

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 147**

51 Int. Cl.:

C07K 14/015 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010 E 10003296 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2368903**

54 Título: **Virus cooperador obtenido a partir de adenovirus para mejorar la producción de parvovirus recombinantes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2014

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**EL-ANDALOUSSI, NAZIM;
MARCHINI, ANTONIO;
ROMMELAERE, JEAN;
LEUCHS, BARBARA y
ENDELE, MAX**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 461 147 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

Virus cooperador obtenido a partir de adenovirus para mejorar la producción de parvovirus recombinantes

La presente invención se refiere a un virus cooperador obtenido a partir de adenovirus que comprende las secuencias de ADN adenovírico de E2a, E4(orf6), el gen del ARN VAI y la unidad génica de la cápside VP de un parvovirus que se replica de forma autónoma. La presente invención también se refiere a un método para preparar de manera eficaz un parvovirus autónomo recombinante (partícula) que se basa en el uso de diversos virus/vectores cooperadores obtenidos a partir de adenovirus.

Los parvovirus son virus icosaédricos de ADN monocatenario. Su genoma contiene aproximadamente 5,1 kilobases e incluye los promotores P4 y P38, que dirigen la expresión de proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y estructurales (VP1 y VP2), respectivamente. Los parvovirus pertenecen a la familia Parvovirinae, junto con los Dependovirus y los Eritrovirus. Los Dependovirus incluyen los virus adenoasociados (VAA). Estos virus, como su nombre indica, son dependientes de un virus cooperador, como el adenovirus, para un ciclo de infección productiva [1]. Por otro lado, los Eritrovirus y los Parvovirus son autónomos; son capaces de completar su ciclo productivo sin un virus cooperador. Los Eritrovirus incluyen B19, conocido por ser patógeno para los seres humanos.

Los parvovirus de roedores no son patógenos para los seres humanos y muestran propiedades oncotrópicas y oncolíticas que los vuelven agentes muy atractivos para la terapia contra el cáncer. Para mejorar aún más su capacidad antineoplásica intrínseca, se han generado virus recombinantes para entregar transgenes antitumorales a células cancerígenas. La estrategia consiste en sustituir los genes VP de la cápside por un transgén particular [2]. Los vectores conservan la secuencia que codifica NS1/2 (bajo el control del promotor P4 parvovírico) y los telómeros del genoma de parvovirus que son necesarios para la amplificación de ADN vírico y la encapsidación. El transgén de interés generalmente se expresa bajo el control del promotor P38, el cual se transactiva fuertemente con la proteína NS1. La producción de los virus recombinantes solo se puede producir en células productoras, proporcionando las proteínas VP en trans. La delección de la región codificadora de la cápside en el genoma vírico ofrece la oportunidad de insertar transgenes de hasta aproximadamente 2500 nt, aunque grandes delecciones de VP reducen significativamente los títulos de producción, probablemente debido a la inhibición de elementos importantes de la encapsidación de virus que actúan en cis [2]. Los vectores de parvovirus recombinantes generados de esta manera tienen una replicación defectuosa, proporcionando una ventaja adicional para la seguridad terapéutica, en comparación con sus homólogos replicativos. Ejemplos de transgenes transducidos con éxito mediante parvovirus recombinantes, incluyen genes tóxicos, tales como la timidina cinasa del virus del herpes simple (por ejemplo, usada en combinación con el profármaco ganciclovir) [3] o apoptina [4]. Los viriones que expresan estos transgenes tienen actividades antineoplásicas mejoradas, en comparación con los virus de tipo silvestre. También se han generado parvovirus recombinantes que codifican genes inmunomoduladores tales como citocinas o quimiocinas, como interleucina-2 (IL-2) o proteína quimiotáctica de monocitos 1 o 3 (MCP-1) [5-8], proteína inducible con interferón- γ (IP-10) [9]. Estos viriones inducen un efecto espectador antitumoral potente en varios modelos de tumores *in vitro* e *in vivo*. Recientemente, se han observado efectos antitumorales sinérgicos usando una combinación de virus recombinantes que transducen el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) e IP-10 [10].

El documento WO 01/25462 A1 se refiere a la producción de VAA recombinantes usando un adenovirus que comprende genes rep/cap de VAA.

El documento WO 03/061582 A2 se refiere a la generación de vectores de VAA a través de una metodología completamente mediada por adenovirus.

Las actividades cooperadoras del adenovirus frente a la replicación del VAA se han estudiado ampliamente. La proteína E1A adenovírica es esencial para la activación de la expresión génica de VAA mediante la unión y la activación del promotor P5 rep de VAA-2 [12]. Del mismo modo, E2A, otra proteína adenovírica, activa la transcripción del promotor P5 de VAA-2 [13]. E2A también parece que coopera con el ARN I asociado con virus (ARN VAI) para mejorar la traducción de los ARNs de VAA-2 [14]. E4 adenovírica (ORF6) mejora la conversión de los genomas de VAA-2 recombinantes de cadena sencilla, en genomas de doble cadena, una etapa limitante de la tasa de replicación del ADN vírico, tanto *in vitro* como *in vivo* [15]. El ARN VAI también puede impulsar la replicación de VAA-5. Se ha descrito que el ARN VAI interacciona físicamente con la proteína cinasa activada con ARN de doble cadena (PKR), que de otro modo provocaría una respuesta inmune antivírica que bloquearía la producción de proteína vírica [16].

Estudios con VAA-2 recombinante han confirmado que un pequeño subconjunto de genes adenovíricos es suficiente para el efecto cooperador. En células HEK 293, que proporcionan el gen E1 en trans, el conjunto mínimo de genes para la producción eficaz de VAA-2 recombinante es E2a, E4(orf6) y el gen del ARN VAI [17, 18]. Un plásmido cooperador denominado pXX6, que contiene este conjunto de genes, se utiliza actualmente para la producción de VAA-2 recombinante exento de adenovirus [18]. Este plásmido mantiene la producción de VAA-2 de una manera similar a la del adenovirus infeccioso [18, 19]. Los genes de adenovirus (E2a, E4orf6 y los genes del ARN VAI) también permiten la replicación del ADN del eritrovirus B19 humano y la producción vírica en células HEK 293, que de otro modo no serían permisivas para B19 [20].

Sin embargo, la interacción entre adenovirus y parvovirus autónomos se ha explorado menos. La replicación de par

vovirus H-1 en cultivos secundarios de células pulmonares embrionarias humanas normales no se inicia, a menos que se coinfecten con el adenovirus de serotipo 12 como virus cooperador [21]. Además, el adenovirus de serotipo 2 induce un aumento de la replicación del ADN de parvovirus MVMP y traslada el ADN de MVMP desde los nucleolos del hospedador a las plantas de replicación del adenovirus en células HeLa [22].

5 Un desafío principal en el desarrollo y la optimización de parvovirus recombinantes (rec.PVs) para aplicaciones clínicas, es incrementar la cantidad de virus que se produce. Debido a su naturaleza no proliferativa, su producción depende únicamente de la eficacia de la transfección de los componentes genómicos del parvovirus en las líneas celulares de encapsidación (células embrionarias de riñón humano normales, HEK 293 o 293T). También el uso de líneas celulares de encapsidación que expresan constitutivamente las proteínas VP no mejoró significativamente la producción de parvovirus recombinantes [11]. Sigue siendo muy importante desarrollar medios para incrementar la producción de parvovirus recombinantes.

Por lo tanto, el problema en que se basa la presente invención es proporcionar un medio para incrementar la eficacia de la producción de parvovirus recombinantes.

15 Este problema técnico se resuelve proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Se ha encontrado, sorprendentemente, que también la producción de parvovirus recombinantes se puede beneficiar de la cooperación de genes de adenovirus. La producción de parvovirus recombinantes se realiza de forma clásica en células productoras HEK 293T, transfectándolas con el genoma de parvovirus recombinante y un plásmido que es portador de los genes VP de la cápside. El protocolo en uso produce títulos muy bajos de parvovirus recombinantes, en el intervalo de 0,1 a 0,5 unidades de transducción (TU) por célula productora, en las mejores condiciones. Además, debido a diferencias en la eficacia de la transfección del plásmido, también hay una alta variabilidad de los títulos obtenidos. Los virus generados de esta manera tienen una replicación defectuosa, pero contienen una pequeña fracción de virus competentes para la replicación (RCVs) reconstituidos a través de recombinaciones homólogas entre los genomas víricos y los genes de la cápside [11]. Estos RCVs son contaminantes no deseados de las reservas víricas finales y por lo tanto es importante limitar su aparición durante la producción de parvovirus recombinantes.

25 En los experimentos resultantes en la presente invención, la eficacia de la producción de parvovirus recombinantes podría incrementarse significativamente empleando genes de adenovirus que se han introducido en las células, ya sea mediante transfección de las células productoras con un plásmido pXX6 obtenido a partir de adenovirus o a través de la infección de las mismas con Adenovirus-5 recombinante (Ad-5). Empleando el nuevo protocolo, se alcanzaron títulos más de 10 veces superiores en un espacio de tiempo más corto (2 días en lugar de 3). El porcentaje de RCVs generados es comparable al del protocolo exento de adenovirus. De cara a estos resultados, se generó un nuevo vector Ad-5 recombinante con replicación defectuosa que albergaba la unidad génica de la cápside de parvovirus (cooperador Ad-VP). Con este virus cooperador, se pudieron generar parvovirus recombinantes en otras células productoras tales como NB324K (NBK) y se produjeron títulos víricos más elevados, sin afectar a la calidad del virus recombinante. Es importante destacar que el uso de un cooperador Ad-VP permite evitar la etapa de transfección. El procedimiento se puede normalizar, es reproducible y reduce tanto el tiempo de producción como los costes.

