedimiento para la producción de VAAr seguirían siendo iguales.

6.0 Bibliografía

Buller, R.M.L. 1981, J Virol 40:241-247.

Chiorini *et al.*, 1999, J Virol 73:1309-1319.

- Clark *et al.*, 2002, Recent advances in recombinant adeno-associated virus vector production. *Kidney Internat.* 61, Symposium 1:S9-S15.
- 5 Conway *et al.*, 1997, *J Virol* 71:8780-8789.
- Conway, *et al.*, 1999, *Gene Ther.* 6:986-93
- Flotte y Carter, 1998, *Methods Enzymol* 292: 717-732.
- 10 Gao *et al.*, 1998, *Hum Gene Ther* 9:2353-236.
- Halbert *et al.*, 1997, *J Virol* 71:5932-5941.
- Hauswirth *et al.*, 1984, *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6466-6470.
- 15 Herzog *et al.*, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5804-5809.
- Johnston *et al.*, 1997, *Hum Gene Ther* 8:359-370.
- 20 Iwaki *et al.*, 1998, *Blood* 91:4600-4607.
- Kaplitt *et al.*, 1994, *Nat Gent* 8:148-154.
- Kessler *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14082-14087.
- 25 Koeberl *et al.*, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1426-1431.
- Knipe, D.M., 1989, *Adv. Virus Res.* 37:85-123: 85-123.
- 30 Kurtzman y Byrne, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14082-14087.
- Matsushita *et al.*, 1998, *Gene Ther* 5:938-945.
- McCarthy *et al.*, 1989, *J. Virol.* 63:18-27.
- 35 Mishra y Rose, 1990, *Virology* 179:632-639.
- Muzczka, N., 1992, *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 97-129.
- 40 Muzczka y Berns, 2001, *Parvoviridae: The viruses and their replication*, págs. 2327-2360. En D. M. Knipe y P.M. Howley (ed.), *Fields Virology*, cuarta edición, Lippincott Williams and Wilkins, Nueva York.
- Monahan *et al.*, 1998, *Gene Ther* 5:40-49.
- 45 Rice y Knipe, 1990, *J. Virol.* 64:1704-1715.
- Rose y Koczot, 1972, *J Virol* 10:1-8.
- Rutledge *et al.*, 1998, *J Virol* 72:309-319.
- 50 Samulski *et al.*, 1998, *Adeno-associated viral vectors*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samulski *et al.*, 1983, *Cell* 33:135-143.
- 55 Sandri-Goldin y Mendoza, 1992, *Genes Dev.* 6: 848-863.
- Snyder *et al.*, 1997, *Hum Gene Ther* 8:1891-1900.
- 60 Wagner *et al.*, 1998, *Lancet* 351: 1702-1703.
- Weindler y Heilbronn, 1991, *J Virol* 65:2476-2483.
- Weller, S.K., 1991. Genetic analysis of HSV-1 gene required for genome replication. En: *Herpes Virus Transcription and Its Regulation*. CRC Press, Boca Ratón, págs. 105-136.
- 65

Xiao *et al.*, 1998, J Virol 72:2224-2232.

Xiao *et al.*, 1999, J Virol 73:3994-4003.

