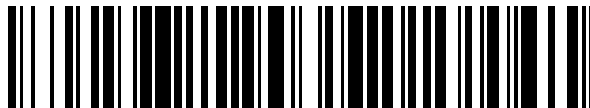


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 679**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07814439 .1**
96 Fecha de presentación: **24.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2061891**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54 Título: **Expresión de células de insecto de genes con marcos de lectura abiertos superpuestos, métodos y composiciones de éstos**

30 Prioridad:
24.08.2006 US 839761 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.07.2012

73 Titular/es:
VIROVEK, INC.
26291 PRODUCTION AVENUE, SUITE 10
HAYWARD, CA 94545, US

72 Inventor/es:
CHEN, Haifeng

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 385 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Expresión en células de insecto de genes con marcos de lectura abiertos superpuestos, métodos y composiciones de éstos.

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional US 60/839.761 presentada el 24 de agosto, 2006.

INTRODUCCIÓN

10 Se sabe que los genes que comprenden marcos de lectura superpuestos (ORF) existen en los genomas de los mamíferos. En algunos casos, dichos genes comprenden un intrón que tiene un promotor que soporta la transcripción de un ORF (Véanse, por ejemplo, Reisman, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5146-5150, 1998; Bennett, V.D., et al., J. Biol. Chem. 265: 2223-2230, 1990). Sin embargo, no se ha indicado que ningún gen de insecto, bien natural o artificial, codifique múltiples ORF y comprenda un promotor en un intrón.

15 Los Parvoviridae comprenden una familia de virus animales con ADN monocatenario. La familia Parvoviridae está dividida en dos subfamilias: la Parvovirinae, que infectan vertebrados y la Densovirinae, que infecta insectos. La subfamilia Parvovirinae (cuyos miembros se refieren en la presente memoria como parvovirus) incluye el género Dependovirus, cuyos miembros son únicos en que, bajo la mayoría de las condiciones, estos virus requieren la coinfección con un virus auxiliar tal como adenovirus o virus del herpes para la infección productiva en cultivo celular. El género Dependovirus incluye virus adeno-asociados (AAV), que normalmente infectan seres humanos y primates (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3, 3A, 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11) y virus relacionados que infectan otros animales de sangre caliente (por ejemplo, virus adeno-asociados de bovino, canino, equino y ovino). Los parvovirus y otros miembros de la familia Parvoviridae se describen en general en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The viruses and Their Replication," Capítulo 69 en *FIELDS VIROLOGY* (3a Ed. 1996) y el artículo de revisión reciente por Choi et al., Curr Gene Ther., Jun; 5(3):299-310 (2005).

25 El genoma de AAV es una molécula de ADN lineal, monocatenaria que tiene una longitud menor de aproximadamente 5.000 nucleótidos (nt). Repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las únicas secuencias de nucleótidos codificadoras para las proteínas de replicación no estructurales (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las ITR son auto-complementarias y están organizadas de manera que puede formarse una horquilla con forma de T de dúplex intramolecular energéticamente estable. Estas estructuras en horquilla funcionan como un origen para la replicación del ADN viral. Los genes Rep codifican las proteínas Rep, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Rep78 y su variante de corte y empalme Rep68 se traducen a partir de ARNm que se transcriben a partir del promotor p5. Rep52 y su variante de corte y empalme Rep40 se traducen a partir de ARNm que se transcriben a partir del promotor p19. Los genes Cap codifican las proteínas VP, VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas forman la cápside y se sintetizan a partir de dos ARNm sometidos a corte y empalme que surgen de la transcripción del gen Cap a partir del promotor p40. Un mensaje se traduce en VP1, mientras que otro transcrito codifica VP2 y VP3. El codón de inicio natural para VP2 es un ACG, que se utiliza poco, que resulta en el escaneo del ribosoma a través del codón de inicio de VP3 (AUG). Se cree que el uso alternativo de dos sitios aceptores de corte y empalme para el transcrito de VP1 y la utilización pobre del codón de inicio ACG para VP2 son responsables de las estequiometría de VP1, VP2 y VP3 en las células de mamífero infectadas con AAV y refleja la relación de proteínas en las cápsides, 1:1:10. Urabe, M. et al., Hum. Gene Ther. 13: 1935-1943, 2002.

40 Se sabe que una ITR de un AAV funciona como un origen de replicación, es decir, un sitio que tiene un papel "cis" en la replicación y sirve como un sitio de reconocimiento para las proteínas de replicación que actúan en trans (por ejemplo, Rep78 o Rep68) que reconocen las secuencias palindrómicas y específicas internas al palíndromo. Una excepción a la simetría de la secuencia de ITR es la región "D" de la ITR. Es única (no tiene un complemento en una ITR). El mellado del ADN monocatenario ocurre en la unión entre las regiones A y D. Es la región en la que se inicia la síntesis de nuevo ADN. La región D normalmente está localizada en un extremo del palíndromo y proporciona direccionalidad a la etapa de replicación del ácido nucleico. Un AAV que se replica en una célula de mamífero tiene típicamente dos secuencias ITR.

45 En las células de mamífero, las cuatro proteínas Rep de AAV están codificadas por múltiples transcritos a partir de un único marco de lectura. Los promotores en las posiciones map 5 y 19 regulan la transcripción del ORF de Rep. Rep78 y 68 se expresan a partir del promotor p5 y se diferencian entre sí por un corte y empalme 3'. Rep68 es una versión truncada en carboxi de Rep78, aunque Rep68 contiene 7 residuos únicos como resultado de un desplazamiento de marco que ocurre en el sitio aceptor de corte y empalme. Los transcritos de Rep52 y Rep40 se expresan por el promotor p19 y están en marco con los polipéptidos Rep mayores. Los polipéptidos Rep menores se diferencian entre sí de la misma manera que Rep78 y Rep68, es decir, por un evento de corte y empalme. Los dominios funcionales de Rep son: extremo amino-unión de ADN-mellado de ADN-ATPasa-Helicasa-señal de localización nuclear-dedo de cinc modificado-COOH. Las funciones de la unión a ADN y mellado de ADN están presentes sólo en las proteínas Rep transcritas a partir de p5.

- El AAV se replica a través de un intermedio dúplex de ADN que es una molécula continua: ambas cadenas están unidas covalentemente a través de la ITR. Las proteínas Rep p5 son capaces de reconocer un resto en la ITR, mellar una cadena del dúplex y unirse covalentemente a través de la unión fosfodiéster tirosinil-timidina en el extremo 5' de la mella. Se cree que la actividad helicasa de Rep es responsable del desenrollamiento del extremo 5' recién creado y un complejo de polimerasa celular extiende el extremo 3' en hueco para generar un intermedio de replicación en dúplex, con extremos romos. Las proteínas Rep menores retienen la actividad helicasa de ADN dependiente de ATP y están implicadas en la encapsidación de los genomas del virión monocatenarios. Rep52 y Rep40 se asocian con las cápsides preformadas y, presumiblemente, desenrollan los intermedios de replicación en dúplex.
- En los últimos años, AAV ha surgido como un vector viral preferido para la terapia génica debido a su capacidad para infectar eficazmente tanto células que no se dividen como en división, integrarse en un único sitio cromosómico en el genoma humano y presentar un riesgo patogénico relativamente bajo para los seres humanos. A la vista de estas ventajas, el virus adeno-asociado recombinante (rAAV) se está usando actualmente en los ensayos clínicos de terapia génica para la hemofilia B, melanoma maligno, fibrosis quística y otras enfermedades.
- Las secuencias de AAV empleadas para la producción de AAV en células de insecto pueden obtenerse del genoma de cualquier serotipo de AAV. Generalmente, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas con identidad de secuencia significativa a los niveles de aminoácidos y ácido nucleico, proporcionan un conjunto virtualmente idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente físicamente y funcionalmente equivalentes y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los serotipos de AAV y una discusión de las similitudes genómicas, véanse, por ejemplo, número de Registro de GenBank U89790; número de Registro de GenBank J01901; número de Registro de GenBank AF043303; número de Registro de GenBank AF085716; Chiorini et al., *J. Vir.* 71: 6823-33 (1997); Srivastava et al., *J. Vir.* 45: 555-64 (1983); Chiorini et al., *J. Vir.* 73: 1309-1319 (1999); Rutledge et al., *J. Vir.* 72: 309-319 (1998); y Wu et al., *J. Vir.* 74: 8635-47 (2000).
- Las dificultades implicadas en el aumento de escala de la producción de rAAV usando los sistemas actuales de producción de células de mamífero pueden ser significativos, si no completamente prohibitivos. Por ejemplo, para determinados estudios clínicos pueden requerirse más de 10^{15} partículas de rAAV. Para producir este número de partículas de rAAV en una línea celular de mamífero tal como células 293 humanas, se requeriría la transfección y cultivo de aproximadamente 10^{11} células, el equivalente a 5.000 matraces de células de 175 cm^2 . También existe la posibilidad de que un vector destinado para uso clínico producido en un cultivo de células de mamífero estará contaminado con material no deseable, quizá patogénico, presente en una célula de mamífero.
- Urabe et al., *Hum. Gene Ther* 13: 1935-1943, 2002, describe el uso de tres baculovirus recombinantes para producir rAAV en células de insecto. La Pat. U.S. No. 6.723.551 B2 de Kotin et al., Pat. U.S. No. 7.271.002 de Kotin et al., y Urabe et al., *J. Virol.* 80: 1874-1885, 2006, también describen métodos para producir vectores rAAV en células de insecto. En estas descripciones, se construyeron vectores de baculovirus que incluyen ácidos nucleicos que codifican Rep78/68 y Rep52/40 en una disposición cabeza a cola palindrómica, cada uno de los genes Rep78/68 y Rep52/40 bajo el control de un promotor independiente (FIG. 4 en la presente memoria). Estos vectores incluyen repeticiones terminales invertidas (ITR), secuencias que codifican transgenes y genes de la cápside de AAV. Aunque inicialmente se produjo una alta titulación de rAAV, no hubo evidencia de que el método sería adaptable a la producción a gran escala de rAAV. Además, varios grupos de investigación han indicado que el uso del diseño específico de la expresión de VP1 como se describe en la Pat. U.S. No. 6.723.551 B2 produce vectores AAV menos infecciosos comparado con sus equivalentes producidos en células 293. Merten et al., *Gene Ther.*, 12: S51-S61, 2005; Kohlbrenner et al., *Mol. Ther.*, 12: 1217-1225, 2005.
- La patente 6.723.551 B2 también afirma que el corte y empalme del ARNm de Rep en células de insecto no mimetiza el proceso en las células de mamífero. En particular, esta referencia enseña la modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica Rep68 o Rep40 de manera que carecen de un intrón. Una secuencia de ácido nucleico que se va a traducir en una célula de insecto por estos métodos incluye sólo la secuencia codificadora. Por lo tanto, la secuencia codificadora de cualquier ARNm viral transcrito en esta patente evita la eliminación por corte y empalme (eliminación) de un intrón antes de la traducción. Sin embargo, con el fin de expresar tanto Rep78 como Rep52 en células de insecto, los métodos mostrados en la patente 6.723.551 B2 usan dos secuencias Rep separadas y dos casetes de expresión, uno para Rep78 y el otro para Rep52.
- En AAV producidos en células de mamífero, el mejor rendimiento de viriones "completos" (es decir, partículas virales que incorporan un genoma de AAV), que son totalmente funcionales y pueden, por ejemplo, estar dirigidos al núcleo, se obtiene cuando las tres proteínas VP se expresan y están en una estequiometría cercana a 1:1:10 (VP1:VP2:VP3). Los mecanismos reguladores que permiten este nivel controlado de expresión incluyen la producción de dos ARNm, uno para VP1, el otro para VP2 y VP3, producidos por corte y empalme diferencial.
- El evento de corte y empalme requerido para producir una estequiometría 1:1:10 de VP1:VP2:VP3 no se reproduce apropiadamente en las células de insecto cuando se usa la secuencia codificadora original de Cap de AAV. La mayoría de las proteínas expresadas a partir de la secuencia codificadora de Cap es VP1, que se inicia a partir del primer codón

AUG de la secuencia codificadora de Cap. Con el fin de mimetizar la estequiometría 1:1:10 de VP1:VP2:VP3, los métodos mostrados en la patente U.S. 6.723.551 B2 mutan el codón AUG de VP1 en un ACG para disminuir el nivel de expresión de VP1.

5 Aunque el intrón de AAV no funciona apropiadamente en células de insecto, se ha indicado que el gen inmediato-temprano IE1 del virus de la polihedrosis nuclear *Autograph californica* comprende un intrón funcional que puede cortarse y empalmarse en células de insecto (Chisholm y Henner, J. Virol., 62: 3193-3200, 1988). Sin embargo, esta referencia no sugiere incorporar un promotor en el intrón para expresar un marco de lectura abierto unido de manera operativa.