Compendio:

La invención en su sentido más amplio es tal y como se define en las reivindicaciones independientes.

40 El uso de vectores obtenidos a partir de adenovirus 5, por ejemplo, pXX6 (proporcionado mediante transfección) y el Ad5ΔE1ΔE3, (proporcionado mediante transfección y a través de infección en forma de virus recombinante Ad5ΔE1ΔE3-CMV/GFP), mejora más de 10 veces la producción de parvovirus recombinantes en células HEK 293T.

45 El incremento de la producción proporcionado por vectores obtenidos a partir de adenovirus, es independiente del modo de entrega de los parvovirus recombinantes, (transfección del plásmido o infección vírica), así como del tamaño y de la naturaleza del transgén parvovírico en células HEK 293T.

pXX6 acelera la producción de parvovirus recombinante y acorta el tiempo de producción de 3 a 2 días.

pXX6 aumenta significativamente y acelera la replicación del ADN de parvovirus en células HEK 293T.

50 pXX6 no favorece la generación no deseada de Virus Competentes para la Replicación (RCV); los niveles de RCVs obtenidos utilizando el protocolo basado en pXX6 son tan bajos como los obtenidos utilizando metodologías convencionales.

55 El virus cooperador Ad-VP que contiene los genes cooperadores de Ad, así como la unidad génica de la cápside de parvovirus permite la amplificación de parvovirus recombinantes sin la necesidad de una etapa de transfección, a través de la infección de un virus cooperador Ad-VP en combinación con el parvovirus recombinante seleccionado. Esto reduce significativamente el tiempo y los costes de la producción (en relación, por ejemplo, con los reactivos de la transfección y el personal).

Por otra parte, supera las limitaciones anteriores en la elección de la línea celular de encapsidación utilizada, ya que hace posible el uso de líneas celulares que son difíciles de transfectar, pero que son buenas productoras de PVs, por ejemplo, las células NBK. Esto permite la producción a gran escala de parvovirus recombinante, por ejemplo, en biorreactores.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Plásmidos basados en adenovirus mejoran la producción de parvovirus recombinantes

Células HEK 293T, sembradas en placas de 6 cm, se transfectaron con prec.PV-GFP y pCMV/VP para producir parvovirus recombinantes. Simultáneamente, se cotransfectaron o no con el plásmido pXX6 obtenido a partir de adenovirus. Tres días después de la transfección, las células se recogieron junto con su medio y se lisaron mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Volúmenes iguales de extractos de virus crudo se aplicaron a células NBK de nuevo aporte en un ensayo de transducción, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

A: Ejemplo representativo de micrografías procedentes del ensayo de transducción, que muestra células positivas para GFP procedentes de capas celulares confluentes. Las micrografías fueron tomadas con los mismos ajustes de la cámara, lo que sugiere que diferentes números valorados de células verdes se corresponden con un inóculo de virus diferente.

B: Análisis de transferencia Western. Muestras por triplicado procedentes del ensayo de transducción se combinaron y se extrajeron las proteínas. Se separaron 5 µg de proteínas mediante SDS-PAGE. Se realizaron inmunotransferencias utilizando anticuerpos anti-NS1, anti-GFP y anti-actina (utilizada como testigo de carga). neg., testigo negativo (células no transfectadas).

C: Cuantificación de los ensayos de transducción. Las células se transfectaron con prec.PV-GFP, pCMV/VP en combinación con los plásmidos indicados, o sin ningún ADN adicional (-). pXX6 o pAd5ΔE1ΔE3 se utilizaron como plásmidos cooperadores y pFRT/lacZeo se utilizó como un ADN de relleno testigo en las mismas cantidades, tal y como se indica en la figura. Las barras representan la media de tres replicados con desviaciones estándar relativas. Los valores encima de las barras de datos indican el número de veces de cambios en la producción de títulos de virus, obtenidos en presencia de plásmidos cooperadores adenovíricos en comparación con el testigo negativo. TU, unidad de transducción.

Figura 2: La producción de parvovirus recombinantes se incrementa con el plásmido pXX6 obtenido a partir de adenovirus

Células HEK 293T, sembradas en frascos de 175 cm², se transfectaron con prec.PV-GFP, pCMV/VP con o sin pXX6. Tres días después de la infección, se recogieron las células y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón vTE (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], EDTA 0,5 mM) y se lisaron mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Los extractos de virus crudo se utilizaron en diferentes ensayos para determinar los títulos de virus. Las barras representan las medias de diferentes replicados, con desviaciones estándar relativas. Los valores encima de las barras de datos muestran el número de veces de cambios en la producción de virus en presencia o ausencia de pXX6. Los títulos de virus se proporcionan en Vg/ml, tal como se midió a través de PCR cuantitativa específica de parvovirus (Q-PCR), TU/ml como resultado de un ensayo de transducción o RU/ml a través de un ensayo de hibridación específico de parvovirus. Los parvovirus competentes para la replicación producidos se midieron mediante ensayo de placas y los resultados se expresaron como una proporción de PFU producidas frente a TU producidas. Vg, genoma vírico, TU, unidad de transducción, RU, unidad de replicación; PFU, unidad formadora de placas.

Figura 3: Plásmidos cooperadores adenovíricos o virus Ad-GFP recombinantes mejoran la producción de parvovirus recombinantes que albergan un transgén largo

Células HEK 293T, sembradas en placas de 6 cm, se transfectaron con una mezcla de prec.PV-luciferasa y pCMV/VP, con la adición de pXX6 o pVAE2AE4-5 como plásmidos cooperadores, o sin ningún ADN adicional (-). Paralelamente, 1 h después de la transfección de los plásmidos de parvovirus, un conjunto de placas se infectó con Ad5ΔE1ΔE3-CMV/GFP recombinante purificado (Ad-GFP) con la MOI indicada (GFU/célula). Tres días más tarde, las células se trataron tal y como se indica en la leyenda de la Fig. 1. Extractos de virus crudo se utilizaron para infectar células NBK y, 48 h más tarde, se usaron extractos totales de NBK para ensayos con luciferasa, tal y como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Las barras representan la media de tres replicados con sus desviaciones estándar relativas. Los valores encima de las barras de datos muestran el número de veces de cambios en la producción de luciferasa, en comparación con el testigo negativo. GFU: unidad fluorescente verde. RLU, unidad de luciferasa relativa.

Figura 4: pXX6 acelera la producción de parvovirus recombinantes

Células HEK 293T, sembradas en placas de 10 cm, se transfectaron con prec.PV-GFP, pCMV/VP con o sin plásmido pXX6. Después de la transfección, las células se recogieron en su medio en los momentos indicados. La mitad de

la cosecha fue sometida a lisis tal y como se ha descrito anteriormente y se utilizó para ensayos de transducción, mientras que la otra mitad se usó para análisis de transferencia Southern.

5 **A:** Resultado del ensayo de transducción. Las barras representan los valores medios de tres replicados con sus desviaciones estándar relativas. Los valores encima de las barras de datos muestran el número de veces de cambios en la producción de títulos de virus en presencia de pXX6, en comparación con su ausencia.

B: Análisis de transferencia Southern. El ADN vírico se extrajo a partir de lisados celulares de ADN crudo, se separó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nailon. La membrana se incubó con una sonda de ADN marcada con [³²P] específica de parvovirus y se sometió a autoradiografía. Neg. testigo negativo (células no transfectadas).

10 **C:** Células testigo transfectadas solo con prec.PV-GFP y recogidas después de 72 h; TU, unidad de transducción; mRF, forma replicativa monómera; dRF, forma replicativa dímera.

Figura 5: pXX6 aumenta la producción de parvovirus recombinantes en un protocolo basado en transfección/infección

15 Células HEK 293T, sembradas en placas de 6 cm, fueron transfectadas con pCMV/VP, +/- pXX6 y después se infectaron con rec.PV-GFP. Tres días más tarde, se recogieron las células en su medio y se lisaron mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Extractos de virus crudo se utilizaron para determinar los títulos de virus mediante un ensayo de transducción, tal y como se ha descrito anteriormente. Se muestran las cantidades totales de entrada y salida de virus. Los valores encima de las barras de datos muestran las tasas de amplificación del virus de entrada durante la producción. TU, unidad de transducción.