5 Ye *et al.*, 1999, Science 283:88-91.

Zolotukhin *et al.*, 1999, Gene Ther 6:986-993.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir virus adenoasociado recombinante de alto título (VAAr), que comprende: (a) coinfectar simultáneamente una célula 293 con (i) un primer virus de herpes simple recombinante (VHSr) de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico que comprende los genes rep de VAA y cap de VAA, estando cada uno funcionalmente unido a un promotor, y (ii) un segundo VHSr de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico que comprende dos repeticiones terminales internas (ITR) de VAAr, un gen de interés, y un promotor funcionalmente unido a dicho gen de interés, en el que el gen está flanqueado por las ITR; (b) incubar la célula 293; y (c) tras la incubación, recoger los VAAr de la célula 293 de la etapa (b) en la que se producen entre 2.300 y 6.000 partículas infecciosas por célula infectada.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el gen cap de VAA presenta un serotipo seleccionado de entre el grupo constituido por VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7 y VAA-8.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el serotipo del gen cap de VAA es VAA-2.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los genes rep y cap están integrados en el locus del gen de timidina cinasa (tk) del primer VHSr.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el promotor para cada uno de entre el gen rep y el cap en el primer VHSr es un promotor heterólogo seleccionado de entre el grupo constituido por el promotor de CMV, el promotor precoz de SV40, el promotor de tk de herpes, el promotor inducible de metalotionina, el promotor de virus de tumor mamario de ratón y el promotor de beta-actina de pollo.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el promotor heterólogo es el promotor de CMV o el promotor de beta-actina de pollo.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el promotor en el segundo VHSr es el promotor de CMV.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el segundo VHSr comprende además un segundo gen de interés.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el gen de interés codifica para una molécula indicadora.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la molécula indicadora se selecciona de entre el grupo constituido por beta-galactosidasa, neomicina fosforotransferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, timidina cinasa, luciferasa, beta-glucuronidasa, xantina-guanina fosforribosiltransferasa, aminoglicósido, higromicina B, dihidrofolato reductasa/metotrexato y proteína verde fluorescente.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además coinfectar con un tercer virus recombinante seleccionado de entre el grupo constituido por un VHSr que difiere en construcción del primer y segundo VHSr, VAAr y un adenovirus recombinante (Adr).
12. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 11, que comprende además transfectar con al menos un ADN de plásmido que incluye un vector de expresión de AVV.
13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la razón del primer VHSr con respecto al segundo VHSr es de 1:1 a 10:1.
14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la razón del primer VHSr con respecto al segundo VHSr es de 4:1 a 8:1.
15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la razón del primer VHSr con respecto al segundo VHSr es de 8:1.
16. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el gen de interés es un gen terapéutico.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el gen terapéutico se selecciona de entre el grupo constituido por alfa-antitripsina, GAA, eritropoyetina y PEDF.
18. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer VHSr es un mutante de VHS defectuoso en ICP27 de replicación defectuosa seleccionado de entre el grupo constituido por un mutante de VHS d27.1-rc1, d27.1-rc3, d27.1-rc4, d27.1-rc5, d27.1-rc6, d27.1-rc7 y d27.1-rc8.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el mutante de VHS de replicación defectuosa es d27.1-rc8, que sobreexpresa ICP8.

20. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el promotor para los genes rep y cap en el primer VHSr es un promotor homólogo seleccionado de entre el grupo constituido por p40, p5 y p19.

- 5 21. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el promotor para los genes rep y cap en el primer VHSr o el segundo VHSr de replicación defectuosa es un promotor heterólogo.