10 Se han aplicado varios intentos para aumentar la expresión de VP1 de AAV, tales como usar la proteína quimérica VP1 o mecanismos de "riboswitch". Véanse, por ejemplo, Urabe et al., J Virol., 80: 1874-1885, 2006 y Kohlbrenner et al., Mol. Ther., 12: 1217-1225, 2005 y la solicitud de patente U.S. 2006/0166363. Además, se ha indicado que el baculovirus recombinante como se describe en la Pat. U.S. No. 6.723.551 B2 que alberga repeticiones homólogas grandes de Rep78 y Rep52 es inestable. Kohlbrenner et al., Mol. Ther., 12: 1217-1225, 2005. Aunque Kohlbrenner et al. indicaron baculovirus que son más estables y vectores AAV más infecciosos comparado con aquellos de la patente 6.723.551 B2, sus técnicas requieren la separación de las secuencias codificadoras para Rep78 y Rep52 en dos baculovirus y un baculovirus adicional para suministrar la proteína VP1.

15 Cao, L et al., (J. Virology 74: 11456-11463, 2000) describieron un método para producir un vector de virus adeno-asociado recombinante de tipo salvaje libre con alta titulación usando plásmidos auxiliares que contienen intrón. Estos métodos implican la inserción de un intrón de beta-globina humana en el genoma de AAV. Sin embargo, estos métodos usan células humanas como huésped y, además, el intrón introducido no incluye un promotor que pueda dirigir la transcripción en células de insecto.

20 Por lo tanto, todavía existe una necesidad de métodos y ácidos nucleicos mejorados para expresar genes con marcos de lectura abiertos superpuestos en células de insecto, así como métodos, ácidos nucleicos y células para producir vectores parvovirales infecciosos.

25 RESUMEN

A la vista de la necesidad de métodos para expresar genes que comprenden marcos de lectura abiertos superpuestos (ORF) en células de insecto, el presente inventor ha desarrollado ácidos nucleicos, células, cultivos celulares y métodos para expresar genes que comprenden ORF. La presente invención es como se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

30 En algunos aspectos, las presentes enseñanzas describen casetes de ácido nucleico. Estos casetes pueden usarse para expresar, en una célula de insecto, una pluralidad de polipéptidos codificados por un gen que comprende marcos de lectura abiertos superpuestos (ORF). Un casete de estos aspectos comprende, en orden de 5' a 3': a) un primer promotor operativo en células de insecto; b) una parte 5' de un primer ORF del gen; c) un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto; y d) una parte 3' del primer ORF del gen, en el que la parte 3' del primer ORF se superpone al menos a un ORF adicional del gen, en el que el primer promotor operativo de células de insecto está unido de manera operativa al primer ORF, el primer ORF comprende un primer codón de inicio de la traducción; el segundo promotor operativo de células de insecto está unido de manera operativa al menos al un ORF adicional y el al menos un ORF adicional comprende al menos un codón de inicio de la traducción adicional y en el que al menos uno de a), b), c) y d) puede ser heterólogo a al menos un otro de a), b), c) y d). En varias configuraciones, un casete puede comprender además e) una señal de poliadenilación situada 3' de d). En aspectos relacionados, al menos uno de a), b), c), d) y e) puede ser heterólogo a al menos un otro de a), b), c), d) y e). En varias configuraciones, las presentes enseñanzas incluyen vectores que comprenden un casete de ácido nucleico. Un vector puede ser cualquier tipo de vector conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo, un plásmido, un virus, un ácido nucleico viral o una combinación de éstos. Además, en varias configuraciones, un vector o un casete de ácido nucleico puede ser un ADN monocatenario o bicatenario y un virus puede ser un bacteriófago o un baculovirus.

45 En varias configuraciones, un casete de ácido nucleico de estos aspectos puede incluir promotores operativos en células de insecto (es decir, promotores que soportan la transcripción en una célula de insecto). Un casete puede comprender cualquier promotor operativo en células de insecto conocido para los expertos en la técnica. En algunos aspectos, un primer promotor operativo en células de insecto de un casete puede ser un promotor p10 o un promotor polh e, independientemente, un segundo promotor operativo en células de insecto puede ser un promotor p10 o un promotor polh.

50 En varios aspectos de las presentes enseñanzas, un gen que comprende ORF superpuestos puede ser un gen de un virus, tal como un virus que infecta células de mamífero. En algunos aspectos, el virus puede ser un virus adeno-asociado (AAV). En algunas configuraciones, un casete de ácido nucleico puede comprender un primer promotor operativo en células de insecto, una parte 5' de un gen Rep de un AAV o una parte 5' de un gen Cap de un AAV, y un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto. En algunas disposiciones, un ácido nucleico

5 que comprende un gen Rep puede incluir un ORF Rep 78/68 como un primer ORF Rep y un ORF Rep 52/40 como un segundo ORF u ORF adicional, como se describe más adelante. Además, en algunas configuraciones, el primer promotor puede ser un promotor p10 y un segundo promotor puede ser un promotor polh. En otras configuraciones, un casete de ácido nucleico puede incluir un gen Cap en el que un primer ORF puede ser un ORF VP1 y un segundo ORF u ORF adicional puede ser un ORF VP2/VP3, como se describe más adelante. En algunas configuraciones, tanto el primer como el segundo promotor de un casete de ácido nucleico puede ser un promotor polh.

10 En otras configuraciones más, un único ácido nucleico puede comprender dos o más casetes, comprendiendo cada casete un gen diferente que comprende múltiples ORF. Un ácido nucleico puede comprender casetes dispuestos en un tándem, es decir, con la misma polaridad, o en una orientación antisentido. Por lo tanto, un único ácido nucleico en algunas configuraciones puede comprender un primer promotor operativo en células de insecto, una parte 5' de un gen Rep de un AAV, un primer intrón que comprende un segundo promotor, una parte 3' del gen Rep, un tercer promotor operativo en células de insecto, una parte 5' de un gen Cap, un segundo intrón que comprende un cuarto promotor operativo en células de insecto y una parte 3' de un gen Cap. Además, en algunos aspectos, puede situarse una señal de poliadenilación 3' respecto a cada parte 3'.

15 Las presentes enseñanzas también incluyen una célula de insecto que comprende uno o más casetes de ácido nucleico que pueden usarse para expresar en una célula de insecto una pluralidad de polipéptidos codificados por un gen que comprende múltiples ORF. Una célula de insecto de estas enseñanzas puede ser una célula de insecto in vitro, tal como una célula de insecto de una línea celular cultivada tal como BTI-Tn-5B1-4 de *Trichoplusia ni* (High-five™, Invitrogen, Carlsbad CA), Sf9 o Sf21, ambas derivadas de *Spodoptera frugiperda*. En varios aspectos, una célula de insecto in vitro puede comprender un gen Rep de un AAV y/o un gen Cap de un AAV. Por lo tanto, en algunas configuraciones, una célula de insecto puede comprender un primer casete de ácido nucleico y un segundo casete de ácido nucleico, en el que el primer casete de ácido nucleico comprende un ORF Rep 78/68 y un ORF Rep 52/40 y el segundo casete de ácido nucleico comprende un ORF VP1 y un ORF VP2/VP3. Estos casetes pueden comprender cada uno un primer promotor operativo en células de insecto y un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto como se describe en la presente memoria. Los casetes en algunos aspectos pueden estar comprendidos en una célula por ácidos nucleicos diferentes. En otros aspectos, los casetes pueden estar comprendidos por el mismo ácido nucleico, en configuraciones en tándem o antisentido.

20 En algunas configuraciones, una célula de insecto puede incluir además un ácido nucleico adicional que comprende un transgén de interés para ser expresado por la célula de insecto huésped. Dicho ácido nucleico puede comprender, en algunos aspectos, un casete adicional que comprende, en orden 5' a 3', una primera repetición terminal invertida (ITR) de un AAV, un promotor operativo en células de mamífero; un transgén, una señal de poliadenilación y una segunda ITR de un AAV. Un transgén de estas configuraciones puede comprender un ORF que codifica cualquier polipéptido de interés. En algunas configuraciones, un transgén puede ser un gen informador, tal como una cloranfenicol acetil transferasa, una β-galactosidasa, una β-glucuronidasa, una luciferasa de renilla, una luciferasa de luciérnaga, una proteína verde fluorescente (GFP), una proteína roja fluorescente (RFP) o una fosfatasa alcalina tal como una fosfatasa alcalina secretada. En otras configuraciones, un transgén puede comprender un ORF que codifica un polipéptido de interés terapéutico, tal como, sin limitación, una hormona polipeptídica, citoquina o factor de crecimiento (por ejemplo, insulina o eritropoyetina), un interferón, un factor de coagulación de la sangre o una vacuna.

25 En algunas configuraciones, un ácido nucleico que comprende un transgén de interés o un casete que comprende un gen que tiene múltiples ORF tal como un gen Rep y/o un gen Cap de un AAV puede integrarse en el genoma de una célula de insecto huésped. En algunas configuraciones, la integración puede ser una integración estable. Los ácidos nucleicos de las presentes enseñanzas también pueden albergarse temporalmente en una célula huésped.

30 Algunos aspectos de las presentes enseñanzas incluyen cultivos celulares. Un cultivo celular de estos aspectos comprende una pluralidad de células de insecto que comprenden un casete de ácido nucleico que comprende un primer promotor operativo en células de insecto, un gen que tiene marcos de lectura abiertos superpuestos y codifica una pluralidad de polipéptidos, y un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto, como se ha descrito anteriormente; y un medio de cultivo. En algunas configuraciones, un cultivo celular puede comprender casetes de ácido nucleico que comprenden genes Rep y Cap de un AAV. En algunas disposiciones, dichos cultivos pueden producir AAV y un medio de cultivo de estos cultivos puede tener una titulación de al menos aproximadamente 10^{13} genomas de AAV/litro, al menos aproximadamente 10^{14} genomas de AAV/litro o más. Las células de insecto de estas configuraciones pueden ser cualquier célula de insecto conocida para los expertos en la técnica, tales como células de las líneas celulares BTI-Tn-5B1-4, Sf9 o Sf21. Las células de dicho cultivo pueden comprender además un ácido nucleico que comprende ITR y un transgén, como se ha descrito anteriormente.

35 Las presentes enseñanzas también incluyen métodos para expresar una pluralidad de polipéptidos codificados por un gen que comprende ORF superpuestos. Estos métodos pueden comprender, en varias configuraciones, infectar, transformar o transfectar al menos una célula de insecto con un casete de ácido nucleico que comprende un gen que comprende ORF superpuestos como se describe en la presente memoria, y cultivar la al menos una célula de insecto.

Las células de insecto de estas configuraciones pueden ser cualquier célula de insecto conocida para los expertos en la técnica, tales como células de las líneas celulares BTI-Tn-5B1-4, Sf9 o Sf21.

5 Las presentes enseñanzas también incluyen métodos para expresar múltiples genes en una célula de insecto, en los que cada gen comprende ORF superpuestos. Estos métodos comprenden proporcionar una o más células de insecto que portan un primer casete de ácido nucleico que comprende un primer gen, un primer promotor operativo en células de insecto y un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto, como se describe en la presente memoria y un segundo casete de ácido nucleico que comprende un segundo gen, un tercer promotor operativo en células de insecto y un segundo intrón que comprende un cuarto promotor operativo en células de insecto. En varios aspectos, los casetes de estos métodos pueden estar comprendidos por los mismos ácidos nucleicos o diferentes y las células de insecto huésped pueden transformarse temporalmente o de manera estable con uno o los dos casetes.

10 De manera similar, las presentes enseñanzas también incluyen métodos para producir un virus adeno-asociado (AAV) en una célula de insecto. Estos métodos pueden comprender proporcionar una o más células de insecto que portan un primer casete de ácido nucleico que comprende un gen Rep, un primer promotor operativo en células de insecto y un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto como se describe en la presente memoria, y un segundo casete de ácido nucleico que comprende un gen Cap, que tiene un tercer promotor operativo en células de insecto y un intrón que comprende un cuarto promotor operativo en células de insecto como se describe en la presente memoria. Estos métodos comprenden además cultivar las células de insecto en un medio de cultivo. En algunas configuraciones, las células de insecto de estos métodos pueden comprender además un ácido nucleico adicional, en el que el ácido nucleico adicional comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) de un AAV; un promotor operativo en células de mamífero; un transgén y una segunda ITR de un AAV. En varias configuraciones, uno o más de los casetes y el ácido nucleico adicional pueden estar comprendidos por uno o más vectores.

15 En algunos aspectos, las presentes enseñanzas también incluyen métodos para producir cápsides de AAV en células de insecto in vitro. Estos métodos comprenden: proporcionar una o más células de insecto que comprenden un casete de ácido nucleico que comprende, en orden 5' a 3', un primer promotor, una parte 5' de un gen Cap de un AAV, un intrón que comprende un segundo promotor y una parte 3' del gen Cap; y cultivar la una o más células de insecto en un medio de cultivo. En varias configuraciones, el ácido nucleico puede estar comprendido por un vector. En algunas configuraciones, el proporcionar células de insecto puede comprender transformar, transfectar o infectar una o más células de insecto con un ácido nucleico o vector que comprende el casete. Además, en algunos aspectos, estos métodos pueden comprender además transformar, transfectar o infectar las células con un ácido nucleico adicional que comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) de un AAV; un promotor operativo en células de mamífero; un transgén y una segunda ITR de un AAV.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

25 La FIG.1 ilustra un mapa genético y transcripcional de baculovirus recombinantes representativos que expresan tanto Rep 78 ó 68 como Rep 52 ó 40 en un único casete de expresión. El ARNm maduro de Rep 78 ó 68 se forma cuando se elimina el intrón artificial mediante corte y empalme. El ARNm de Rep 52 ó 40 se transcribe a partir del promotor localizado dentro del intrón artificial.