20 Figura 6: Producción de diferentes parvovirus recombinantes utilizando virus cooperador Ad-VP recombinante

25 **A:** Células NBK, sembradas en placas de 6 pocillos, se infectaron con virus cooperador Ad-VP purificado con MOI 10 (unidad de Ad-X/célula), y luego se hiperinfectaron con el siguiente parvovirus recombinante: hH-1-GFP, H-1-GFP, MVM-GFP o Chi-hH-1-GFP [23] con una MOI de 0,1 GFU/célula o 0,5 para H-1-GFP. Un día después de la infección, el medio se cambió y tres días más tarde, las células se recogieron en su medio y se lisaron mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Extractos de virus crudo se utilizaron para determinar los títulos de virus mediante un ensayo de transducción. Las barras representan los valores medios de tres replicados (duplicados para H-1-GFP) con sus desviaciones estándar relativas. Los valores encima de las barras de datos muestran el número de veces de cambios de los títulos de virus producidos con respecto al virus utilizado como entrada. Los títulos de virus se proporcionan como GFU/ml.

30 **B:** Relación entre los parvovirus competentes para la replicación (RCV) producidos en presencia (+) o ausencia (-) de condiciones de cooperador Ad-VP. Los títulos de RCV se midieron mediante ensayo de placas en células NBK y se expresaron en PFU/ml. GFU, unidad fluorescente verde; PFU, unidad formadora de placas.

Figura 7: Mapa esquemático del plásmido cooperador Ad-VP

35 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un virus cooperador obtenido a partir de adenovirus que comprende las siguientes secuencias de ADN adenovíricas:

(a) un gen E2a;

(b) un gen E4 (orf6);

(c) un gen de ARN VAI; y

(d) la unidad génica de la cápside VP de parvovirus de un parvovirus con replicación autónoma.

40 El virus cooperador obtenido a partir de adenovirus contiene todas las secuencias de ADN de un virus cooperador que son necesarias para la formación de parvovirus, es decir, preferiblemente solo las secuencias de ADN (a) a (d). Tales secuencias de ADN se obtienen preferiblemente a partir de adenovirus 5. Secuencias de ADN del vector cooperador adecuado como material de partida para la preparación de los parvovirus recombinantes, se describen en el documento de solicitud de patente alemana 196 44 500.0-41, es decir, los genes de Ad5, E2A, E4 y VA se pueden obtener a partir del plásmido pDG y los que están controlados por el promotor original respectivo o por un promotor heterólogo.

45 La expresión "virus cooperador obtenido a partir de adenovirus" utilizada en esta memoria, no solo se relaciona con aquellos virus que tienen los genes originales enumerados en (a) a (d), sino que también se relaciona con virus que tienen genes modificados, que incluyen delecciones o inserciones de nucleótidos, por ejemplo, pero que todavía codifican proteínas que tienen la función biológica deseada. Por medio de métodos comunes, una persona experta en la técnica puede determinar si un gen modificado todavía codifica un producto que tiene la función biológica deseada. La persona experta en la técnica también conoce fuentes de los genes individuales que son característicos del virus de acuerdo con la invención. Los métodos generales conocidos en este campo se pueden utilizar para la construc-

ción de los virus que contienen las secuencias de ADN anteriores y, en su caso, otras secuencias. Estos métodos comprenden, por ejemplo, técnicas de recombinación *in vitro*, métodos sintéticos y métodos de recombinación *in vivo*, tal y como se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989), por ejemplo.

- 5 La expresión "unidad génica de la cápside VP de parvovirus" utilizada en esta memoria, se refiere a los genes que codifican VP1, VP2 y VP3, siendo VP3 un producto de la escisión de VP2.

Preferiblemente, la unidad génica de la cápside VP de parvovirus está bajo el control de un promotor constitutivo o inducible, activo en mamíferos, y (c) una señal de poliadenilación. La expresión "un promotor constitutivo o inducible activo en mamíferos" utilizada en esta memoria comprende todos los promotores que permiten en mamíferos la transcripción de la secuencia de ADN deseada, sobre todo los que producen una expresión fuerte, preferiblemente promotores heterólogos. Los promotores adecuados son conocidos por la persona experta en la técnica y comprenden, por ejemplo, los promotores constitutivos de CMV y los promotores de citoqueratina K14 o los promotores de MMTV inducibles (virus de tumor mamario de ratón), metalotioneína y sistemas de promotores controlables con tetraciclina (Tet-on/Tet-off).

15 Además, el virus cooperador obtenido a partir de adenovirus o el plásmido del vector de parvovirus recombinante pueden contener un gen que codifica un marcador fenotípico detectable, para demostrar la introducción con éxito en la célula diana. Preferiblemente, la proteína marcadora es una proteína fluorescente. Esta confirma fácilmente una transfección de la célula diana deseada. Ejemplos de genes adecuados que codifican proteínas fluorescentes son los genes rfp-(rojo), gfp-(verde), cfp-(cian) e yfp-(amarillo), prefiriéndose rfp-(rojo) (Dsred-cDNA; Clontech). Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la expresión de la proteína marcadora son el promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor de CMV (citomegalovirus) y los promotores tk de HSV (virus del herpes simple), prefiriéndose el promotor de RSV. El casete de expresión (promotor/gen marcador/sitio de poliadenilación) se inserta en el(los) vector(es) en un sitio adecuado que una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente.

25 La expresión "parvovirus autónomo" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a parvovirus con replicación autónoma. Los parvovirus autónomos incluyen miembros de los géneros Parvovirus, Eritrovirus, Densovirus, Iteravirus y ContraVirus. Parvovirus autónomos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, virus H-1, virus diminuto de ratón (MVM), parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus de pollo, virus de la panleucopenia felina, parvovirus felino, parvovirus de ganso y virus B19. Otros parvovirus autónomos son conocidos por los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, B. N. Fields et al., *Virology*, volumen 2, capítulo 69 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers).

30 Preferiblemente, el "vector de parvovirus recombinante que carece de los genes VP1 y VP2" tiene la siguiente estructura: TR - rep (NS1/NS2) - (opcional: transgén) - TR [TR; Repetición Terminal].

La presente solicitud describe un método para preparar un parvovirus recombinante caracterizado porque

35 (i) células de mamífero se transfectan con (a) un vector de parvovirus recombinante que carece de los genes VP1 y VP2 (pero que conserva la secuencia que codifica NS1/2, preferiblemente bajo el control del promotor P4 parvovírico), (b) un vector que contiene los genes que codifican las proteínas de la cápside de parvovirus, y (c) un virus cooperador obtenido a partir de adenovirus que comprende las secuencias de ADN adenovíricas procedentes del gen E2a, el gen E4(orf6) y un gen de ARN VAI; y

(ii) el parvovirus recombinante se aísla a partir de las células de mamífero o del medio después de cultivar las células.

40 El vector cooperador puede ser cualquier vector conocido en la técnica. Vectores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores de ADN desnudo, cromosomas artificiales bacterianos (BACs), cromosomas artificiales de levadura (YACs) y vectores víricos. Los vectores víricos preferidos incluyen vectores de VAA, adenovirus, herpesvirus, virus de Epstein-Barr (VEB), baculovirus y retrovirus (por ejemplo, lentivirus), más preferiblemente, vectores de adenovirus y de herpesvirus.

45 Las partículas de parvovirus recombinantes se producen mediante la introducción de los vectores anteriores (a) a (c) en una célula permisiva, tal como se entiende este término en la técnica (por ejemplo, una célula "permisiva" se puede infectar o transducir con el virus). Se puede emplear cualquier método para introducir los vectores en la célula permisiva, incluyendo, pero no limitado a, electroporación, transfección, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, liposomas catiónicos o aniónicos y liposomas en combinación con una señal de localización nuclear.

50 Cualquier célula de mamífero permisiva adecuada, conocida en la técnica, se puede emplear para producir los parvovirus. También se prefieren líneas celulares de encapsidación transcomplementarias que proporcionan funciones eliminadas de un virus cooperador defectuoso para la replicación, por ejemplo, células 293, células 911, células HeLa-E1, células 633 u otras células E1a transcomplementarias.

En una realización preferida; las células de mamífero pueden ser células HEK 293 o células HEK 293T.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un parvovirus autónomo recombinante

5 caracterizado porque (i) se infectan células de mamífero con (a) un parvovirus recombinante que carece de los genes VP1 y VP2 (pero que conserva la secuencia que codifica NS1/2, preferiblemente bajo el control del promotor P4 parvovírico), y (b) el plásmido cooperador obtenido a partir de adenovirus de la invención, y (ii) se aísla el parvovirus autónomo recombinante que encapsida los genes VP1 y VP2, a partir de las células de mamífero o del medio, después de cultivar las células.

10 Con el nuevo virus cooperador obtenido a partir de adenovirus de la invención (virus cooperador Ad-VP), se puede utilizar un protocolo basado solo en la infección, evitando la necesidad de una transfección. Esto permitiría llevar a cabo la producción del parvovirus en líneas celulares que son difíciles de transfectar, pero que son más permisivas para la replicación de parvovirus que HEK 293T, por ejemplo, células NBK. De acuerdo con ello, en una realización preferida de este método de la invención, la línea celular de mamífero es NBK. Otros ejemplos de líneas celulares que se podrían utilizar en esta solicitud, son NB-E, SiHa o A9.

Preferiblemente, el parvovirus recombinante se obtiene a partir de parvovirus H-1 o MVM (virus diminuto de ratón).

En una realización preferida de los métodos de la invención, en el vector de parvovirus recombinante los genes VP1 y VP2 se sustituyen por un transgén, es decir, un gen heterólogo que está flanqueado por al menos una TR.