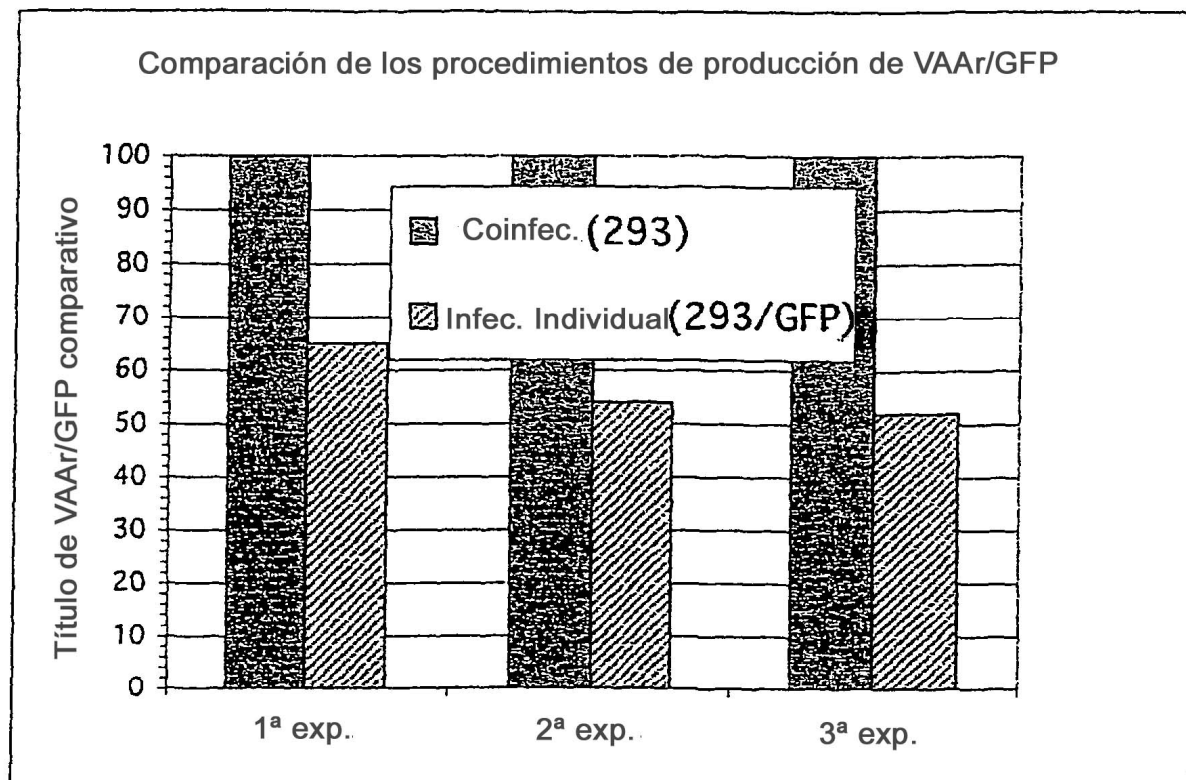


FIGURA 1