30 La FIG. 2 ilustra un mapa genético y transcripcional de baculovirus recombinantes representativos que expresan VP1, VP2 y VP3 en un único casete de expresión. El ARNm maduro de VP1 se forma cuando se elimina el intrón artificial mediante corte y empalme. El ARN que codifica VP2 y VP3 se transcribe a partir del promotor localizado dentro del intrón artificial.

La FIG. 3 ilustra un mapa genético de un sistema de tres vectores para la producción de vectores parvovirales en células de insecto.

La FIG. 4 ilustra un mapa genético de un sistema de dos vectores para la producción de vectores parvovirales en células de insecto.

45 La FIG. 5 ilustra dos ejemplos de un sistema de un único vector junto con una línea celular de insecto estable para producir vectores AAV en células de insecto.

La FIG. 6 ilustra un ejemplo de un método para la producción de genoma parvoviral.

la FIG. 7 ilustra un ejemplo de un método para la producción de partículas parvovirales vacías.

50 La FIG. 8 ilustra un mapa genético de un vector recombinante que comprende la secuencia codificadora de Rep de AAV2 que comprende un intrón artificial que comprende un promotor de polihedrina (polh). Este vector puede usarse para la producción de vectores AAV en células de insecto.

La FIG. 9 ilustra resultados representativos de transferencias Western de proteínas Rep y Cap. (A) Rep78 y Rep52 de AAV2 expresadas en células Sf9 infectadas con Bac-inRep; (B) Proteínas Cap de AAV2 expresadas en células Sf9

infectadas con Bac-inCap; (C) Proteínas Cap de AAV8 expresadas en células Sf9 infectadas con Bac-inCap8; (D) Proteínas Cap de AAV6 expresadas en células Sf9 infectadas con Bac-inCap6; y (E) Proteínas Cap de AAV1 expresadas en células Sf9 infectadas con Bac-inCap1.

5 La FIG.10 ilustra un mapa genético de un vector recombinante que comprende la secuencia codificadora de Cap de AAV2 y un intrón artificial que comprende un promotor de polihedrina (polh). Este vector puede usarse para la producción de vectores AAV2 en células de insecto.

La FIG.11 ilustra un mapa genético de un vector recombinante que comprende la secuencia codificadora de Cap de AAV8 y un intrón artificial que comprende un promotor de polihedrina (polh). Este vector puede usarse para la producción de vectores pseudotipados AAV8 en células de insecto.

10 La FIG.12 ilustra un mapa genético de un vector recombinante que comprende la secuencia codificadora de Cap de AAV6 que comprende un intrón artificial que comprende un promotor de polihedrina (polh). Este vector puede usarse para la producción de vectores pseudotipados AAV6 en células de insecto.

15 La FIG.13 ilustra un mapa genético de un vector recombinante que comprende la secuencia codificadora de Cap de AAV1 y un intrón artificial que comprende un promotor de polihedrina (polh). Este vector puede usarse para la producción de vectores pseudotipados AAV1 en células de insecto.

La FIG. 14 ilustra un mapa genético y transcripcional de baculovirus recombinantes que expresan las tres proteínas VP de SV40 en un único casete de expresión. El ARNm maduro de VP2 se forma cuando tanto el primer como el segundo intrón se eliminan mediante corte y empalme y el ARNm maduro de VP3 se forma cuando el segundo intrón se elimina mediante corte y empalme. El ARNm de VP1 se transcribe a partir del promotor localizado dentro del segundo intrón.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria utilizan técnicas de laboratorio muy conocidas para los expertos en la técnica y pueden encontrarse en manuales de laboratorio tales como Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; *Methods in Molecular Biology*, ed. Richard, Humana Press, NJ, 1995; Spector, D.L. et al., *Cells: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998; y Harlow, E., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999. Las referencias adicionales que describen métodos de expresión de polipéptidos heterólogos en células de insecto, así como métodos para introducir vectores y ácidos nucleicos en células de insecto y métodos para mantener cultivos de células de insecto incluyen, por ejemplo, O'Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, Oxford Univ. Press, 1994; Samulski et al., *J. Vir.* 3: 3822-3288, 1989; Kajigaya et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4646-4650, 1991; Ruffing et al., *J. Vir.* 66: 6922-6930, 1992; Kimbauer et al., *Vir.* 219: 37-44, 1996; Zhao et al., *Vir.* 272: 382-393, 2000; y Samulski et al., *Pat. U.S. No.* 6.204.059.

Tal y como se usan en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" se pretende que también incluyan las formas plurales, a no ser que el contexto indique otra cosa.

35 El presente inventor ha desarrollado un método para expresar un gen con marcos de lectura superpuestos en células de insecto. El inventor ha descubierto que la incorporación en único gen de un intrón artificial que comprende un promotor operativo en células de insecto puede proporcionar la expresión de marcos de lectura abiertos superpuestos en una célula de insecto. "Marcos de lectura superpuestos" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una secuencia codificadora de un gen que puede transcribirse en múltiples moléculas de ARNm a partir de múltiples sitios de inicio de la transcripción; en varios aspectos, estas moléculas de ARNm pueden traducirse en múltiples polipéptidos. Los marcos de lectura superpuestos incluyen secuencias codificadoras que pueden transcribirse en moléculas de ARNm que tienen diferentes sitios de inicio de la traducción (codones de inicio) a partir de un gen, con marcos de lectura con marco desplazado o marcos de lectura sin marco desplazado.

45 En algunos aspectos, un casete de las presentes enseñanzas puede comprender un gen Rep, un promotor p10 y un intrón que comprende un promotor polh. En varios aspectos, después de la infección de una célula de insecto con un baculovirus que incluye dicho casete, el pre-ARNm de Rep78 o Rep68 puede transcribirse a partir del promotor p10 y el ARNm maduro puede formarse por eliminación por corte y empalme del intrón artificial. Además, el ARNm de Rep52 o Rep40 puede transcribirse a partir de un promotor polh localizado dentro del intrón artificial. Como resultado, una célula de insecto puede expresar tanto Rep78 (o Rep68) como Rep52 (o Rep40) a partir del misma secuencia codificadora de Rep, a la vez que se evita el uso de secuencias separadas de Rep 78 y Rep52. En otros aspectos, puede usarse cualquier promotor operativo en células de insecto en lugar de un promotor p10 o polh.

55 En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas se refieren a la expresión de genes de Rep y Cap superpuestos de virus adeno-asociados en células de insecto mediante la incorporación en los genes Rep y Cap respectivamente de un intrón artificial que comprende un promotor operativo en células de insecto. En algunos aspectos, rAAV puede producirse en las células de insecto empleando las secuencias codificadoras de Rep y Cap. Mediante la inserción del intrón artificial en la secuencia codificadora de Rep, tanto Rep78 (o Rep68) como Rep52 (o Rep40) pueden expresarse a partir de la

única secuencia codificadora de Rep sin la necesidad de usar dos secuencias codificadoras separadas de Rep (FIG. 1). Asimismo, mediante la incorporación de la secuencia del intrón artificial en la secuencia codificadora de Cap, las tres proteínas Cap, VP1, VP2 y VP3, pueden expresarse a partir de una única secuencia codificadora de Cap (FIG. 2). En algunas configuraciones, un gen Cap que comprende un intrón artificial obvia la necesidad de mutar el codón de inicio de VP1 AUG en ACG como se describe en la patente US 6.723.551 B2.

En algunos aspectos, las presentes enseñanzas proporcionan un método para producir un AAV en una célula de insecto. Estos métodos comprenden expresar proteínas Rep y proteínas Cap mediante la transcripción de los ARNm que codifican las proteínas Rep y las proteínas Cap. En estos métodos, al menos un vector se introduce en una célula de insecto. Un vector de estos aspectos comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden un casete, comprendiendo cada casete, en orden 5' a 3', un primer promotor operativo en células de insecto, una parte 5' de un gen que comprende un primer ORF del gen que comprende múltiples ORF, un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto y una parte 3' del gen que comprende al menos un ORF adicional. En varias configuraciones, un vector compatible con células de insecto puede comprender una primera secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia codificadora de Rep y al menos un intrón artificial que comprende un promotor operativo en células de insecto, y una segunda secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia codificadora de Cap y al menos un intrón artificial. Una célula de insecto en la que se introducen dichos vectores puede mantenerse en condiciones tales que el AAV se produce. En algunas configuraciones, la célula de insecto puede comprender además un ácido nucleico que comprende al menos una ITR de AAV. Este ácido nucleico también puede incluir un transgén, tal como un gen que codifica un polipéptido informador o un polipéptido de interés terapéutico. En varias configuraciones, este ácido nucleico puede introducirse en la célula con un vector. Este vector puede ser distinto del vector o vectores que comprende los genes Rep y/o Cap o, en algunas configuraciones, un único vector puede comprender el ácido nucleico que comprende al menos una ITR de AAV, el gen Rep y el gen Cap.

El inventor ha determinado que las secuencias de Rep e ITR de AAV también complementan de manera cruzada eficazmente otras secuencias Rep e ITR de AAV en células de insecto. Generalmente, las proteínas Cap, que determinar la tropicidad celular de la partícula de AAV y las secuencias codificadoras de Cap relacionadas están significativamente menos conservadas que las proteínas y los genes Rep entre los diferentes serotipos de AAV. A la vista de la capacidad de las secuencias Rep e ITR de complementar de manera cruzada las secuencias correspondientes de otros serotipos, pueden generarse fácilmente partículas de AAV pseudotipadas que comprenden las proteínas de la cápside de un serotipo (por ejemplo, AAV6) y las secuencias Rep y/o ITR de otro serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2). Tal y como se usa en la presente memoria, "pseudotipo" se refiere a la fuente de la proteína Cap en un virus adeno-asociado. Véanse, por ejemplo, Halbert, C.L., et al., J. Virol. 74: 1524-1532, 2000; Halbert, C.L., et al., J. Virol. 75: 6615-6624, 2001. Por ejemplo, el inventor ha producido altas titulaciones de rAAV2/6 y rAAV2/8 (es decir, AAV pseudotipado que comprende las secuencias de ITR y Rep de AAV2 y las secuencias de VP derivadas de AAV6 y AAV8, respectivamente) en células Sf9 (véase el Ejemplo 4). A la vista de la naturaleza conservada de las secuencias Rep e ITR entre los serotipos de AAV, la producción de un vector pseudotipado que comprende los genes Cap de un serotipo particular de AAV en un sistema de empaquetamiento celular indica que los vectores no pseudotipados de ese serotipo también pueden producirse con éxito en ese sistema. Por ejemplo, la producción eficaz de rAAV2/6 y rAAV2/8 en células Sf9 indica que rAAV6 y rAAV8 también pueden producirse eficazmente en estas células.

A la vista de lo anterior, se entenderá que las secuencias de más de un serotipo de AAV pueden combinarse para la producción de AAV en células de insecto. Por ejemplo, un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de ITR de AAV puede obtenerse de un serotipo, tal como AAV2, mientras que otros ácidos nucleicos pueden comprender marcos de lectura abiertos o secuencias codificadoras obtenidas de uno o más serotipos diferentes, tales como, por ejemplo, serotipo 3. En varias configuraciones, los ácidos nucleicos de cualquiera de los serotipos de AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 pueden proporcionar un gen Rep, un gen Cap y/o una ITR de AAV en los presentes métodos.

En algunos aspectos de estos métodos, una ITR de AAV puede ser una ITR de AAV1, AAV2 o AAV6; un ácido nucleico que comprende los ORF de Rep puede comprender un gen Rep de AAV1, AAV2 o AAV6; y un ácido nucleico que comprende los ORF de Cap puede comprender un gen Cap de AAV1, AAV2 o AAV6.

En algunos aspectos, también pueden usarse secuencias de AAV modificadas para producir rAAV en células de insecto. Por ejemplo, pueden usarse secuencias de nucleótidos que tienen al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia respecto a una ITR, Rep o Cap de AAV1, AAV2, AAV3 y/o AAV4 en lugar de las secuencias de ITR, Rep o Cap de AAV de tipo salvaje, siempre que las partículas de rAAV se produzcan en las células infectadas. De manera similar, pueden usarse secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia respecto a una secuencia de polipéptido de AAV1, AAV2, AAV3 y/o AAV4 en lugar de las secuencias de ITR, Rep o Cap de AAV de tipo salvaje, siempre que las partículas de rAAV se produzcan en las células infectadas.