15 Preferiblemente, el transgén está bajo el control del promotor P38 autólogo del virus H-1PV o del virus diminuto de ratón de parvovirus autónomo que está fuertemente transactivado por la proteína no estructural NS1, una proteína que se une al ADN, específica de secuencia.

Preferiblemente, el transgén es un gen que codifica

(a) una proteína marcadora, por ejemplo, una proteína descrita anteriormente; o

20 (b) un gen terapéutico, por ejemplo, un polipéptido citotóxico, una citocina o quimiocina o un polipéptido inmunógeno (para uso como vacuna); supresores tumorales, o moléculas de ARN interferente y/o casetes que expresan ARNi (oligonucleótidos antisentido, siARNs, shARNs, miARNs, etc.).

La presente solicitud también se refiere a un parvovirus recombinante obtenible por un método de la invención, así como a una célula que contiene tal parvovirus recombinante.

25 Por último, la presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que contiene el parvovirus recombinante obtenido por el método de la invención y a un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como al uso de un parvovirus recombinante de la invención para emplear en terapia génica o a un método para tratar un tumor. Los vehículos adecuados y la formulación de tales medicamentos son conocidos por la persona experta en la técnica. Los vehículos adecuados comprenden, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, por ejemplo, emulsiones de aceite/agua, agentes humectantes, soluciones estériles, etc. El tipo de vehículo depende de la forma como se administra el vector cooperador y el parvovirus recombinante de acuerdo con la invención. Una dosificación adecuada es determinada por el médico responsable y depende de varios factores, por ejemplo, la edad del paciente, el sexo y el peso, la gravedad de la enfermedad, el tipo de administración, etc.

35 Una terapia génica se puede llevar a cabo con partículas de parvovirus recombinante, preparadas con un vector cooperador de acuerdo con la invención, en donde las células se transducen/infectan mediante incubación con las partículas víricas. Las células pueden estar presentes en un organismo, en donde las células que se van a infectar son accesibles mediante inyección con aguja, inyección a chorro o pistola de partículas. Por otro lado, las células que se van a transducir también se pueden aislar a partir de un organismo, se infectan fuera del organismo, y a continuación se devuelven de nuevo al organismo. Tales células se denominan células autólogas. Por otra parte, con respecto al organismo también es posible usar células alogénicas para la transducción. A este respecto, es favorable que estas células pertenezcan a un tipo de HLA correspondiente al organismo. La persona experta en la técnica conoce métodos para proporcionar células con un cierto tipo de HLA. El parvovirus recombinante (partículas) de acuerdo con la descripción, también es útil para una aplicación complementaria a la quimioterapia, es decir, a la terapia tumoral.

45 El uso de un cooperador Ad-VP no se limita a la producción de parvovirus recombinantes. También se puede utilizar en combinación con recPV en la terapia contra el cáncer. Esto permitiría una segunda ronda de replicación de recPV en el sitio del tumor, incrementando la eficacia terapéutica del parvovirus. Además, un segundo transgén contra el cáncer se puede insertar en el cooperador Ad-VP aumentando aún más el potencial terapéutico del cotratamiento.

50 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición (farmacéutica) que comprende un virus cooperador de acuerdo con la invención y un parvovirus recombinante. Preferiblemente, ambos componentes contienen transgenes (diferentes) que codifican polipéptidos terapéuticos, por ejemplo, polipéptidos anticancerígenos.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

(A) Células

Las células HEK 293T y NB324K (NBK) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o medio de Eagle modificado (MEM), respectivamente, suplementado con 10% (DMEM) o 5% de suero bovino fetal (MEM), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ y 92% de humedad.

(B) Plásmidos y virus

pH-1-EGFP se obtuvo subclonando el gen EGFP, procedente de pChi-hH-1-EGFP [23] en el psr19-H-1-Δ800 [2] empleando los sitios de restricción *SacI/NotI*. pH-1-Luc es el pH1Δ1600luc descrito en [2].

El virus Ad-GFP purificado era un amable regalo del Dr. Laurent Mailly (Institut de Virologie, Inserm U748, Estrasburgo, Francia) y se valoró sobre células HEK 293T en unidad de fluorescencia verde por ml [GFU/ml] basándose en que una GFU es capaz de volver verde una célula 293T en 48 h.

El plásmido cooperador pAd-VP (un mapa esquemático de este vector se proporciona en la Figura 7) se generó utilizando el Sistema de vector adenovirico AdEasy[®] (Agilent technologies, Stratagene products, Waldbronn, Alemania) mediante recombinación de pAd5ΔE1ΔE3 [24] y los vectores pShuttle-CMV/VP (H-1) en bacterias BJ5183, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. pShuttle-CMV/VP(H1) se generó subclonando la región VP procedente del pcDNA5-CMV/VP(H-1) empleando la digestión con PmeI y religándola en un vector pShuttle-CMV digerido con *EcoRV* (Agilent technologies, Stratagene products). pcDNA5-CMV/VP(H-1) se generó subclonando la región VP procedente de pVP-sub en pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), utilizando los sitios de restricción *BamHI/XhoI*. pVP-sub se construyó insertando primero un sitio de restricción *HpaI* en el polienlazador del plásmido pBluescript SK (pBSK, Stratagene), y luego subclonándolo en el fragmento 2647-4680 nt del genoma de H-1PV, que contiene la unidad génica VP, procedente del plásmido p(BK)CMV/VP(H-1) [2], utilizando los sitios de restricción *HindIII/HpaI*.

El virus cooperador Ad-VP se produjo clásicamente con 3 rondas de producción en HEK 293T, a continuación se purificó a través de un gradiente doble de CsCl y se valoró utilizando el kit Adeno-X[®] Rapid Titer (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia).

(C) Transfección

Para los experimentos mostrados en las Figs. 1, 3, 4 y 5, las transfecciones se llevaron a cabo utilizando Fugene HD (Roche Diagnostics & Applied Sciences, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Los plásmidos se diluyeron en medio exento de suero con una concentración final de 20 ng/µl. A continuación, se añadió Fugene HD con una proporción de 1:2,5 (µg de ADN:µl de Fugene) y la mezcla se incubó a TA durante 30 - 60 min. Posteriormente, la mezcla se añadió gota a gota a las células. En la Fig. 2, se llevó a cabo la transfección utilizando polietilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Múnich, Alemania), tal y como se describe en [25].

Para el formato de placa de 6 cm, se sembraron 8 x 10⁵ células 293T por placa. Un día después, las células se transfectaron con las siguientes cantidades, solo cuando se mencionan: 1,2 µg de vector de parvovirus recombinante, 2,4 µg de pCMV/VP, 3 µg de pXX6, 5,2 µg de pAd5ΔE1ΔE3 y 3 o 5,2 µg de pFRT/lacZeo (Invitrogen), que se utilizaba como ADN de relleno testigo. En un formato de placas de 10 cm y un frasco de 175 cm², el número de células y las cantidades de plásmido se ajustaron proporcionalmente y se multiplicaron por factores de 2,5 y 6, respectivamente.

(D) Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados para el análisis de transferencia Western: antisuero SP8 anti-NS1 policlonal (un amable regalo de la Dra. Nathalie Salomé, DKFZ, Heidelberg, Alemania), anti-GFP policlonal de conejo (Santa Cruz, Heidelberg, Alemania) y anti-actina monoclonal de ratón (clon C4, MP Biomedicals, Illkirch, Francia).

(E) Ensayo de luciferasa

Se utilizó el Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega, Mannheim, Alemania). Se sembraron 2,5 x 10⁴ células NBK por pocillo en placas de 48 pocillos y se infectaron al día siguiente con 0,1 ml de diferentes diluciones de extractos de virus crudo. Dos días después de la infección, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 100 µl de 1x tampón de lisis pasivo. Se mezclaron 10 µl de los lisados celulares con 50 µl de sustrato de luciferasa y la luminiscencia resultante se midió durante 10 segundos, usando el luminómetro Fluoroskan (Ascent FL, Thermo Labsystems, Dreieich, Alemania).

(F) Valoración del virus**Ensayo de transducción**

Se sembraron 2,5 x 10⁴ células NBK por pocillo en placas de 48 pocillos y se infectaron al día siguiente con 0,1 ml

de diferentes diluciones de extractos de virus crudo. Tres días después de la infección, se hizo un recuento de las células positivas para GFP, usando un microscopio de fluorescencia. El título de virus en unidad de transducción por ml [TU/ml] se calculó de la siguiente manera: número de células verdes x factor de dilución x 10.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR)

5 Extractos de virus crudo se digirieron con nucleasa Benzonasa[®] de grado ultrapuro (Sigma) (50 U/ml, 37°C durante 30 min) para eliminar el ADN genómico y los plásmidos transfectados restantes. Para liberar el ADN vírico de los virus, se lisaron 10 µl de cada muestra, en un total de 40 µl de tampón de lisis alcalina (NaOH 1 M en tampón TE) a 56°C durante 30 min. La lisis se detuvo mediante la adición de 960 µl de HCl 40 mM.