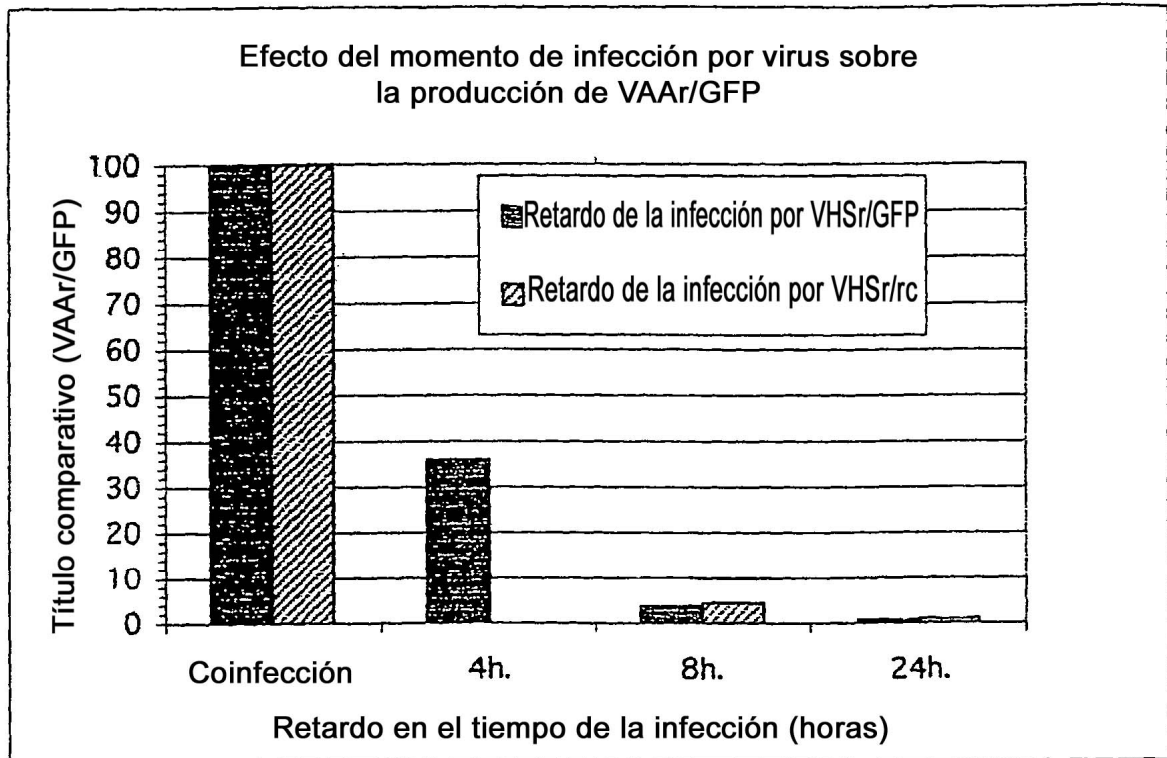


FIGURA 2

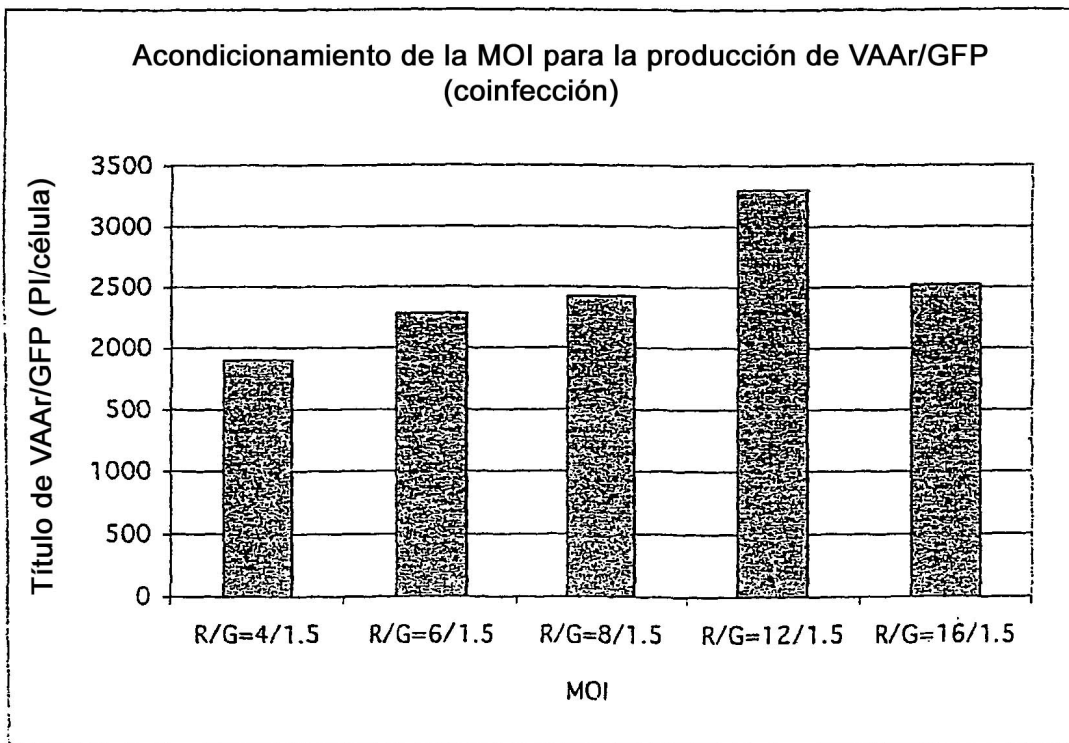