En varios aspectos, cualquier célula de insecto conocida para el experto en la técnica que pueda mantenerse en cultivo puede usarse con los presentes métodos. Los ejemplos no limitativos de líneas celulares incluyen células Sf9 de *Spodoptera frugiperda*, células Sf21 de *Spodoptera frugiperda*, líneas celulares de *Drosophila* o líneas celulares de mosquito, por ejemplo, líneas celulares derivadas de *Aedes albopictus*. En algunos aspectos, una línea celular puede ser una línea celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda*.

Cualquier vector conocido para el experto en la técnica puede emplearse con las presentes enseñanzas siempre que sea compatible con células de insecto. La presencia de un vector en la célula de insecto no necesita ser permanente. Los vectores pueden introducirse por cualquier método conocido, por ejemplo por tratamiento químico de las células, electroporación o infección. En algunos aspectos, un vector puede ser un baculovirus, un vector viral o un plásmido.

Si se usan tres vectores, un primer vector puede comprender una primera secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor operativo en células de insecto, una secuencia codificadora de Rep y un intrón artificial que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto; un segundo vector puede comprender una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un tercer promotor operativo en células de insecto. La secuencia codificadora de Cap y un intrón artificial que comprende un cuarto promotor operativo en células de insecto y una tercera secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de ITR de AAV. En la FIG. 3, pA es una señal de poliadenilación, polh y p10 son promotores transcripcionales para la expresión en células de insecto y CMV es un promotor transcripcional de mamíferos para la expresión de un gen en una célula de mamífero. ITR es una repetición terminal invertida de AAV.

En algunos aspectos, el AAV puede producirse usando dos vectores según los métodos descritos. En estos aspectos, un primer vector puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor operativo en células de insecto que está unido de manera operativa a una parte 5' de una secuencia codificadora de Rep, un intrón artificial que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto que está unido de manera operativa a una parte 3' de la secuencia codificadora de Rep; un tercer promotor operativo en células de insecto unido de manera operativa a una parte 5' de una secuencia codificadora de Cap y un intrón artificial que comprende un cuarto promotor operativo en células de insecto que está unido de manera operativa a una parte 3' de la secuencia codificadora de Cap. Un segundo vector de estos aspectos puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de ITR de AAV. La FIG. 4 es un mapa genético de un sistema de dos vectores ejemplar. En la FIG. 4, pA es una señal de poliadenilación, polh y p10 son promotores transcripcionales para expresión en células de insecto y CMV es un promotor transcripcional de mamíferos para la expresión de un gen en una célula de mamífero. ITR es la repetición terminal invertida de AAV.

En varias configuraciones, las secuencias comprendidas por cada vector pueden estar en cualquier orden entre sí. Por ejemplo, en algunas disposiciones, un vector puede comprender ITR y una secuencia codificadora de Cap y la secuencia codificadora de Cap puede estar localizada en el vector de manera que, después de la replicación del ADN entre las secuencias ITR, la secuencia codificadora de Cap puede replicarse, mientras que en otras disposiciones, las secuencias codificadoras de Cap no se replican. En otras configuraciones, la secuencia codificadora de Rep y la secuencia codificadora de Cap pueden estar en cualquier orden en un vector.

Los métodos para introducir secuencias de ácido nucleico en el genoma de un insecto son muy conocidos para los expertos en la técnica, como lo son los métodos para seleccionar e identificar células que portan ácidos nucleicos introducidos. La incorporación en el genoma puede ayudarse por ejemplo por el uso de un vector que comprende secuencias de nucleótidos con una gran similitud de secuencia con una o más regiones de un genoma de una célula de insecto huésped. El uso de elementos genéticos, tal como transposones, proporciona un método para introducir una secuencia de nucleótidos en un genoma. En algunos aspectos de los presentes métodos, puede seleccionarse o identificarse una célula transformada con la ayuda de un gen marcador que puede estar codificado por una secuencia de ácido nucleico añadida a la célula. Los algunos aspectos, incorporación de la secuencia de ácido nucleico en el genoma de una célula huésped puede determinarse por métodos estándar muy conocidos para los expertos en la técnica tales como transferencias Southern o ensayos con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En algunos aspectos, puede modificarse por ingeniería una ITR de manera que los sitios de unión para los polipéptidos de la replicación estén situados en ambas cadenas de las regiones A y las regiones D y estén localizados simétricamente uno a cada lado del palíndromo. En un molde de ADN circular bicatenario (por ejemplo, un plásmido), la replicación de los ácidos nucleicos ayudada por Rep78 o Rep68 puede producirse en ambas direcciones y una única ITR es suficiente para la replicación de AAV de un vector circular. Así, una secuencia de nucleótidos de ITR puede usarse en el contexto de las presentes enseñanzas. Sin embargo, pueden usarse dos u otro número par de ITR regulares. En algunos aspectos, se usan dos secuencias de ITR.

En varios aspectos, un ácido nucleico que comprende al menos una ITR de AAV puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un "producto génico de interés" o "transgén" para la expresión en una célula de mamífero, localizada de manera que se incorporará en un genoma de AAV replicado en la célula de insecto. Cualquier ácido nucleico puede incorporarse para la expresión posterior en una célula de mamífero transfectada con el

AAV producido según las presentes enseñanzas. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una proteína, expresar ARN antisentido o ARN pequeño de interferencia (SiARN). La proteína puede ser una proteína secretora, o una proteína que influirá principalmente en la célula que se infecta con el AAV producido por insecto. En algunos aspectos, un producto de interés puede ser Rep78 o Rep68. Según esto, en estos aspectos, una secuencia de nucleótidos puede comprender dos secuencias de ácido nucleico, codificando cada una un producto génico de interés para la expresión en una célula de mamífero. Cada una de las dos secuencias de ácido nucleico que codifica un producto de interés puede disponerse de manera que se incorporará en un genoma de rAAV replicado en una célula de insecto.

En varias configuraciones, un producto de interés puede ser un producto génico que puede ser un polipéptido o una molécula de ARN. Los ejemplos no limitativos de un polipéptido de interés incluyen proteínas tales como una enzima, un factor de coagulación, una hormona peptídica o una proteína de fusión. Otros ejemplos de productos de interés incluyen un producto génico que complementa un defecto genético, una molécula de ARN o un factor de transcripción. Por ejemplo, un producto génico de interés puede comprender una secuencia de nucleótidos que proporciona una función reguladora (por ejemplo, un transposón). Los ejemplos de productos génicos de interés incluyen, pero no están limitados a: receptores de hormonas (por ejemplo, receptores de hormonas mineralcorticosteroides, glucocorticoides y tiroidea); proteínas intramembrana (por ejemplo, TM-1 y TM-7); receptores intracelulares (por ejemplo, receptores huérfanos, de retinoides, vitamina D3 y vitamina A); moléculas de señalización (por ejemplo, quinasas, factores de transcripción y transductores de señales y activadores de receptores de transcripción de la superfamilia de las citoquinas (por ejemplo eritropoyetina, hormona del crecimiento, interferones e interleuquinas, y factores estimulantes de colonias; receptores acoplados a proteína G, por ejemplo, hormonas, calcitonina, epinefrina, gastrina y mediadores paracrinosa o autocrinos, tales como estomatostatina o prostaglandinas; receptores de neurotransmisores (norepinefrina, dopamina, serotonina o acetilcolina); antígenos patogénicos, que pueden ser de origen viral, bacteriano, alergénico o canceroso; y ligandos de receptores tirosina quinasa (tales como factor de crecimiento insulina y factor de crecimiento nervioso).

En varios aspectos, un producto génico de interés puede ser un producto génico terapéutico. Un producto génico terapéutico puede ser un polipéptido, molécula de ARN u otro producto génico que, cuando se expresa en una célula diana, proporciona un efecto terapéutico, tal como, por ejemplo, la ablación de una célula infectada (por ejemplo, como se describe en Goldsmith et al., WO 90/07936), la expresión de un polipéptido que tiene una actividad biológica terapéutica y/o la expresión de una molécula de ARN para terapia antisentido (por ejemplo, regulación de la expresión de un gen endógeno o heterólogo en el genoma de una célula diana). Por ejemplo, en un paciente que va a recibir un trasplante o injerto heterólogo, se puede administrar un polinucleótido que codifica una toxina a células T dirigidas al injerto.

Un proteína de AAV puede ser un producto génico de interés. Por ejemplo, la secuencia de una proteína Rep, tal como Rep78 o Rep68, o un fragmento funcional de ésta puede ser un producto génico de interés para la expresión en una célula de mamífero. Una secuencia de ácido nucleico que codifica Rep78 y/o Rep68, si está presente en un genoma de rAAV de las presentes enseñanzas y se expresa en una célula de mamífero transducida con el rAAV producido según las presentes enseñanzas, permite la integración del rAAV en el genoma de la célula de mamífero transducida. La expresión de Rep78 y/o Rep68 en una célula de mamífero transducida o infectada con rAAV puede conferir una ventaja para determinados usos del rAAV producido en una célula de insecto, tal como permitir la expresión a largo plazo o permanente de cualquier otro producto génico de interés introducido en la célula con el rAAV.

Un marcador seleccionable es un tipo de producto génico de interés. La expresión de una proteína codificada por el marcador seleccionable permite distinguir una célula huésped transfectada con un vector de expresión que incluye el marcador seleccionable de una célula huésped que no tiene el vector de expresión que codifica el marcador seleccionable. Un ejemplo es una célula huésped que puede usar el marcador seleccionable para sobrevivir a un proceso de selección que de otra manera mataría a la célula huésped, tal como tratamiento con un antibiótico. Dicho marcador seleccionable puede ser uno o más factores de resistencia a antibióticos, tal como resistencia a neomicina (por ejemplo, neo), resistencia a higromicina y resistencia a puromicina. Un marcador seleccionable también puede ser un marcador de la superficie celular, tal como el receptor del factor de crecimiento nervioso o versiones truncadas de éste. Las células que expresan el marcador de la superficie celular pueden seleccionarse usando un anticuerpo dirigido al marcador de la superficie celular. El anticuerpo dirigido al marcador de la superficie celular puede estar marcado directamente (por ejemplo, con un sustrato fluorescente) o puede detectarse usando un anticuerpo o sustrato secundario marcado que se une al anticuerpo dirigido al marcador de la superficie celular. Alternativamente, las células pueden seleccionarse negativamente usando una enzima, tal como la timidina quinasa del virus del Herpes simple (HSVTK) que convierte una pro-toxina (ganciclovir) en una toxina o la Citosina Desaminasa (CD) bacteriana que convierte la pro-toxina 5'-fluorocitosina (5'-FC) en la toxina 5'-fluorouracilo (5'-FU). Alternativamente, cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido puede usarse como un marcador seleccionable siempre que el polipéptido sea reconocido fácilmente por un anticuerpo.

Un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede codificar, por ejemplo, una beta-lactamasa, una luciferasa, una proteína verde fluorescente (GFP), una beta-galactosidasa, u otro gen informador como se entiende este término en la técnica, incluyendo marcadores de la superficie celular, tal como CD4 o el factor de crecimiento nervioso

truncado (NGFR) (para GFP, véanse WO 96/23810; Heim et al., *Current Biology* 2: 178-182 (1996); Heim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995); o Heim et al., *Science* 373: 663-664 (1995); para beta-lactamasa, véase WO 96/30540). En algunos aspectos, un marcador seleccionable puede ser una beta-lactamasa. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede codificar, por ejemplo, una proteína fluorescente. Una proteína fluorescente puede detectarse determinando la cantidad de cualquier propiedad fluorescente cuantitativa, por ejemplo, la cantidad de fluorescencia a una longitud de onda particular o la integral de la fluorescencia sobre un espectro de emisión. Las técnicas para medir la fluorescencia son muy conocidas para los expertos en la técnica.

En varios aspectos, un ácido nucleico para la expresión en la célula de mamífero puede incorporarse en el genoma de AAV producido en la célula de insecto si está localizado entre dos ITR regulares o está localizado en cualquiera de los extremos de una ITR modificada por ingeniería con dos regiones D.

En varios aspectos, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés para la expresión en una célula de mamífero puede estar unido de manera operativa al menos a una secuencia de control de la expresión compatible con la célula de mamífero, por ejemplo, un promotor. Muchos de dichos promotores son conocidos en la técnica. El experto en la técnica entenderá que los promotores de estos aspectos incluyen los que son inducibles, específicos de tejido y/o específicos de ciclo celular. Por ejemplo, un promotor E2F puede mediar la expresión selectiva de tumor y, en particular, selectiva de tumor de células neurológicas in vivo al desreprimirse en dichas células in vivo. Parr et al., *Nat. Med.* 3: 1145-1149 (1997). Además, en algunas configuraciones, más de una secuencia de control de la expresión puede unirse de manera operativa a una secuencia de nucleótidos dada. Por ejemplo, una secuencia promotora, una secuencia de inicio de la traducción y un codón de parada pueden unirse de manera operativa a una secuencia de nucleótidos.

Los sitios de corte y empalme son secuencias en un ARNm que facilitan la eliminación de partes de las secuencias de ARNm después de la transcripción (formación) del ARNm. Típicamente, el corte y empalme ocurre en el núcleo, antes del transporte del ARNm al citoplasma de una célula.