10 La cuantificación del ADN vírico se llevó a cabo mediante qPCR en tiempo real con una sonda TaqMan[®] específica de NS1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), utilizando un termociclador 7700 ABI Prism (Applied Biosystems) y se analizó por medio del programa informático SDS 2.1 (Applied Biosystems). Brevemente, el ADN de parvovirus se amplificó y se detectó usando una sonda TaqMan[®] marcada con 5'FAM-MGB3' específica de NS1. Un plásmido que contenía la secuencia de NS1 se diluyó en serie en el intervalo de 10¹-10⁸ copias/reacción y se utilizó para normalizar la qPCR. Mezclas individuales de la reacción (20 µl) consistían en 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems), sonda NS1-TaqMan[®] marcada 0,3 µM, 0,3 µM de cada cebador y 3 µl de molde.

Ensayo de hibridación de ADN vírico

20 Las células NBK se sembraron en placas de 6 cm con una densidad de 5 x 10⁵ células por placa. Al día siguiente, extractos de virus crudo se diluyeron en serie de 10⁻⁴ - 10⁻⁷ (en etapas de 1:10), a continuación se utilizaron para infectar las células NBK en un volumen total de 400 µl. Después de 1 h de incubación a 37°C y agitación de las placas cada 10 min, se añadieron 5 ml de medio a cada placa. Tres días después de la infección, las capas de células se lavaron con PBS y se aplicaron filtros de nitrocelulosa de 25 mm de diámetro (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) a la parte superior de las células y se humedecieron con 100 µl de PBS. Los filtros se pusieron posteriormente boca abajo sobre papel Whatman saturado con tampón de desnaturalización (NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M). Después de 5 min, los filtros se transfirieron a papel Whatman saturado con tampón neutralizante (Tris/HCl 0,5 M (pH 7,2), NaCl 1,5 M y EDTA 1 mM). Cinco minutos más tarde, el ADN se fijó mediante secado de los filtros a 80°C durante 2 h. La hibridación se realizó en 3 x SSC (1 x SSC es NaCl 0,15 M más citrato de sodio 0,015 M), 1% de SDS, EDTA 5 mM, 10x solución de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón a 65°C durante 1 h. La hibridación se realizó mediante la adición de la sonda radiactiva correspondiente al fragmento *EcoRV* (nt 385) - *EcoRI* (nt 1084) del plásmido pMVM, purificado por electroforesis en gel de agarosa, y se marcó con [³²P] dCTP utilizando el sistema de etiquetado de ADN Megaprime (GE Healthcare, Múnich, Alemania). Después de incubar a 65°C durante la noche, los filtros se lavaron con tampón de lavado 1 (3 x SSC (pH 7), 1% de SDS) a 65°C durante 30 min y luego con tampón de lavado 2 (0,3 x SSC (pH 7)) a 65°C durante 30 min. Posteriormente, los filtros se colocaron sobre papel Whatman, se envolvieron en una lámina de plástico y se expusieron a una película radiográfica a -80°C durante la noche. Las células infectadas representan puntos negros en la película debido al ADN vírico marcado radiactivamente. Los títulos de virus en unidades de replicación (RU) por ml [RU/ml] se calcularon de la siguiente manera: número de puntos negros x factor de dilución x 7,5.

Ensayo de placas

40 Las células NBK cultivadas en monocapa se infectaron con diluciones seriadas de extractos de virus crudo durante 1 h, seguido por la sustitución del inóculo por un recubrimiento con agar Bacto[®] (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania) (0,68% en Medio Esencial Mínimo [+] L-glutamina) (Gibco, Invitrogen), 5% de FBS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina. Cinco días después de la infección, las células vivas se tiñeron durante 18 h mediante la adición de agar Bacto[®] (0,85%) que contenía rojo neutro (0,2 mg/ml) diluido en PBS. Se hizo un recuento de las placas y los títulos se expresaron como unidades formadoras de placa (PFU) por ml.

(G) Extracción de ADN y transferencia Southern

45 Para los análisis de los productos intermedios de ADN vírico producidos durante la producción de virus recombinante, se prepararon extractos celulares en una mezcla (1:1) de tampón vTE (Tris-HCl 10 mM [pH 8,7], EDTA 1 mM) y 2x tampón Hirt (Tris 20 mM [pH 7,4], EDTA 20 mM, 1,2% de SDS) y, a continuación se digirieron con proteinasa K (400 µg/ml) durante 18 h a 46°C bajo una rotación de 60 vueltas por min. A continuación, el ADN se rompió por cizallamiento mediante varios pases a través de agujas de 0,5 µm y 0,4 µm, se sometió a extracción con fenol-cloroformo y finalmente a digestión con DpnI para eliminar plásmidos bacterianos que albergaban genomas víricos.

50 Las muestras de ADN (2 µg) se fraccionaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Después de la desnaturalización y la neutralización del ADN en el gel, el ADN se transfirió a una membrana Hybond-N de nailon (GE Healthcare) a través de un procedimiento de transferencia Southern clásica, a continuación, se reticuló con UV a la membrana. Los productos intermedios víricos presentes en la membrana se mostraron a continuación con el mismo procedimiento utilizado para los filtros del ensayo de hibridación de ADN vírico.

Ejemplo 2

Genes de adenovirus aumentan la producción de parvovirus recombinantes

En este estudio, se investigó si los genes adenovíricos son capaces de incrementar la producción de parvovirus recombinantes. Para este fin, células HEK 293T se cotransfectaron de forma transitoria con un plásmido de parvovirus recombinante que era portador del transgén GFP (prec.PV-GFP), un plásmido que codifica las proteínas de la cápside de parvovirus H-1 (pCMV/VP) y el plásmido obtenido a partir de adenovirus 5, pXX6. pXX6 contiene E2a, E4(orf6) y los genes adenovíricos del ARN VAI y es suficiente para promover la producción de VAA [17, 18].

Tres días después de la transfección, las células se lisaron y se determinó la producción vírica de rec.PV-GFP mediante un ensayo de transducción, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1. De este modo, se utilizaron extractos celulares procedentes de estas células productoras de virus para inocular células NBK de nuevo aporte. Después de 48 horas, las células NBK positivas para GFP se controlaron mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 1A). Los extractos de células transfectadas con pXX6 y plásmidos de parvovirus produjeron un número mucho mayor de células verdes positivas, que comparando con células transfectadas solo con plásmidos de parvovirus, lo que demuestra que los lisados procedentes de estas últimas contenían menores cantidades de parvovirus recombinante. El análisis de transferencia Western confirmó niveles más elevados de proteína GFP, junto con niveles más altos de NS1 de parvovirus, en células NBK infectadas con extractos obtenidos en la condición de pXX6 (Fig. 1B).

Para investigar si la producción de parvovirus recombinantes se puede mejorar aún más con la presencia de elementos adenovíricos adicionales, se compararon los efectos de pXX6 y un vector pAd5ΔE1ΔE3 más completo en el refuerzo de la producción de parvovirus. Tres días después de la transfección, se realizaron ensayos de transducción vírica tal y como se han descrito anteriormente. Tal y como se muestra en la Fig. 1C, tanto pAd5ΔE1ΔE3 como pXX6 incrementan significativamente la producción de virus en más de 10 veces, en comparación con el testigo negativo o las condiciones de relleno. Los cooperadores de adenovirus permitían alcanzar 10^6 unidades de transducción verdes (TU) por ml, que se correspondía a un promedio de 5 TU por célula productora sembrada. Tanto pAd5ΔE1ΔE3 como pXX6 produjeron un incremento comparable en la producción de parvovirus recombinante en estas condiciones experimentales, lo que indica que el material genético contenido en pXX6 es suficiente para inducir este efecto.

Para cuantificar cuidadosamente las cantidades de parvovirus recombinante producidas con la ayuda de pXX6, las células HEK 293T se sembraron en frascos de 175 cm², después se cotransfectaron con prec.PV-GFP, pCMV/VP y con pXX6 o sin pXX6. Tres días después de la transfección, las células se lisaron en tampón vTE (véase la leyenda de la Fig. 2). Los virus producidos, contenidos en los lisados celulares, se cuantificaron directamente empleando una PCR cuantitativa específica de parvovirus que mide la concentración de genoma de parvovirus encapsidado, expresado como genoma vírico (Vg) por ml. Además, los lisados celulares se utilizaron para infectar células indicadoras NBK y los títulos de virus se cuantificaron mediante i) un ensayo de transducción, en el que se contaron las células positivas para GFP y la producción de virus expresada como Unidad de Transducción (TU) por ml, e ii) un ensayo de hibridación específico de parvovirus en el que se detectó la cantidad de células que favorecían la replicación del ADN vírico usando una sonda de NS radiomarcado. Las concentraciones de los virus producidos se expresaron entonces como Unidad de Replicación (RU) por ml. La Fig. 2 muestra que todos los ensayos diferentes confirmaban el aumento significativo de la producción vírica en presencia del plásmido pXX6.

A continuación, se investigó si pXX6 podría dar lugar a una mayor producción concomitante de parvovirus competentes para la replicación (RCV), no deseados. Los RCVs se midieron usando un ensayo de placas clásico con parvovirus en células NBK; la relación de PFU producidas por TU no se vio afectada por pXX6 (Fig. 2, panel derecho) mostrando que pXX6 no incrementa la productividad de RCV, por lo tanto, conserva la calidad de los virus recombinantes producidos.