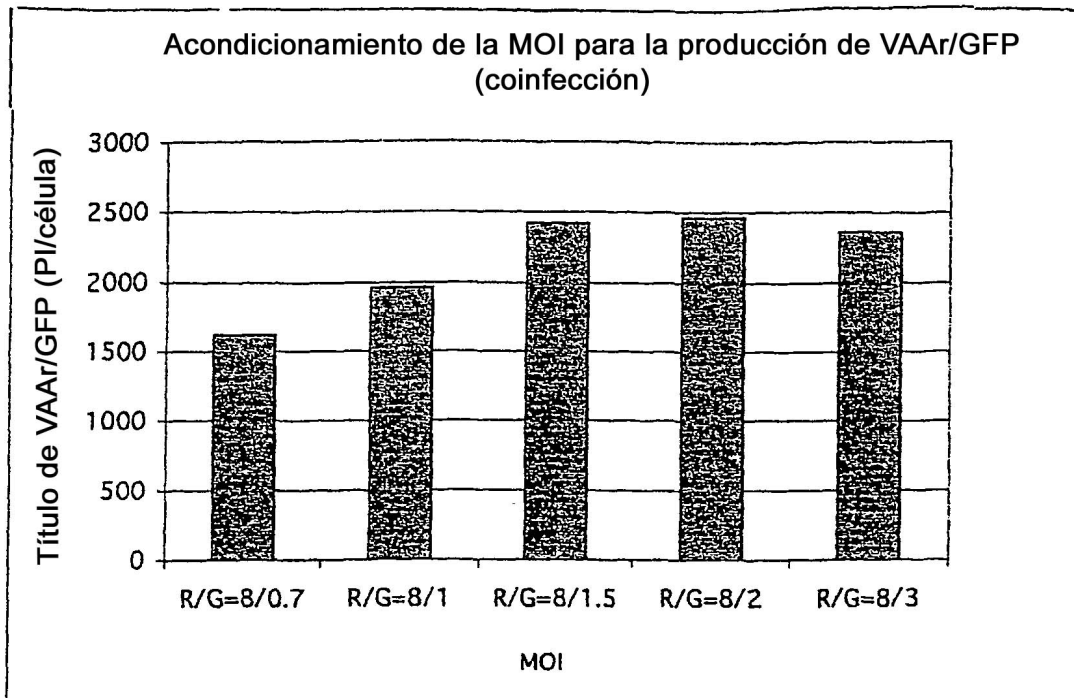