En algunos aspectos, una secuencia de control de la expresión puede compartir identidad de secuencia con secuencias de control de la expresión conocidas. Una determinación del grado de identidad de secuencia de dos secuencias de ácido nucleico es una determinación del porcentaje de veces que un nucleótido, de entre los cuatro nucleótidos naturales conocidos, iguala exactamente a un equivalente en una secuencia de nucleótidos, es decir, una T iguala a una T, una A iguala a una A, una G iguala a una G y una C iguala a una C. Puede considerarse que una identidad de secuencia de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, tiene una similitud de secuencia sustancial con una secuencia de control de la expresión. En algunos aspectos, la identidad de secuencia puede calcularse entre secuencias sin la introducción de huecos en una o las dos secuencias que se están comparando.

Un experto en la técnica entenderá que con el fin de optimizar la similitud de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos, pueden introducirse huecos en una o las dos secuencias. En algunos aspectos, si se introducen huecos, sólo los nucleótidos de una primera secuencia que se emparejen con un nucleótido en una segunda secuencia de nucleótidos (tanto si hay igualdad como si no) se usan para calcular el porcentaje de homología. Los algoritmos que han desarrollado las reglas de cálculo de porcentaje de homología son conocidos. Los ejemplos de dichos programas incluyen SIM, GAP, NAP, LAP2, GAP2, ALIGN, BLAST y PIPMAKER.

Por ejemplo, el programa ALIGN produce un alineamiento óptimo de dos secuencias elegidas de proteína o ácido nucleico usando una modificación del algoritmo de programación dinámico descrito por Myers y Miller, *CABIOS*, 4, 11-17 (1988). Preferiblemente, si está disponible, el programa ALIGN se usa con huecos terminales pesados. Si están disponibles las penalizaciones por cada hueco que se abre y por la longitud del hueco, se ajustan preferiblemente entre aproximadamente -5 a -15 y 0 a -3, respectivamente, más preferiblemente aproximadamente -12 y -0,5 a -2, respectivamente, para alineamientos de secuencias de aminoácidos y -10 a -20 y -3 a -5, respectivamente, más preferiblemente aproximadamente -16 y -4, respectivamente, para alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos. El programa ALIGN y los principios subyacentes a éste se describen más, por ejemplo, en Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-48 (1988) y Pearson et al., *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990).

Los programas BLAST proporcionan el análisis de al menos dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos, bien alineando una secuencia seleccionada frente a múltiples secuencias en una base de datos (por ejemplo, GenSeq) o, con BL2SEQ, entre dos secuencias seleccionadas. Los programas BLAST se modifican preferiblemente con programas de filtrado de baja complejidad tales como los programas DUST o SEG, que están integrados preferiblemente en las operaciones del programa BLAST (véanse, por ejemplo, Wootton et al., *Compu. Chem.*, 17: 149-63 (1993); Altschul et al., *Nat. Genet.*, 6: 119-29 (1994); Hancock et al., *Comput. Appl. Biosci.*, 10: 67-70 (1994); y Wootton et al., *Meth. in Enzym.*, 266: 554-71 (1996)). Si se usa una relación lambda, los ajustes preferidos para la relación son entre 0,75 y 0,95, más preferiblemente entre 0,8 y 0,9. Si se usan costes de existencia de huecos (o puntuaciones de hueco), el coste de la existencia de hueco se ajusta preferiblemente entre aproximadamente -5 y -15, más preferiblemente aproximadamente -10 y el coste de hueco por residuo se ajusta preferiblemente entre aproximadamente 0 a -5, más preferiblemente entre 0 y -3 (por ejemplo, -0,5). Pueden usarse parámetros de hueco similares con otros programas según sea apropiado. Los

programas BLAST y los principios subyacentes a ellos se describen más, por ejemplo, en Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-10 (1990), Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-68 (1990) (modificado según Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-77 (1993)) y Altschul et al., Nucl. Acids Res., 25: 3389-3402 (1997).

5 En algunos aspectos de los métodos descritos en la presente memoria, es posible usar menos de las cuatro enzimas Rep, tal como sólo una de las enzimas Rep78/Rep68 y sólo una de las enzimas Rep53/Rep40, en los que dos de las enzimas se expresan a partir de la misma única secuencia codificadora de Rep que comprende el intrón artificial. Como los promotores p5 y p19 de AAV funcionan de manera pobre en las células de insecto, un promotor operativo en células de insecto, por ejemplo, promotor p10 o polh, reemplaza a los promotores p5 y p19 para Rep78/68 y Rep52/40. Como el promotor p19 está localizado en la región codificadora de Rep, el reemplazo del promotor p19 con cualquier otro promotor cambia los codones de ORF de Rep y por lo tanto las funciones de la proteína Rep78/68.

10 Los métodos de las presentes enseñanzas utilizan un intrón artificial que funciona en células de insecto y proporciona un método para insertar un promotor operativo en células de insecto en el área del promotor p19 sin cambiar la secuencia codificadora ni las funciones de Rep78/68, y hace posible expresar tanto Rep78 como Rep52 o Rep68 como Rep40 a partir de un único casete de expresión.

15 En algunos aspectos, la secuencia codificadora de Rep puede comprender un intrón artificial que comprende el promotor polh (FIG. 1). En algunas configuraciones, la secuencia del intrón artificial que comprende el promotor polh puede ser:

```
GTAAGTACTCCCTATCAGTGATAGAGATCTATCATGGAGATAATTTAAAT
GATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTT
GTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATC
GGGCGCGAAGGGGGAGACCTGTAGTCAGAGCCCCGGGCAGCACACA
CTGACATCCACTCCCTTCTATTGTTTTAG (SEQ ID NO:1).
```

El promotor polh dentro de este intrón artificial es

```
ATCATGGAGATAATTTAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTT
ACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATT
ATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCG (SEQ ID NO: 20).
```

20 En algunos aspectos, el intrón artificial puede insertarse en la región codificadora de Rep entre los nucleótidos 850 y 851 según el genoma de AAV (no. de registro NCBI AF043303) de manera que la proteína Rep52 o Rep40 pueda expresarse a partir del promotor polh, mientras que la proteína Rep78 o Rep68 puede sintetizarse a partir del promotor p10 localizado en 5' de la secuencia codificadora de Rep. En varios aspectos adicionales, el intrón artificial puede insertarse en localizaciones distintas de los nucleótidos 850 y 851.

25 En algunos aspectos, las presentes enseñanzas describen el uso de un intrón artificial para expresar las tres proteínas Cap (VP1, VP2 y VP3) a partir de un único nucleótido codificador Cap sin mutación del codón de inicio de la traducción AUG de la proteína VP1. En algunas configuraciones, un intrón artificial se inserta entre los nucleótidos 2.227 y 2.228 según el genoma de AAV (AF043303) de manera que las proteínas VP2 y VP3 puedan sintetizarse a partir del promotor polh situado dentro del intrón artificial, mientras que la proteína VP1 pueda expresarse a partir del promotor polh localizado en 5' de la región codificadora de Cap (FIG. 2). Después de la infección de las células de insecto con baculovirus que portan la secuencia codificadora de Cap que comprende el intrón artificial, el pre-ARNm de VP1 puede transcribirse a partir del promotor en 5' de la región codificadora de Cap y el ARNm maduro puede formarse por eliminación por corte y empalme del intrón artificial. El ARNm maduro puede traducirse en la proteína VP1 usando su AUG original en lugar del codón de inicio ACG de manera que la composición de aminoácidos original de VP1 no se altera como se describe en la patente US 6.723.551 B2. Además, el ARNm de VP2 y VP3 puede transcribirse a partir del promotor polh localizado dentro del intrón artificial. Según una realización preferida, los dos promotores localizados en 5' de la secuencia codificadora de Cap y dentro del intrón artificial son el promotor polh.

30 En varios aspectos de las presentes enseñanzas, pueden usarse variaciones de la secuencia del intrón artificial en los métodos descritos. En algunas configuraciones, puede utilizarse una secuencia con una similitud de secuencia sustancial con una secuencia de nucleótidos de un intrón artificial. Por ejemplo, una secuencia con al menos 60%, 70% ó 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos del intrón artificial de SEQ ID NO: 1 puede introducirse en un casete de manera que tanto Rep78 (o Rep68) como Rep52 (o Rep40) o las tres proteínas Cap (VP1, VP2 y VP3) puedan expresarse.

- En varios aspectos de las presentes enseñanzas, se proporciona un vector compatible con células de insecto que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de las presentes enseñanzas. En algunas configuraciones, un vector puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica Rep de AAV y que comprende además un intrón artificial que comprende un promotor operativo en células de insecto. Según otra configuración, un vector compatible con células de insecto puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica Cap de AAV y que comprende además un intrón artificial con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia sustancial con la secuencia mostrada como SEQ ID NO:1. En algunas configuraciones, las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 pueden ser de AAV2. La FIG. 5 proporciona dos ejemplos de un único vector junto con una línea celular estable para la producción de AAV.
- En varios aspectos de las presentes enseñanzas, se describe una célula de insecto que comprende al menos una de una primera secuencia de nucleótidos, una segunda secuencia de nucleótidos y una tercera secuencia de nucleótidos. En estos aspectos, una primera secuencia de nucleótidos puede comprender un primer promotor operativo en células de insecto, una parte 5' de secuencia de nucleótidos que codifica Rep, un intrón artificial que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto y una parte 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica Rep, en el que el primer promotor operativo en células de insecto está unido de manera operativa a la parte 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica Rep y el segundo promotor operativo en células de insecto está unido de manera operativa a la parte 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica Rep. Además, en estos aspectos, una segunda secuencia de nucleótidos puede comprender un tercer promotor operativo en células de insecto, una parte 5' de una secuencia de nucleótidos que codifica Cap, un intrón artificial que comprende un cuarto promotor operativo en células de insecto y una parte 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica Cap, en el que el tercer promotor está unido de manera operativa a la parte 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica Cap y el cuarto promotor está unido de manera operativa a la parte 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica Cap. Además, una célula de insecto de estas enseñanzas puede comprender una primera secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de ITR de AAV.
- En algunos aspectos de las presentes enseñanzas, una secuencia de nucleótidos comprendida por una célula de insecto puede comprender dos secuencias de nucleótidos de ITR de AAV y al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés o un transgén para la expresión en una célula de mamífero entre las dos secuencias de nucleótidos de ITR de AAV. En varias configuraciones, al menos una de la primera, segunda y tercera secuencias de nucleótidos puede integrarse de manera estable en la célula de insecto.
- En otro aspecto, las presentes enseñanzas proporcionan un método para producir un genoma parvoviral en una célula de insecto. En el método, como se ilustra en la FIG. 6, uno o dos vectores compatibles con células de insecto puede introducirse en una célula de insecto. Estos vectores pueden comprender colectivamente una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos. Una primera secuencia de nucleótidos de estos aspectos puede comprender un primer promotor operativo en células de insecto, una parte 5' de una secuencia codificadora de Rep, un intrón artificial que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto y una parte 3' de la secuencia codificadora de Rep, en el que el primer promotor está unido de manera operativa a la parte 5' de la secuencia codificadora de Rep y el segundo promotor está unido de manera operativa a la parte 3' de la secuencia codificadora de Rep. Una segunda secuencia de nucleótidos de estos aspectos puede comprender una segunda secuencia de nucleótidos que incluye al menos una ITR parvoviral. En varias configuraciones de los métodos, después de introducir el vector o vectores en una célula de insecto, la célula de insecto puede mantenerse en condiciones tales que un genoma de parvovirus se produce en ella. El genoma parvoviral puede ser cualquier ácido nucleico que (1) comprende ITR 5' y 3' de o que tienen una identidad de secuencia sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente 70% de identidad, al menos aproximadamente 80% de identidad, al menos aproximadamente 90% de identidad, al menos aproximadamente 95% de identidad o mayor) con las ITR 5' y 3' de AAV, respectivamente, y (2) puede replicarse en la célula de insecto después de la introducción de uno o más vectores. En algunas configuraciones, el genoma parvoviral puede incluir además secuencias Rep o secuencias que comparten una identidad sustancial con éstas. Un parvovirus de estos aspectos puede ser cualquier miembro de Parvovirinae. En particular, un parvovirus puede ser un parvovirus que infecta mamíferos. En algunos aspectos, un parvovirus puede ser un dependovirus tal como un AAV, por ejemplo, un AAV humano o de simio. Un genoma de parvovirus producido en una célula de insecto según las presentes enseñanzas puede incluir ITR, secuencias Rep y secuencias VP de tipo salvaje y/o modificadas, así como una o más secuencias de nucleótidos adicionales (por ejemplo, uno o más transgenes).
- En otro aspecto más, las presentes enseñanzas describen métodos para producir partículas parvovirales vacías en una célula de insecto. En este método, ilustrado en la FIG. 7, un vector compatible con células de insecto puede introducirse en una célula de insecto y mantenerse en condiciones tales que una partícula parvoviral vacía se produce en ésta. La partícula parvoviral vacía puede ser cualquier cápside parvoviral. El parvovirus puede ser cualquier miembro adecuado de Parvovirinae, tal como un parvovirus que infecta mamíferos. En algunos aspectos, un parvovirus puede ser un dependovirus, tal como un AAV humano o de simio. En varias configuraciones, una partícula de parvovirus vacía producida en una célula de insecto puede incluir secuencias Cap de tipo salvaje y/o modificadas.