Para confirmar los resultados que se muestran en la Fig. 1 y 2, se llevó a cabo un experimento similar utilizando otro parvovirus recombinante, que albergaba un transgén informador más largo, prec.PV-luciferasa (prec.PV-Luc) (una inserción de 1656 nt en lugar de 731 nt en el caso del transgén de GFP usado previamente). La producción de parvovirus que albergan transgenes grandes (más de 800 nt) se sabe que es mucho menos eficaz que la producción con los transgenes más cortos (hasta 800 nt) [2]. La capacidad de un plásmido cooperador adenovírico diferente, pVAE2AE4-5, para incrementar la producción de parvovirus también se sometió a ensayo. Este vector es portador de los mismos genes adenovíricos que pXX6 en una estructura principal de plásmido diferente [26]. Las células se cotransfectaron con prec.PV-Luc, pCMV/VP y con uno de los plásmidos cooperadores de adenovirus, pXX6 o pVAE2AE4-5, o se infectaron con virus Ad5ΔE1ΔE3-CMV/GFP (Ad-GFP) (con MOIs en el intervalo desde 0,1 a 5 GFU/célula (véase la Fig. 3)). Tres días después de la transfección/infección, se estimó el rendimiento de la producción de parvovirus recombinantes utilizando un ensayo de transducción con luciferasa.

Los resultados obtenidos en la Fig. 3 confirman el efecto de refuerzo de pXX6 sobre la producción de parvovirus recombinantes (aproximadamente 24 veces), generalizando los efectos positivos de este vector a otros parvovirus que son portadores de transgenes diferentes y más largos. pVAE2AE4-5 aumentaba la producción de parvovirus en un grado similar, confirmando que los elementos responsables del incremento observado se encuentran dentro de las secuencias adenovíricas comunes de pXX6 y pVAE2AE4-5 y no en la estructura principal del plásmido. Como la infección con adenovirus recombinante también incrementaba la producción de parvovirus, los efectos cooperadores observados deben ser independientes del método elegido para la introducción de elementos genéticos adenovíricos

(mediante transfección o infección) dentro de las células productoras. El mayor incremento de la producción de rec.PV-Luc, (aproximadamente 30 veces), se obtuvo utilizando Ad-GFP con MOI 1. En estas condiciones, se observó un 100% de transducción de GFP adenovírica en las células productoras, 2 días después de la infección. Cuando se utilizó Ad-GFP con MOIs 2 y 5, se observó una toxicidad celular (datos no mostrados), que explica porqué, en estas condiciones, se obtuvieron títulos de parvovirus inferiores. El aumento de la producción observada usando adenovirus fue ligeramente más alto que con plásmidos cooperadores transfectados, debido probablemente a la mayor tasa de transducción adenovírica. En conjunto, estos resultados muestran que la presencia de elementos genómicos adenovíricos incrementa la producción de parvovirus recombinantes.

Ejemplo 3

10 pXX6 acelera la producción de parvovirus recombinantes

En un experimento de evolución temporal se investigó si pXX6 afecta a la cinética de producción de virus. Las células se cotransfectaron primero con prec.PV-GFP, pCMV/VP, con o sin pXX6, y la producción vírica se evaluó a las 12, 24, 48 y 72 h después de la transfección.

15 Al igual que antes, la presencia de pXX6 mejora en gran medida la producción de parvovirus recombinantes (Fig. 4). Este efecto se puede observar después de 24 h (9,2 veces), pero se hace más evidente a las 48 h (30,4 veces), cuando el rendimiento de la producción es máximo ($1,5 \times 10^6$ TU/ml). La producción de virus en ausencia de pXX6 era mucho menos eficaz (título máximo: $1,3 \times 10^5$ GFU/ml). Vale la pena mencionar que los parvovirus recombinantes se cosechan generalmente después de 72 h de producción.

20 Por lo tanto, el uso de elementos adenovíricos en la producción de parvovirus recombinantes incrementa los títulos de virus y disminuye el tiempo de producción en 24 h. Una transferencia Southern (Fig. 6B), confirmó un aumento en la cantidad de ADN vírico producido en presencia de pXX6, 48 y 72 h después de la transfección. Formas replicativas monómeras de ADN de parvovirus (mRF) se enriquecieron en gran medida en condiciones de pXX6, que ya eran detectables a las 24 horas y mejoraron fuertemente a las 48 h y 72 h. Formas replicativas dímeras de ADN (dRF) solo se detectaron claramente en presencia de pXX6 a las 48 y 72 h de tiempos de producción. Por lo tanto, 25 pXX6 no solo aumenta, sino que también acelera la replicación del ADN vírico.

Ejemplo 4

pXX6 también incrementa la producción de parvovirus recombinante en un protocolo basado en la transfección/infección

30 Los parvovirus recombinantes se producen de forma rutinaria cotransfectando las células productoras con dos plásmidos: uno que codifica las proteínas VP de la cápside y un segundo que contiene el genoma restante de parvovirus que alberga el transgén de interés. Como la infección vírica es un método de entrega de genes mejor que la transfección, intentamos reemplazar tanto como fuera posible en nuestro protocolo las etapas de transfección por infección. Una posibilidad sería amplificar los parvovirus recombinantes mediante la infección de células permisivas que han sido transfectadas con el plásmido que contiene VP. En este caso, la transfección se limitaría solo al plásmido VP, mientras que el genoma del parvovirus recombinante se entregaría mediante infección vírica. Sin embargo, experimentos anteriores en el laboratorio no pudieron producir parvovirus recombinantes utilizando este método. De cara a las funciones cooperadoras de pXX6, se investigó si la introducción de pXX6 podría recuperar, en este caso, la producción de parvovirus recombinantes. Las células se transfectaron con pCMV/VP junto con pXX6 o sin pXX6, y después se infectaron con rec.PV-GFP. Los resultados mostraron una amplificación significativa de la dosis vírica utilizada como inóculo (alrededor de 17 veces) solo en presencia del plásmido pXX6 (Fig. 5, y datos no presentados). Estos resultados muestran que pXX6 no solo refuerza la producción de parvovirus recombinantes en un protocolo que se basa únicamente en la transfección, sino también cuando se emplean partículas infecciosas de parvovirus como fuente de ADN vírico recombinante. Esto apoya el posible uso de pXX6 en una segunda ronda de amplificación de los parvovirus recombinantes.

45 Ejemplo 5

Producción de parvovirus recombinantes utilizando un virus cooperador Ad-VP recombinante

Para evitar la transfección del plásmido VP y permitir la amplificación de los virus únicamente a través de la coinfección con un virus cooperador, se sometió a ensayo si era posible producir parvovirus recombinantes utilizando un adenovirus que albergaba no solamente los genes de Ad necesarios para ayudar en la producción de parvovirus, sino también la unidad génica de la cápside VP. El gen de VP fue clonado en pAd5ΔE1ΔE3 [24], mediante recombinación de pAd5ΔE1ΔE3 y pShuttle-CMV/VP, generando la estructura artificial cooperadora pAd-VP. Un virus cooperador Ad-VP se producía clásicamente en HEK 293T. La forma y títulos del cooperador Ad-VP eran similares a los del virus Ad5ΔE1ΔE3, utilizado como testigo (datos no mostrados).

55 Con el nuevo virus cooperador Ad-VP se puede utilizar un protocolo basado solo en la infección, evitando la necesidad de transfección. Esto permite la posibilidad de llevar a cabo la producción en líneas celulares que son difíciles de transfectar, pero que son más permisivas para la replicación de parvovirus que las células HEK 293T, por ejem-

plo, células NBK.

Las células NBK se sembraron en placas de 6 pocillos y se infectaron al día siguiente con el virus cooperador Ad-VP purificado y de forma concomitante con uno de los siguientes parvovirus recombinantes: hH-1-GFP, H-1-GFP, MVM-GFP o Chi-hH-1-GFP. Tres días después de la infección, las células se lisaron y los virus recombinantes producidos se valoraron usando un ensayo de transducción. Como antes, se realizaron ensayos de placas para controlar la producción de virus competentes para la replicación.

Utilizando este procedimiento, se obtuvieron títulos 2 a 5 veces más elevados que los que se alcanzaron con el uso de protocolos basados en la transfección, tal como se obtuvieron en la Fig. 1C (datos no mostrados). Es importante destacar que este procedimiento no aumentó la tasa de contaminación con RCV, en comparación con la producción llevada a cabo en ausencia de virus cooperador Ad-VP. Estos resultados ponen de manifiesto la eficacia de la utilización del cooperador Ad-VP para la producción de parvovirus recombinantes.

En conclusión, el procedimiento con cooperador Ad-VP ofrece las siguientes ventajas: (i) permite la producción de parvovirus recombinantes con títulos elevados sin afectar a la calidad de las reservas víricas, (ii) se reduce el tiempo de producción en 1 día (datos no mostrados), (iii) solo se basa en la infección vírica, evitando la necesidad de una etapa de transfección, (iv) permite la producción de parvovirus recombinantes en líneas celulares (por ejemplo, NBK) que son más permisivas que HEK 293T para la replicación del parvovirus, pero que no se habían podido utilizar antes porque eran difíciles de transfectar y (v) es un procedimiento más económico, ya que reduce los costes de los reactivos de transfección, el tiempo y el personal.