FIGURA 3

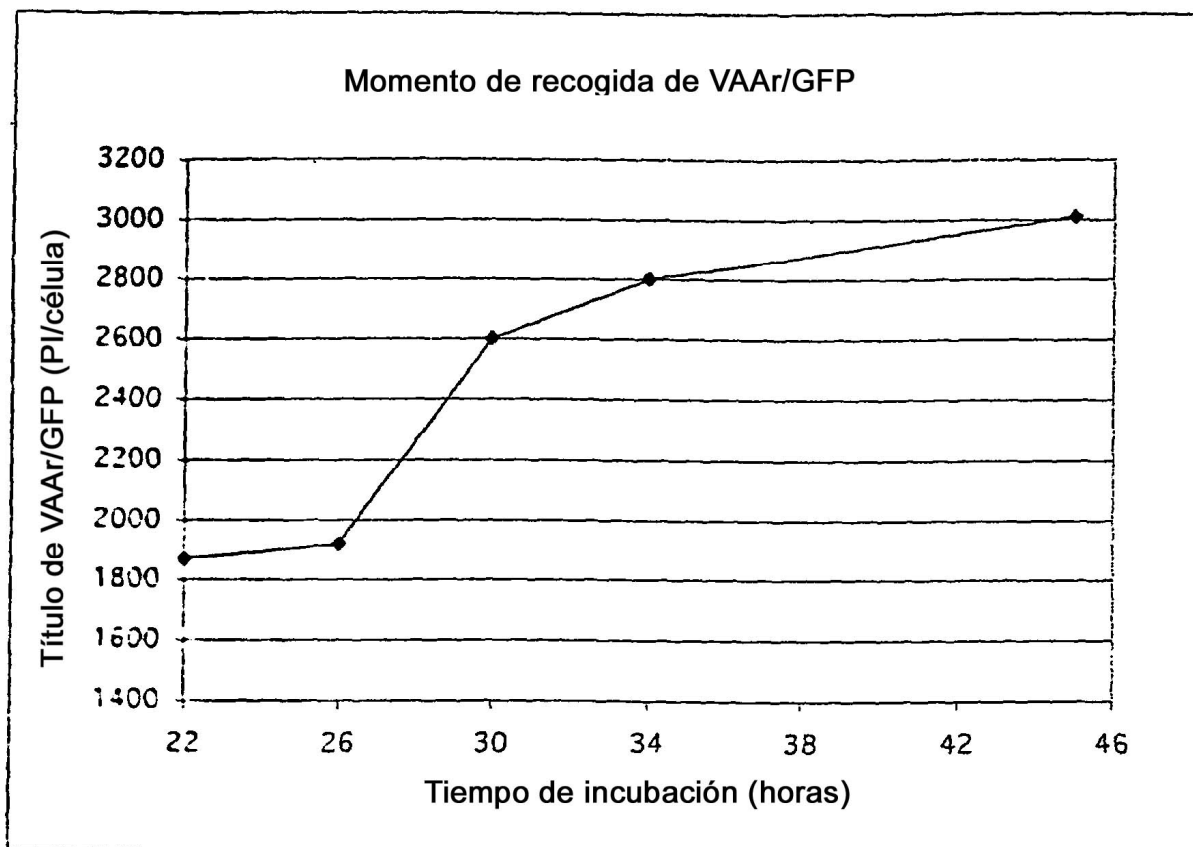


FIGURA 4