Ejemplos

Varios aspectos de las presentes enseñanzas pueden ilustrarse por los ejemplos siguientes no limitativos. Los ejemplos siguientes son ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de las reivindicaciones. La descripción de una composición o un método en un ejemplo no implica que un artículo o composición descrito se ha producido, o no, o que un método descrito se ha realizado, o no, excepto para los resultados presentados en tiempo pasado.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que un único ácido nucleico que comprende una secuencia codificadora de Rep de AAV2 y un intrón artificial que comprende el promotor polh puede expresar las proteínas Rep78 y Rep52.

En estos experimentos, un intrón artificial que comprende el promotor polh se diseñó usando secuencias de donante y aceptor de corte y empalme similares a las publicadas por Chisholm y Henner J Virol. 62(9): 3193-3200 (1988). Un intrón artificial (SEQ ID NO:1) se inserta en la secuencia de Rep78 de manera que el ARNm de Rep52 se transcribe a partir del promotor polh localizado dentro del intrón artificial, mientras que el pre-ARNm de Rep78 se transcribe a partir del promotor p10 localizado en 5' del codón de inicio de Rep78. Después de la eliminación por corte y empalme del intrón artificial por la célula huésped, se forma el ARNm maduro de Rep78 (FIG. 1). En estos experimentos, el intrón artificial se insertó entre los nucleótidos 850 y 851 según la numeración estándar del genoma de AAV (disponible en internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=2906016>, no. de registro AF043303; véase también Srivastava, A., et al., J Virol 45: 555-564, 1983) en el que la secuencia de nucleótidos 841-860 es agtatttaagcgcctgttg (SEQ ID NO:25). El plásmido pAAV-RC (Stratagene, La Jolla, CA) se digirió en primer lugar con HindIII y SacI para aislar el fragmento central (6.259 pb). Después, pAAV-RC se digirió con DrdI y HindIII para aislar un fragmento de 977 pb. Finalmente, 12 oligos que comprenden el intrón artificial que contiene el promotor polh se sintetizaron e hibridaron. El fragmento central de 6.259 pb, el fragmento de 977 pb y los oligos hibridados se ligaron para crear el plásmido pAAV-inRC. La secuencia codificadora de Rep que contiene el intrón artificial se amplificó por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores de PCR 5'-GTGTGTATACCCGCCATGCCGGGGTTTTACGAGAT-3' (SEQ ID NO:14) y 5'-GCGCGCATGCTCCTTCAGAGAGAGTGTCTCGAGC-3' (SEQ ID NO:15) y se digirió con las endonucleasas de restricción BstZ171 y SphI y se clonó en los sitios SmaI y SphI de pFastBacDual (Invitrogen, Carlsbad, CA) para crear pFBD-inRep (FIG. 8). Los 12 oligos usados para formar el intrón artificial son los siguientes:

5'-CAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGGTAAGTACTCCC

TATCAGTGATAG-3' (SEQ ID NO:2)

5'-AGATCTATCATGGAGATAAATTAATGATAACCATCTCGCAAATAAA

TAAGTATTTACT-3' (SEQ ID NO:3)

5'-GTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATT

ATTCATACCGTC-3' (SEQ ID NO:4)

5'-CCACCATCGGGCGCGAAGGGGGAGACCTGTAGTCAGAGCCCCCGGG

CAGCACACACTGAC-3' (SEQ ID NO:5)

5'-ATCCACTCCCTTCTATTGTTTCAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGC

GTAAACGGTTGG-3' (SEQ ID NO:6)

5'-TGGCGCAGCATCTGACGCAC-3' (SEQ ID NO:7)

5'-

GCGTCAGATGCTGCGCCACCAACCGTTTACGCTCCGTGAGATTCAAACA

G-3' (SEQ ID NO:8)

5'-

GCGCTGAAACAATAGGAAGGGAGTGGATGTCAGTGTGTGCTGCCCGGG

GGCTCTGACTAC-3' (SEQ ID NO:9)

5'-

AGGTCTCCCCCTTCGCGCCCGATGGTGGGACGGTATGAATAATCCGGAA

TATTTATAGGT-3' (SEQ ID NO:10)

5'-TTTTTTATTACAAAAGTGTACGAAAACAGTAAAATACTTATTTATTTGC

GAGATGGTTA-3' (SEQ ID NO:11)

5'-TCATTTTAATTATCTCCATGATAGATCTCTATCACTGATAGGGAGTACTT

ACCTTAAATA-3' (SEQ ID NO:12)

5'-CTGTTCCATATTAGTCCACGCCCACTGGAGCT-3' (SEQ ID NO:13)

5 El plásmido pFBD-inRep se usó para transformar células DH10Bac competentes y se aisló el ADN bácido recombinante que contiene la secuencia codificadora de Rep y se usó para generar baculovirus recombinantes Bac-inRep en células Sf9 según el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células Sf9 se mantuvieron a 28°C en SF900 II SFM que contiene 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA).

10 Para expresar las proteínas Rep, las células Sf9 se infectaron a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 1 durante 3 días a 28°C y se recogieron por centrifugación a 2.000 rpm durante 15 min. Los sedimentos celulares se lisaron en Tampón de Muestra NuPAGE®LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA), se hirvieron durante 5 min, se sonicaron durante 10 segundos. Los lisados se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y Rep78 y Rep52 se detectaron por el clon de anticuerpo monoclonal 303.9 (American Research Products; San Jose, CA). Los resultados presentados en la FIG. 9A muestran que tanto Rep78 como Rep52 se expresaron, lo que indica que el intrón artificial se eliminó con éxito por corte y empalme para proporcionar un ARNm de longitud completa que se tradujo en proteína Rep78. Los resultados indican además que el

promotor polh localizado dentro del intrón era funcional y que el ARNm de longitud completa que codifica Rep52 se transcribió y tradujo en proteína Rep52.

Ejemplo 2

5 Este ejemplo demuestra que una única secuencia codificadora de Cap de AAV2 que comprende el intrón artificial que comprende el promotor polh puede expresar las proteínas VP1, VP2 y VP3.

10 El ORF localizado en el lado derecho del genoma de AAV de tipo salvaje codifica las tres proteínas de la cápside superpuestas, VP1, VP2 y VP3. En células de mamífero, estas proteínas de la cápside se sintetizan a partir de dos ARNm sometidos a corte y empalme a partir del promotor p40. Un mensaje se traduce en VP1, mientras que otro transcrito codifica VP2 y VP3. El codón de inicio natural para VP2 es ACG, que se utiliza poco, lo que resulta en un escaneo de ribosoma a través del codón de inicio de VP3 (AUG). El uso alternativo de dos sitios aceptores de corte y empalme y la pobre utilización del codón de inicio ACG para VP2 son responsables de la estequiometría de VP1, VP2 y VP3 en las células de mamífero infectadas con AAV2 y refleja la relación de proteínas en las cápsides, 1:1:10. El intrón de cap de AAV no se corta y empalma en las células de insecto.

15 Con el fin de expresar las tres proteínas de la cápside a partir de una única secuencia codificadora y mantener el codón de inicio AUG nativo para la proteína VP1, se usó el mismo intrón artificial que el descrito en el Ejemplo 1 anterior. Se insertó en la secuencia codificadora de Cap entre los nucleótidos 2.227 y 2.228 según el genoma de AAV (AF043303) en el que la secuencia de los nucleótidos 2.221-2.223 es cttccagatt (SEQ ID NO:26). En primer lugar, el plásmido pAAV-RC se digirió con BamHI y EcoNI para aislar el fragmento central de 4.969 pb. El intrón artificial se amplificó a partir de pAAV-inRep usando los cebadores 5'-GCGCGGATCCTGTTAAGATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGGTAAGTACTCCCTATCAGTGATAGAG-3' (SEQ ID NO:16) y 5'-ATATCGTCTCGCTGAAACAATAGGAAGGGAGTGGAT-3' (SEQ ID NO:17). El cebador SEQ ID NO:16 contiene un sitio BamHI y los primeros 25 nucleótidos de la secuencia codificadora de VP1 (ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAG, SEQ ID NO:27) y el cebador SEQ ID NO:17 contiene un sitio BsmBI. El producto de PCR se digirió con BamHI y BsmBI. Un segundo fragmento de PCR se amplificó a partir de pAAV-RC usando los cebadores 5'-AATTCGTCTCGTCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGA-3' (SEQ ID NO:18) y 5'-TCCCGGAGCCGTCTTAACAG-3' (SEQ ID NO:19) y se digirió con las enzimas de restricción BsmBI y EcoNI. El fragmento central se ligó con los dos fragmentos de PCR para crear pAAV-inCap. La secuencia codificadora de Cap completa que comprende el intrón artificial se digirió con BamHI y SnaBI y se ligó en los sitios BamHI y HindIII (romos por Klenow) del plásmido pFastBacDual para crear el plásmido pFBD-inCap (FIG. 10). Este plásmido se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-inCap según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células Sf9 se infectaron con Bac-inCap durante 3 días a 28^oC, se recogieron y se lisaron en Tampón de Muestra NuPAGE®LDS. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF y se ensayaron con un anticuerpo monoclonal dirigido frente a las proteínas de la cápside de AAV (clon B1, American Research Products; San Jose, CA). Los resultados mostrados en la FIG. 9B indican que las proteínas VP1, VP2 y VP3 se expresaron, lo que demuestra el corte y empalme exitoso del intrón artificial para formar un ARNm de longitud completa que se tradujo en la proteína VP1. Los resultados demuestran además que el promotor polh localizado dentro del intrón artificial estaba funcionando apropiadamente para dirigir la expresión de las proteínas VP2 y VP3.

Ejemplo 3

40 Este ejemplo demuestra que mediante el uso del mismo diseño del intrón artificial, las proteínas VP1, VP2 y VP3 pueden expresarse a partir de los serotipos AAV8, AAV6 y AAV1.

45 El mismo intrón artificial que el usado en los ejemplos anteriores se insertó en la secuencia codificadora de Cap de AAV serotipo 8 entre los nucleótidos 2.145 y 2.146 (no. de registro NC_006261) en el que la secuencia de nucleótidos 2.141-2.150 es tccagattgg (SEQ ID NO:28), AAV serotipo 6 entre los nucleótidos 2.232 y 2.233 (no. de registro NC_001862), en el que la secuencia de nucleótidos 2.231-2.240 es agattggctc (SEQ ID NO:32) y AAV serotipo 1 entre los nucleótidos 2.247 y 2.248 (no. de registro NC_002077), en el que la secuencia de nucleótidos 2.241-2.250 es cttccagatt (SEQ ID NO:29, véase el Ejemplo 2). Para construir pFBD-inCap8 y pFBD-inCap6, el intrón artificial se amplificó por PCR a partir de pFBD-inCap usando los cebadores 5'-ATGCCCTCAGAGAGGTTGTCTCGAGCCAATCTGAAACAAT-3' (SEQ ID NO:21) y 5'-CCCGGTACCGCATGCTATGC-3' (SEQ ID NO:22). El producto de la amplificación se digirió con EcoNI y SphI y el producto digerido se ligó en los sitios EcoNI y SphI de pFBD-Cap8 y pFBD-Cap6 para crear pFBD-inCap8 (FIG. 11) y pFBD-inCap6 (FIG. 12) respectivamente. Para clonar el intrón artificial en la secuencia codificadora de Cap de AAV1, pFBD-inCap8 se digirió con EcoNI y XbaI para eliminar la secuencia codificadora de Cap de AAV8. La secuencia codificadora de Cap de AAV1 se amplificó por PCR a partir de un plásmido AAV1 usando los cebadores 5'-GATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTG-3' (SEQ ID NO:23) y 5'-GGATCCTCTAG AGTCGACCG CTACAGGGGACGGTAAGGT-3' (SEQ ID NO:24). El fragmento de PCR digerido con EcoNI y XbaI se ligó en pFBD-inCap8 digerido con EcoNI y XbaI para crear pFBD-inCap1 (FIG. 13). Los baculovirus recombinantes Bac-inCap8, Bac-inCap6 y Bac-inCap1 se generaron según el protocolo del fabricante como se describe en el ejemplo 1. Las células Sf9 se infectaron con Bac-inCap8, Bac-inCap6 y Bac-inCap1 respectivamente durante 3 días a 28^oC, se recogieron y se

lisaron en Tampón de Muestra NuPAGE®LDS. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 se detectaron con el clon B1 del anticuerpo monoclonal (American Research Products; San Jose, CA). Los resultados, mostrados en la FIG. 9, indican que las proteínas VP1, VP2 y VP3 se expresaron con éxito a partir de todos los serotipos ensayados, lo que demuestra el corte y empalme exitoso del intrón artificial para formar un ARNm de VP1 de longitud completa que se tradujo en proteínas VP1. Estos resultados demuestran además que el promotor polh dentro del intrón artificial estaba funcionando apropiadamente en todos los serotipos ensayados para dirigir la expresión de las proteínas VP2 y VP3.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que rAAV puede producirse en células de insecto usando las secuencias codificadoras de Rep y Cap de AAV, comprendiendo cada una un intrón artificial.