Lista de referencias

1. Atchison, R.W., B.C. Casto y W.M. Hammon, Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science*, 1965. 149: págs. 754-6.
2. Kestler, J., et al., cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(10): págs. 1619-32.
3. Dupont, F., et al., Tumor-selective gene transduction and cell killing with an oncotropic autonomous parvovirus-based vector. *Gene Ther*, 2000. 7(9): págs. 790-6.
4. Olijslagers, S., et al., Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther*, 2001. 8(12): págs. 958-65.
5. El Bakkouri, K., et al., In vivo anti-tumour activity of recombinant MVM parvoviral vectors carrying the human interleukin-2 cDNA. *J Gene Med*, 2005. 7(2): págs. 189-97.
6. Haag, A., et al., Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther*, 2000. 11(4): págs. 597-609.
7. Wetzel, K., et al., Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med*, 2001. 3(4): págs. 326-37.
8. Wetzel, K., et al., MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVMp reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through activation of T lymphocytes and NK cells. *Int J Cancer*, 2007. 120(6): págs. 1364-71.
9. Giese, N.A., et al., Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther*, 2002. 9(5): págs. 432-42.
10. Enderlin, M., et al., TNF-alpha and the IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. *Cancer Gene Ther*, 2009. 16(2): págs. 149-60.
11. Brandenburger, A. y S. Russell, A novel packaging system for the generation of helper-free oncolytic MVM vector stocks. *Gene Ther*, 1996. 3(10): págs. 927-31.
12. Chang, L.S., Y. Shi y T. Shenk, Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol*, 1989. 63(8): págs. 3479-88.
13. Carter, B.J., B.A. Antoni y D.F. Klessig, Adenovirus containing a deletion of the early region 2A gene allows growth of adeno-associated virus with decreased efficiency. *Virology*, 1992. 191(1): págs. 473-6.
14. Janik, J.E., et al., Efficient synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both adenovirus DNA binding protein and VA I RNA. *Virology*, 1989. 168(2): págs. 320-9.
15. Fisher, K.J., et al., Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-

- strand synthesis. *J Virol*, 1996. 70(1): págs. 520-32.
16. Nayak, R. y D.J. Pintel, Adeno-associated viruses can induce phosphorylation of eIF2alpha via PKR activation, which can be overcome by helper adenovirus type 5 virus-associated RNA. *J Virol*, 2007. 81(21): págs. 11908-16.
- 5 17. Grimm, D. y J.A. Kleinschmidt, Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(15): págs. 2445-50.
18. Xiao, X., J. Li y R.J. Samulski, Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, 1998. 72(3): págs. 2224-32.
19. Grimm, D., et al., Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther*, 1998. 9(18): págs. 2745-60.
- 10 20. Guan, W., et al., The genome of human parvovirus b19 can replicate in nonpermissive cells with the help of adenovirus genes and produces infectious virus. *J Virol*, 2009. 83(18): págs. 9541-53.
21. Ledinko, N. y H.W. Toolan, Human adenovirus type 12 as a "helper" for growth of H-1 virus. *J Virol*, 1968. 2(2): págs. 155-6.
- 15 22. Fox, E., P.T. Moen, Jr. y J.W. Bodnar, Replication of minute virus of mice DNA in adenovirus-infected or adenovirus-transformed cells. *Virology*, 1990. 176(2): págs. 403-12.
23. Wrzesinski, C., et al., Chimeric and pseudotyped parvoviruses minimize the contamination of recombinant stocks with replication-competent viruses and identify a DNA sequence that restricts parvovirus H-1 in mouse cells. *J Virol*, 2003. 77(6): págs. 3851-8.
- 20 24. He, T.C., et al., A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(5): págs. 2509-14.
25. Reed, S.E., et al., Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods*, 2006. 138(1-2): págs. 85-98.
26. Matsushita, T., et al., Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther*, 1998. 5(7): págs. 938-45.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Virus cooperador obtenido a partir de adenovirus que comprende:
 - (i) las siguientes secuencias de ADN adenovirico:
 - (a) un gen E2a;
 - 5 (b) un gen E4 (orf6);
 - (c) un gen de ARN VAI; y
 - (ii) la secuencia de la unidad génica de la cápside VP de un parvovirus con replicación autónoma.
2. El virus cooperador obtenido a partir de adenovirus según la reivindicación 1, en el que la expresión de la unidad génica de la cápside VP de parvovirus autónomo está bajo el control de un promotor CMV.
- 10 3. El virus cooperador obtenido a partir de adenovirus según la reivindicación 1 o 2, en el que el parvovirus autónomo se obtiene a partir de un virus H-1 o MVM (virus diminuto de ratón).
4. El virus cooperador obtenido a partir de adenovirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las secuencias de ADN adenoviricas se obtienen a partir de Ad5.
5. Un método de preparación de un parvovirus autónomo recombinante caracterizado porque
 - 15 (i) las células de mamífero se infectan con (a) un parvovirus recombinante que carece de los genes VP1 y VP2, y (b) el virus cooperador obtenido a partir de adenovirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
 - (ii) el parvovirus autónomo recombinante que carece de los genes VP1 y VP2 se aísla a partir de las células de mamífero o del medio después de cultivar las células.
- 20 6. El método según la reivindicación 5, en el que las células de mamífero son células NBK.
7. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que el parvovirus recombinante se obtiene a partir de virus H-1 o MVM (virus diminuto de ratón).
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que las secuencias de ADN adenovirico del virus/vector cooperador se obtienen a partir de Ad5.
- 25 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que en el vector de parvovirus recombinante los genes VP1 y VP2 están sustituidos por un transgén.
10. El método según la reivindicación 9, en el que la expresión del transgén está bajo el control del promotor P38.
- 30 11. El método según la reivindicación 9 o 10, en el que el transgén es un gen que codifica una proteína marca-dora.
12. El método según la reivindicación 9 o 10, en el que el transgén es un gen que codifica un polipéptido terapéutico o inmunógeno.
13. El método según la reivindicación 12, en el que la proteína terapéutica es un polipéptido citotóxico, una cito-cina y/o una quimiocina.
- 35 14. Una composición que comprende el virus/vector cooperador obtenido a partir de adenovirus según cual-quiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un parvovirus recombinante.
15. La composición según la reivindicación 14, en la que el virus cooperador obtenido a partir de adenovirus y el parvovirus recombinante contienen un transgén.
16. Una célula que contiene la composición según la reivindicación 15.