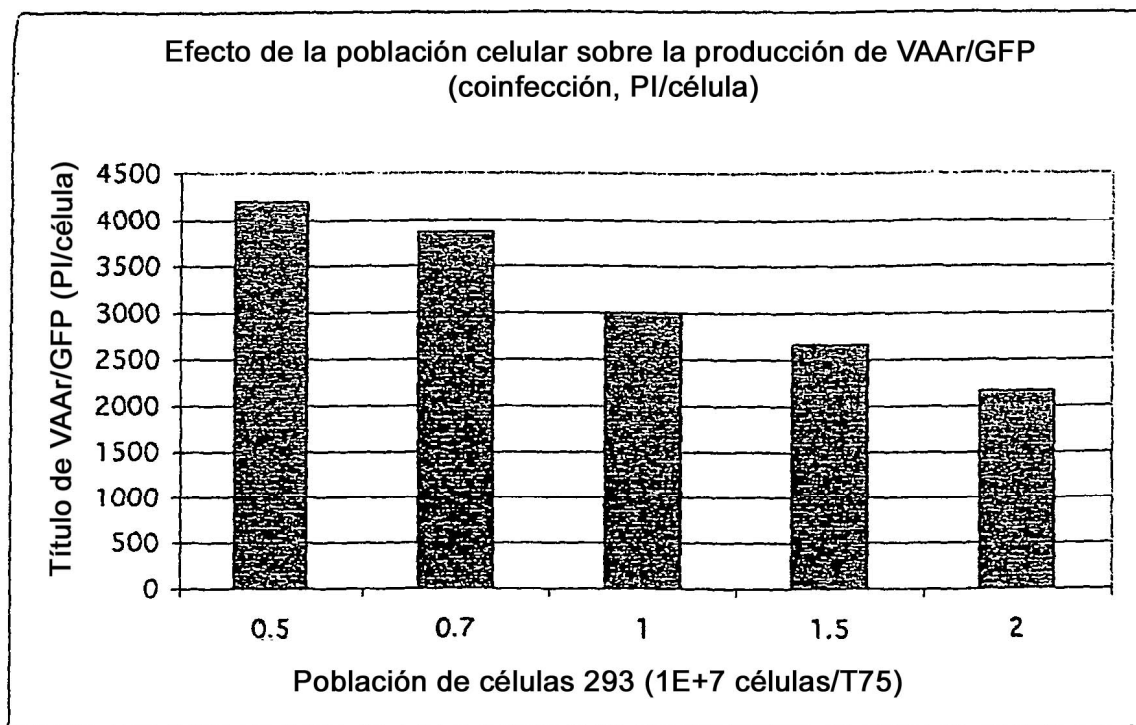


FIGURA 5

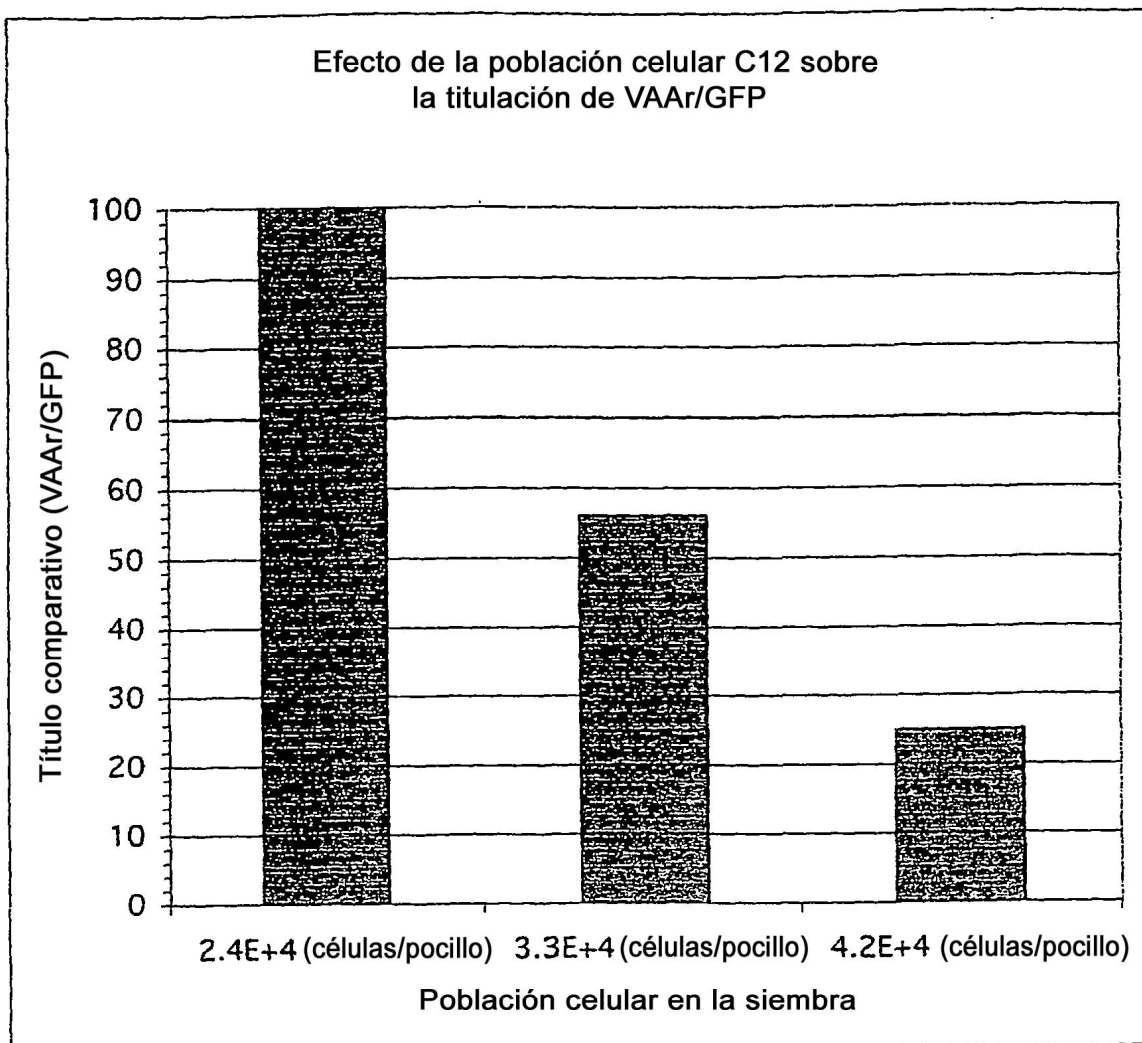