En estos experimentos, las células Sf9 se crecieron a 28°C hasta aproximadamente 10⁷ células/ml en medio SF900 II SFM que contiene 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin y se diluyeron hasta aproximadamente 5x10⁶ células/ml antes de la infección. Se empleó una triple infección para producir rAAV. Se usó una m.o.i. de 1 de cada Bac-inRep, Bac-GFP (o Bac-RFP) y Bac-inCap para infectar las células Sf9 a 28°C durante 3 días para producir vectores AAV de tipo 2. Para la producción de vectores de AAV de tipo 1, 6 y 8, Bac-inCap se sustituyó simplemente por Bac-inCap1, Bac-inCap6 y Bac-inCap8, respectivamente, en la triple infección. Después de 3 días de infección, se recogieron los sedimentos celulares por centrifugación a 2.000 rpm durante 15 min en una centrífuga de mesa. Los sedimentos celulares se lisaron en tampón de lisis como describen Urabe et al., Hum Gene Ther., 1:13(16): 1935-43 (2002) y los ácidos nucleicos celulares (ADN y ARN) se digirieron con benzonasa (Sigma, St. Louis, MO). Los lisados celulares se aclararon por centrifugación a 8.000 rpm durante 30 min en una centrífuga Avanti J-25 (Beckman, Fullerton, CA) y se cargaron en un tubo de centrífuga SW28 que contiene 5 ml de 1,55g/cc y 10 ml de 1,32g/cc de disoluciones de CsCl. Después de centrifugar a 28.000 rpm durante aproximadamente 16 horas a 15°C, la fracción que contiene rAAV se recogió agujereando el tubo de centrífuga usando una aguja de jeringa y se sometió a un segundo ciclo de ultracentrifugación en CsCl. La fracción que contiene rAAV se recogió de nuevo agujereando el tubo de centrífuga usando una aguja de jeringa y se dializó en tampón PBS para eliminar las sales y los detergentes. Las titulaciones de vector se determinaron por ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo según el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados, presentados en la Tabla 1, muestran que pueden producirse altas titulaciones de vectores rAAV en células Sf9 usando los baculovirus recombinantes que portan las secuencias codificadoras de Rep y Cap que comprenden el intrón artificial, respectivamente.

TABLA 1

Rendimientos del genoma del vector AAV en células Sf9 según se determina por RT-PCR cuantitativa		
No. de Experimento	Serotipo y Transgén	Rendimiento (genoma de vector/litro de cultivo de Sf9)
1	AAV2-GFP	1,56 x 10 ¹⁴
2	AAV2-RFP	1,58 x 10 ¹⁴
3	AAV2-GFP	9,77 x 10 ¹³
4	AAV6-GFP	3,53 x 10 ¹³
5	AAV8-GFP	9,65 x 10 ¹³
6	AAV1-GFP	4,36 x 10 ¹³
7	AAV1-GFP	4,47 x 10 ¹³

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la producción de rAAV en células de insecto usando el sistema de dos vectores.

La secuencia codificadora de Rep y Cap cada una comprendiendo el intrón artificial se clonaron juntas usando técnicas de clonación estándar en un único baculovirus como se muestra en la FIG. 4. Las células Sf9 se crecieron a 28°C hasta 10⁷ células/ml y se diluyeron hasta 5 x 10⁶ células/ml justo antes de la infección. Se usaron Bac-inRep-inCap y Bac-GFP cada uno a una m.o.i. de uno para infectar las células a 28°C durante 3 días. Las células se recogieron y los vectores rAAV se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados, presentados en la TABLA 2, indican la producción exitosa de los vectores AAV2 usando el sistema de dos vectores.

TABLA 2

Rendimientos del genoma del vector AAV en células Sf9 según se determina por RT-PCR cuantitativa		
No. de Experimento	Serotipo y Transgén	Rendimiento (genoma de vector/litro de cultivo de Sf9)
1	AAV2-GFP	$1,33 \times 10^{14}$
2	AAV2-GFP	$1,06 \times 10^{14}$

Ejemplo 6

5 Este ejemplo demuestra que las proteínas VP1, VP2 y VP3 se empaquetan apropiadamente en viriones usando las secuencias codificadoras de Cap de AAV que comprenden el intrón artificial.

10 En estos experimentos, los vectores AAV2, AAV6 y AAV8 purificados, cada uno a 10^{10} genomas del vector, se hirvieron en Tampón de Muestra NuPAGE®LDS durante 5 min. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 se detectaron con el clon B1 de anticuerpo monoclonal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los resultados demuestran que usando las secuencias codificadoras de Cap que comprenden el intrón artificial, las tres proteínas de la cápside pueden empaquetarse apropiadamente en viriones.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra que los vectores AAV producidos en las células de insecto usando las secuencias codificadoras de Rep y Cap que comprenden el intrón artificial son infecciosos y pueden administrar genes a células diana.

15 En estos experimentos, se usaron AAV2-GFP y AAV6-GFP para transducir células de carcinoma hepatocelular HepG2 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) para mostrar la infectividad de los vectores producidos en células de insecto. Las células HepG2 se crecieron a 37°C en medio MEM (ATCC) suplementado con 10% suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT) y 100 unidades/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células HepG2 a $1,5 \times 10^5$ células/pocillo se sembraron en placas de 24 pocillos y se crecieron toda la noche a 37°C en un incubador con CO_2 . Los vectores AAV se diluyeron hasta $1,2 \times 10^9$ vg/ml, $1,2 \times 10^8$ vg/ml, $1,2 \times 10^7$ vg/ml y $1,2 \times 10^6$ vg/ml en el medio de cultivo sin suero pero que contiene 20 μM de etopósido (A.G. Scientific, Inc., San Diego, CA). El medio antiguo se eliminó de las células y se añadieron a cada pocillo 500 μl de vectores AAV diluidos. Dos días después de la transducción, las células que expresaban GFP se marcaron y se fotografiaron. Los resultados muestran que las células HepG2 se transdujeron eficazmente con los dos vectores AAV2-GFP y AAV6-GFP.

Ejemplo 8

25 Este ejemplo ilustra que las secuencias de ácido nucleico de las presentes enseñanzas que comprenden las secuencias codificadoras de Rep o Cap y un intrón artificial son estables en un baculovirus.

30 Para demostrar la estabilidad de los baculovirus que comprenden las secuencias codificadoras de Rep y Cap respectivamente, los baculovirus se purificaron en placa y posteriormente se subcultivaron 5 veces y se ensayó la expresión de las proteínas Rep y Cap. La purificación en placa se realizó como sigue: se sembraron células Sf9 a 1×10^6 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubó a 28°C durante 30 min. Los baculovirus se diluyeron hasta 100, 50 y 25 pfu/100 μl . El medio antiguo se eliminó de las células y los baculovirus diluidos se añadieron para infectar las células durante 20 min a 28°C . Se fundió agarosa en DPBS al 1%, se enfrió hasta 37°C y se mezcló con 1 volumen de SF900II SFM a 37°C y se añadieron a cada pocillo 1,5 ml de la capa agarosa-SF900II SFM. Cuando la agarosa solidificó, se añadieron a cada pocillo 1,5 ml de SF900II SFM y las placas se incubaron a 28°C durante 6 días para que se formaran placas. Al final de la incubación, se tomaron 6 placas de Bac-inCap y 12 placas de Bac-inRep y se transfirieron a tubos de microfuga que contenían 500 μl de medio SF900II SFM. Las células Sf9 en las placas de 6 pocillos se infectaron con 100 μl de cada placa durante 4 días. Las células se recogieron para análisis por transferencia Western y los sobrenadantes se recogieron y 3 μl de los sobrenadantes se usaron para infectar células Sf9 en las placas de 6 pocillos. Este procedimiento se repitió 4 veces más hasta el subcultivo 5. Los resultados muestran que todas las placas tomadas a través de 5 subcultivos expresan las proteínas Rep78 y Rep52 o VP1, VP2 y VP3 como se esperaba, sin pérdida aparente de expresión de proteínas.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra la expresión en una célula de insecto de múltiples proteínas VP de SV40 a partir de un único casete de expresión que comprende múltiples intrones.

5 El virus 40 de simio (SV40) es un virus con ADN bicatenario con un genoma circular cerrado covalentemente de 5,2 kb y ha sido secuenciado completamente (Fiers, W., et al., Nature 273: 113-120, 1978). La secuencia está disponible en internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=9628421>, no. de registro NC_001669. En las células de mamífero, sus tres proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3 se transcriben todas a partir del mismo promotor de SV40 y la expresión de estas proteínas VP está controlada por el mecanismo de corte y empalme de intrones. La proteína VP3 es una forma truncada de la proteína VP2 y la parte 5' de la secuencia que codifica la proteína VP1 se superpone con la parte 3' de VP2 y VP3 pero no comparte el mismo ORF.

10 Pueden usarse intrones artificiales para expresar las proteínas de la cápside de SV40 en células de insecto. Para dirigir la expresión de VP3, un intrón artificial que comprende un promotor polh se inserta en el genoma de SV40 entre los nucleótidos 913 y 914 en el que la secuencia de nucleótidos 911-920 es caggaatggc (SEQ ID NO:30). Para dirigir la expresión de VP1, un intrón artificial que comprende el mismo promotor polh se inserta entre los nucleótidos 1.461 y 1.463 en el que la secuencia de nucleótidos 1.461-1.470 es aggcctgtac (SEQ ID NO:31). La proteína VP2 se expresa a partir del promotor polh unido de manera operativa al gen de VP2 (FIG. 14).

15 Aunque las enseñanzas anteriores se han descrito con algún detalle mediante la ilustración y ejemplo para los propósitos de aclarar la comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la vista de las enseñanzas que pueden hacerse a éstas determinados cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

1. Berns, K. I., "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," **Capítulo 69 en** Fields Virology (3a Ed. 1996).
2. Choi et al., Curr. Gene Ther., Jun;5(3):299-310 (2005).
3. Tratschin et al., Mol. Cell Biol., 5(11):3251-3260 (1985).
4. Grimm et al., Hum. Gene Ther., 10(15):2445-2450 (1999).
5. Jennings et al., Arthritis Res, 3:1 (2001).
6. Davidson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(7):3428-3432 (2000).
7. Urabi et al., J Virol., 80(4):1874-85 (2006).
8. Kohlbrenner et al., Mol. Ther., 12(6):1217-25 (2005).
9. Chao et al., Mol. Ther. 2:619 (2000).
10. Chiorini et al., J. Virol. 73:1309 (1999).
11. Xiao et al., J. Virol. 73:3994 (1999).
12. Muramatsu et al., Virology 221:208 (1996).
13. Chiorini et al., J. Vir. 71: 6823-33(1997).
14. Srivastava et al., J. Vir. 45:555-64 (1983).
15. Chiorini et al., J. Vir. 73:1309-1319 (1999).
16. Rutledge et al., J. Vir. 72:309-319 (1998).
17. Wu et al., J. Vir. 74: 8635-47 (2000).
18. Samulski et al., J. Vir. 63:3822-8 (1989).
19. Kajigaya et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88: 4646-50 (1991).

20. Ruffing et al., J. Vir. 66:6922-30 (1992)
21. Kimbauer et al., Vir. 219:37-44 (1996).
22. Zhao et al., Vir. 272:382-93 (2000).
23. Chisholm y Henner, J. Virol., 62(9):3193-3200 (1988).

DOCUMENTOS DE PATENTE U.S.

- | | | |
|-----------------|---------|-------------------|
| 5,387,484 A | 2/1995 | Doany |
| 5,688,676 A | 11/1997 | Zhou et al. |
| 5,691,176 A | 11/1997 | Lebkowski et al. |
| 5,741,683 A | 4/1998 | Russell et al. |
| 6,204,059 B1 | 3/2001 | Samulski et al. |
| 2002/0081721 A1 | 6/2002 | Allen et al. |
| 6,723,551 B2 | 4/2004 | Kotin, et al |
| 2006/0166363 A1 | 7/2006 | Zolotukhin et al. |

Los párrafos numerados siguientes definen aspectos particulares de la presente invención.