Figura 1

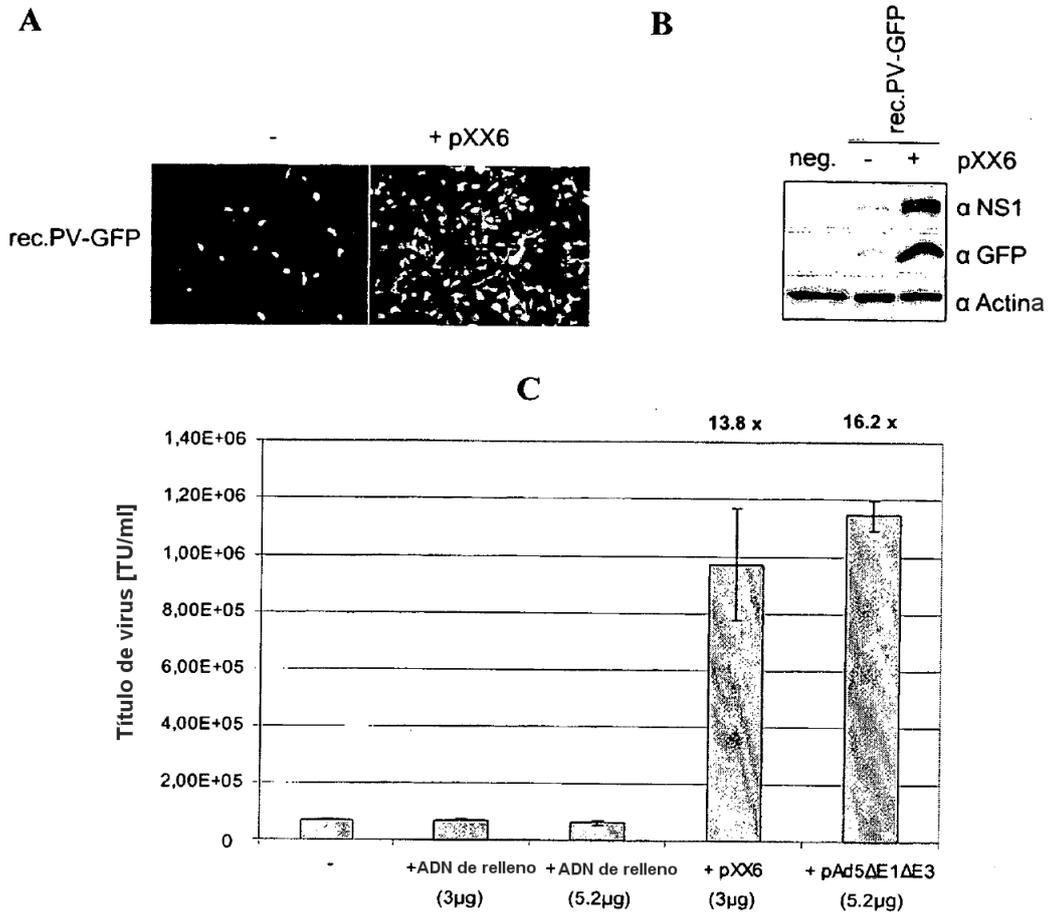


Figura 2

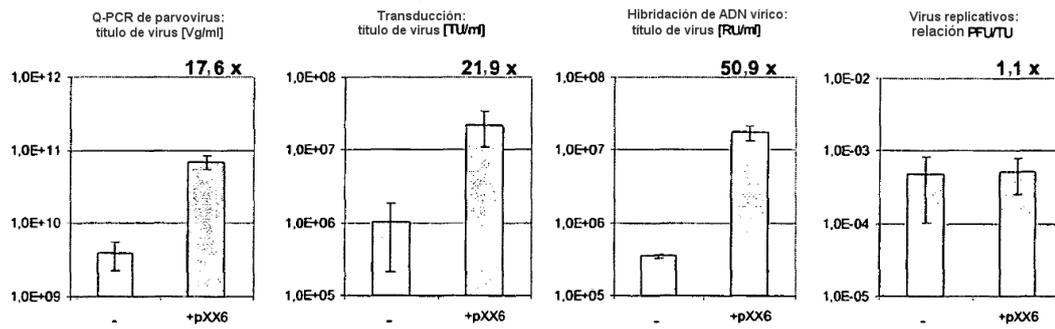


Figura 3

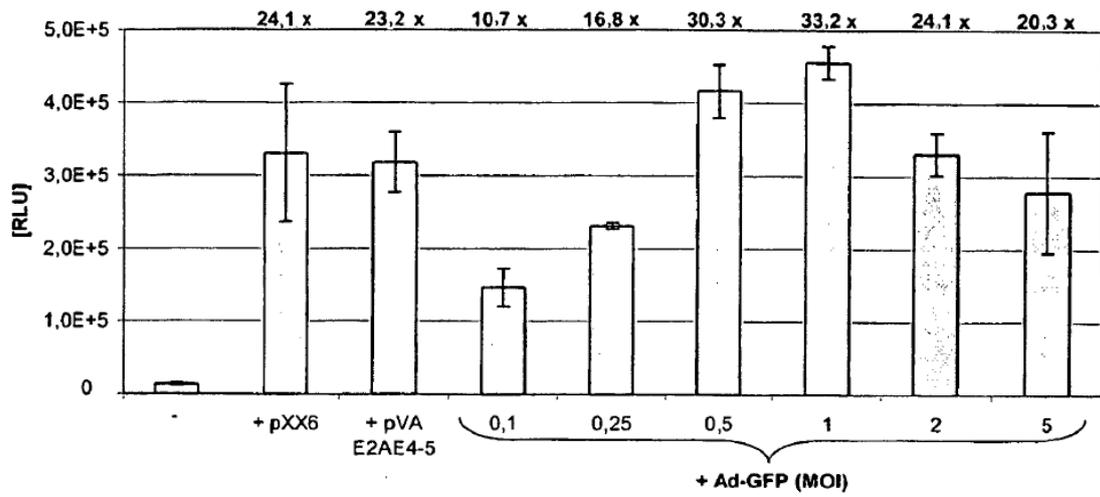
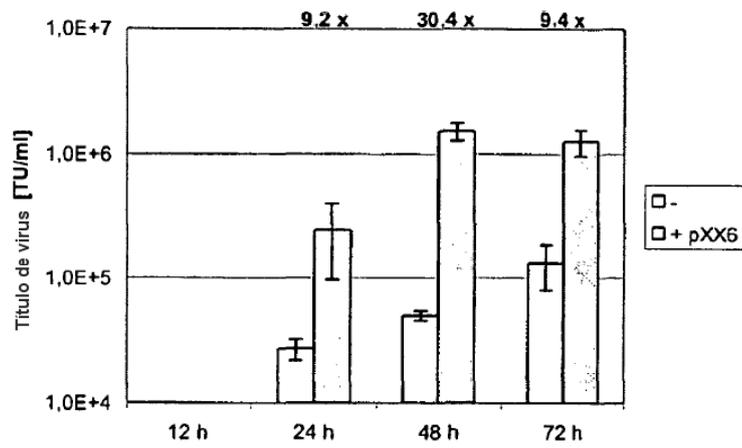


Figura 4

A



B

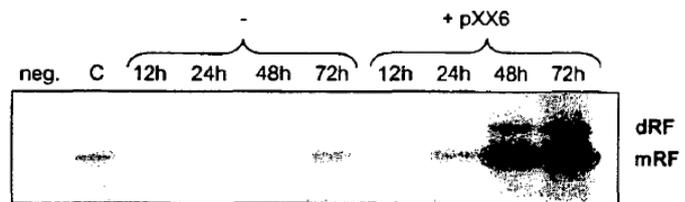


Figura 5

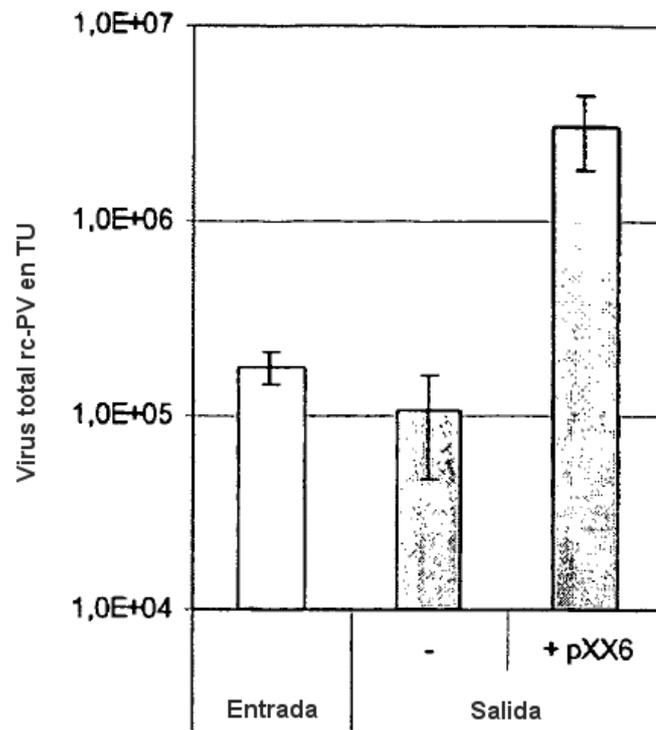
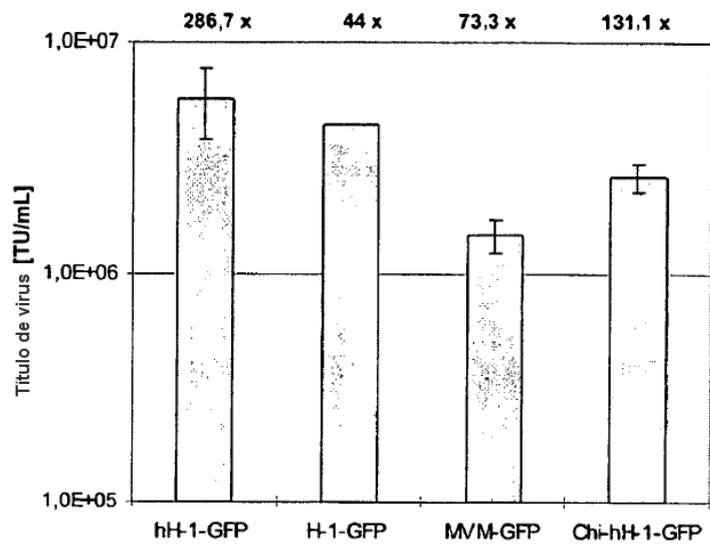


Figura 6

A



B

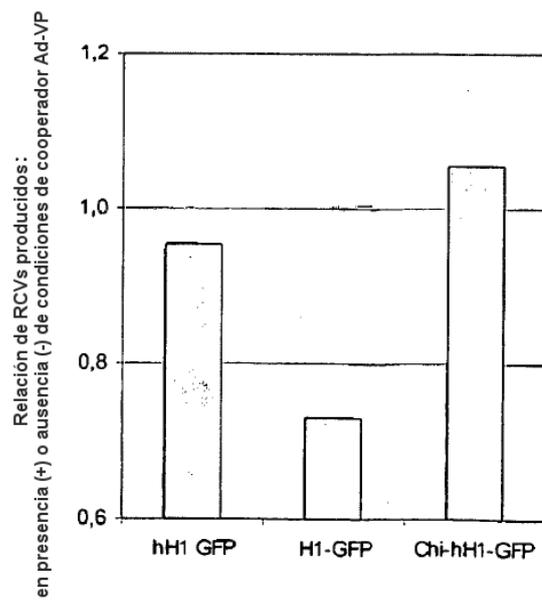


Figura 7

Mapa esquemático del plásmido cooperador Ad-VP