FIGURA 6

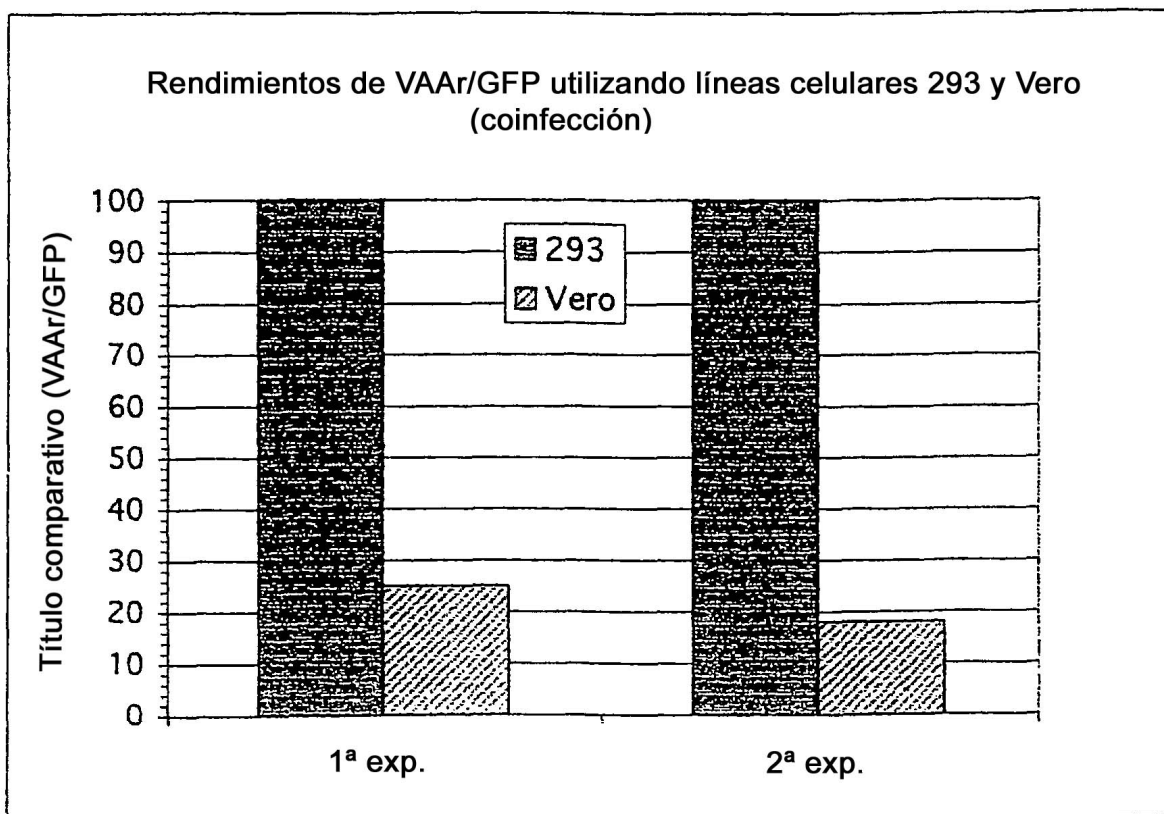


FIGURA 7