1. Un casete de ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que cada uno del primer promotor operativo en células de insecto y el segundo promotor operativo en células de insecto se selecciona independientemente del grupo que consiste en un promotor p10 y un promotor polh.
- 5 2. Un casete de ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el gen que comprende ORF superpuestos se selecciona del grupo que consiste en un gen Rep de un virus adeno-asociado (AAV) y un gen Cap de un AAV.
3. Un casete de ácido nucleico según el párrafo 2, en el que el primer ORF es un ORF Rep 78/68 y el al menos un ORF adicional es un ORF Rep 52/40.
- 10 4. Un casete de ácido nucleico según el párrafo 3, en el que el primer promotor es un promotor p10 y el segundo promotor es un promotor polh.
5. Un casete de ácido nucleico según el párrafo 2, en el que el primer ORF es un ORF VP1 y el al menos un ORF adicional es un ORF VP2/VP3.
6. Un casete de ácido nucleico según el párrafo 5, en el que el primer promotor es un primer promotor polh y el segundo promotor es un segundo promotor polh.
- 15 7. Una célula de insecto según la reivindicación 7, en la que el transgén es un gen informador que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una cloranfenicol acetil transferasa, una β -galactosidasa, una β -glucuronidasa, una luciferasa de renilla, una luciferasa de luciérnaga, una proteína verde fluorescente (GFP), una proteína roja fluorescente (RFP) y una fosfatasa alcalina.
8. Una célula de insecto según la reivindicación 7, en la que el transgén comprende un ORF que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una hormona polipeptídica, un interferón, un factor de la coagulación de la sangre, una vacuna y una eritropoyetina.
- 20 9. Una célula de insecto según la reivindicación 5, en la que el casete de ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula de insecto.
10. Una célula de insecto según la reivindicación 7, en la que al menos uno del casete de ácido nucleico y el casete de ácido nucleico adicional está integrado en el genoma de la célula de insecto.
- 25 11. Una célula de insecto según la reivindicación 5, en la que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula BTI-Tn-5B1-4 de *Trichoplusia ni*, una célula Sf9 de *Spodoptera frugiperda* y una célula Sf21 de *Spodoptera frugiperda*.
- 30 12. Un método para expresar una pluralidad de polipéptidos codificados por un gen que comprende ORF superpuestos según la reivindicación 11, en el que la al menos una célula de insecto se selecciona del grupo que consiste en una célula BTI-Tn-5B1-4 de *Trichoplusia ni*, una célula Sf9 de *Spodoptera frugiperda* y una célula Sf21 de *Spodoptera frugiperda*.
- 35 13. Un método para producir cápsides de AAV in vitro según la reivindicación 13, en el que el proporcionar una o más células de insecto que comprenden un casete de ácido nucleico del párrafo 2 comprende transformar, transfectar o infectar una o más células de insecto con un ácido nucleico o vector que comprende el casete.
14. Un ácido nucleico que comprende el casete de la reivindicación 2, que comprende además un segundo casete, comprendiendo el segundo casete, en orden 5' a 3':
una segunda señal de poliadenilación;
una parte 3' de un segundo gen que comprende ORF superpuestos;
40 un segundo intrón que comprende un tercer promotor operativo en insectos;
una parte 5' del segundo gen; y
un cuarto promotor operativo en insectos.
15. Un ácido nucleico según el párrafo 14, en el que el segundo casete está en una orientación antisentido respecto al primer casete.
- 45 16. Un ácido nucleico según el párrafo 14, en el que el segundo casete está en una orientación con sentido respecto al primer casete.

17. Un ácido nucleico según el párrafo 14, en el que el primer casete comprende un gen Rep de AAV que comprende un ORF Rep 78/68 y un ORF Rep 52/40 y el segundo casete comprende un gen Cap de AAV que comprende un ORF VP1 y un ORF VP2/VP3.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Virovek, Inc.
 Chen, Haifeng

5 <120> Expresión en células de insecto de genes con marcos de lectura abiertos superpuestos, métodos y composiciones de éstos.
 <130> 60000177-0001
 <140> PCT/US07/76799
 <141> 2007-08-24
 <150> US 60/839.761

10 <151> 2006-08-24
 <160> 32
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 229

15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> intrón artificial que comprende el promotor polh
 <400> 1

gtaagtactc cctatcagtg atagagatct atcatggaga taattaaaat gataaccatc	60
tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa	120
atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcga agggggagac ctgtagtcag	180
agccccggg cagcacacac tgacatccac tcccttcta ttgtttcag	229

20 <210> 2
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> oligo usado para formar el intrón artificial
 <400> 2

cagtgggcgt ggactaatat ggaacagtat ttaaggtaag tactccctat cagtgatag	59
--	----

30 <210> 3
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo usado para formar el intrón artificial

35 <400> 3

agatctatca tggagataat taaaatgata accatctcgc aaataaataa gtattttact	60
---	----

ES 2 385 679 T3

<210> 4
<211> 60
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> oligo usado para formar el intrón artificial
<400> 4
gttttcgtaa cagttttgta ataaaaaac ctataaatat tccggattat tcataccgtc 60
<210> 5
10 <211> 60
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligo usado para formar el intrón artificial
15 <400> 5
ccaccatcgg gcgcgaaggg ggagacctgt agtcagagcc cccgggcagc acacactgac 60
<210> 6
<211> 60
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> oligo usado para formar el intrón artificial
<400> 6
atccactccc ttctattgt ttcagcgct gtttgaatct cacggagcgt aaacggttgg 60
25 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
30 <223> oligo usado para formar el intrón artificial
<400> 7
tggcgcagca tctgacgcac 20
<210> 8
<211> 50
35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligo usado para formar el intrón artificial

<400> 8
gcgctcagatg ctgcgccacc aaccgtttac gctccgtgag attcaaacag 50
 <210> 9
 <211> 60
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo usado para formar el intrón artificial
 <400> 9
 10 **gcgctgaaac aataggaagg gagtggatgt cagtgtgtgc tgcccggggg ctctgactac** 60
 <210> 10
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> oligo usado para formar el intrón artificial
 <400> 10
aggctctccc cttcgcgcc gatggtggga cggtatgaat aatccggaat atttataggt 60
 <210> 11
 20 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo usado para formar el intrón artificial
 25 <400> 11
ttttttatta caaaactggt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc gagatggta 60
 <210> 12
 <211> 60
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo usado para formar el intrón artificial
 <400> 12
tcattttaat tatctccatg atagatctct atcactgata gggagtactt accttaaata 60
 35 <210> 13
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

	<220>	
	<223> oligo usado para formar el intrón artificial	
	<400> 13	
	ctgttcata ttagtcacg cccactggag ct	32
5	<210> 14	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> oligo usado para amplificar la secuencia codificadora de Rep	
	<400> 14	
	gtgtgtatac ccgccatgcc ggggttttac gagat	35
	<210> 15	
	<211> 35	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligo usado para amplificar la secuencia codificadora de Rep	
	<400> 15	
20	gcgcgcatgc tccttcagag agagtgtcct cgagc	35
	<210> 16	
	<211> 68	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> oligo usado para amplificar el intrón artificial	
	<400> 16	
	gcgcggatcc tgtaagatg gctgccgatg gttatcttcc aggtaagtac tccctatcag	60
	tgatagag	68
	<210> 17	
30	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligo usado para amplificar el intrón artificial	
35	<400> 17	
	atatcgtctc gctgaaacaa taggaagggga gtggat	36
	<210> 18	

<211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> oligo usado para amplificar el fragmento de pAAV-RC
 <400> 18
aattcgtctc gtcagattgg ctcgaggaca ctctctctga 40
 <210> 19
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo usado para amplificar el fragmento de pAAV-RC
 <400> 19
tcccggagcc gtcttaacag 20
 15 <210> 20
 <211> 129
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> promotor polh en el intrón artificial
 <400> 20
atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc 60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
tcgggcgcg 129
 <210> 21
 25 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo usado para amplificar el intrón artificial
 30 <400> 21
atgccctcag agaggttgtc ctcgagccaa tctgaaacaa t 41
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

	<223> oligo usado para amplificar el intrón artificial	
	<400> 22	
	cccggtagcg catgctatgc	20
	<210> 23	
5	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligo usado para amplificar la secuencia codificadora de Cap de AAV1	
10	<400> 23	
	gattggctcg aggacaacct ctctg	25
	<210> 24	
	<211> 41	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligo usado para amplificar la secuencia codificadora de Cap de AAV1	
	<400> 24	
	ggatcctcta gagtcgaccg cttacagggg acgggtaagg t	41
20	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> virus adeno-asociado 2	
	<400> 25	
25	agtatttaag cgctgtttg	20
	<210> 26	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> virus adeno-asociado 2	
30	<400> 26	
	cttccagatt	10
	<210> 27	
	<211> 25	
	<212> ADN	
35	<213> virus adeno-asociado 2	
	<400> 27	
	atggctgccg atggttatct tccag	25
	<210> 28	

	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> AAV serotipo 8	
	<400> 28	
5	tccagattgg	10
	<210> 29	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> AAV serotipo 1	
10	<400> 29	
	cttccagatt	10
	<210> 30	
	<211> 10	
	<212> ADN	
15	<213> Virus 40 de simio	
	<400> 30	
	caggaatggc	10
	<210> 31	
	<211> 10	
20	<212> ADN	
	<213> Virus 40 de simio	
	<400> 31	
	aggcctgtac	10
	<210> 32	
25	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> AAV serotipo 6	
	<400> 32	
	agattggctc	10
30		

REIVINDICACIONES

1. Un casete de ácido nucleico para expresar en una célula de insecto una pluralidad de polipéptidos codificados por un gen que comprende marcos de lectura abiertos (ORF) superpuestos, comprendiendo el casete, en orden 5' a 3':
- a) un primer promotor operativo en células de insecto;
- 5 b) una parte 5' de un primer ORF del gen;
- c) un intrón que comprende un segundo promotor operativo en células de insecto; y
- d) una parte 3' del primer ORF del gen, en el que la parte 3' del primer ORF se superpone con al menos un ORF adicional y en el que el primer promotor operativo en células de insecto está unido de manera operativa al primer ORF; el primer ORF comprende un primer codón de inicio de la traducción; el segundo promotor operativo en células de insecto está unido de manera operativa al menos a un ORF adicional y el al menos un ORF adicional comprende al menos un codón de inicio de la traducción adicional y en el que al menos uno de a), b), c) y d) es heterólogo al menos a un otro de a), b), c) y d).
- 10 2. Un casete de ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende además e) una señal de poliadenilación situada 3' respecto a d).
- 15 3. Un vector que comprende el casete de ácido nucleico de la reivindicación 1.
4. Un vector según la reivindicación 3, en el que el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un virus y una combinación de éstos.
5. Una célula de insecto in vitro que comprende un casete de ácido nucleico de la reivindicación 1.
6. Una célula de insecto in vitro según la reivindicación 5, que comprende un primer casete de ácido nucleico de la reivindicación 1 y un segundo casete de ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que el primer casete de ácido nucleico comprende un gen Rep que comprende un ORF Rep 78/68 como el primer ORF y un ORF Rep 52/40 como el ORF adicional y el segundo casete de ácido nucleico comprende un gen Cap en el que el primer ORF es un ORF VP1 y el ORF adicional es un ORF VP2/VP3.
- 20 7. Una célula de insecto según la reivindicación 6, que comprende además un casete de ácido nucleico adicional, comprendiendo el casete adicional, en orden 5' a 3':
- 25 una primera repetición terminal invertida (ITR) de un virus adeno-asociado;
- un promotor operativo en células de mamífero;
- un transgén;
- una señal de poliadenilación; y
- 30 una segunda ITR de un AAV.
8. Un cultivo celular que comprende:
- una pluralidad de células de insecto de la reivindicación 5; y
- un medio de cultivo.
9. Un cultivo celular que comprende:
- 35 una pluralidad de células de insecto de la reivindicación 7; y
- un medio de cultivo que comprende al menos aproximadamente 10^{13} genomas de AAV/litro.
10. Un cultivo celular según la reivindicación 9, en el que el medio de cultivo que comprende al menos aproximadamente 10^{13} genomas de AAV/litro es un medio de cultivo que comprende al menos aproximadamente 10^{14} genomas de AAV/litro.
- 40 11. Un método para expresar una pluralidad de polipéptidos codificados por un gen que comprende ORF superpuestos, comprendiendo el método:
- a) infectar o transfectar al menos una célula de insecto con un casete de ácido nucleico de la reivindicación 1; y
- b) cultivar la al menos una célula de insecto.
12. Un método para producir virus adeno-asociados (AAV) en una célula de insecto, comprendiendo el método:
- 45 a) proporcionar una o más células de insecto de la reivindicación 7; y

b) cultivar la una o más células de insecto en un medio de cultivo.

13. Un método para producir cápsides de AAV in vitro, comprendiendo el método:

a) proporcionar una o más células de insecto que comprenden un casete de ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que el gen que comprende ORF superpuestos es un gen Cap de un AAV; y

5 b) cultivar la una o más células de insecto en un medio de cultivo.

14. Un método para producir genomas de AAV in vitro, comprendiendo el método:

a) proporcionar una o más células de insecto que comprenden el casete de ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que el gen que comprende ORF superpuestos es un gen Rep de un virus adeno-asociado (AAV) y el primer ORF es un ORF Rep78/68 y el al menos un ORF adicional es un ORF Rep 52/40 y un casete de ácido nucleico adicional, comprendiendo el casete adicional, en orden 5' a 3':

10

una primera repetición terminal invertida (ITR) de un virus adeno-asociado;

un promotor operativo en células de mamífero;

un transgén;

una señal de poliadenilación; y

15

una segunda ITR de un AAV; y

b) cultivar la una o más células de insecto en un medio de cultivo.

